

Universidad Católica Santa María
Escuela de Postgrado
Maestría en Química del Medio Ambiente



**“REMOCIÓN DE CLORPIRIFOS DE EFLUENTES
AGRÍCOLAS, POR ACCIÓN DE *Chlorella vulgaris* Y
Anabaena azollae EN SISTEMAS BATCH, AREQUIPA 2017.”**

Tesis presentada por la bachiller:

Yugra Condori, Mónica Meylín

Para optar el Grado Académico de:

**Maestro en Química del Medio
Ambiente**

Asesor:

Bernabé Ortiz, Julio César Ph.D.

Arequipa – Perú

2017

INFORME No. 009-2017-LAPS

A : **Dr. Hugo Tejada Pradell**
Director de la Escuela de Post Grado
Universidad Católica de Santa María de Arequipa.

DE : Prof. Luis Alberto Ponce Soto Ph.D.

ASUNTO : Informe de Dictamen de Borrador de Tesis “REMOCION DE CLORPIRIFOS DE EFLUENTES AGRICOLAS POR ACCION DE *Chlorella vulgaris* Y *Anabaena azollae* EN SISTEMAS BATCH, AREQUIPA 2017.”, para optar el grado de Maestro en Química del Medio Ambiente.

FECHA : Arequipa, 23 de Noviembre del 2017.

Tengo a bien dirigirme a usted, con la finalidad de informarle sobre el asunto, lo siguiente; después de haber revisado y evaluado el mencionado borrador de tesis intitulado “REMOCION DE CLORPIRIFOS DE EFLUENTES AGRICOLAS POR ACCION DE *Chlorella vulgaris* Y *Anabaena azollae* EN SISTEMAS BATCH, AREQUIPA 2017.”, soy de la opinión de APROBAR en el formato actual.

Es todo cuanto tengo que informar sobre el particular quedando en espera para cualquier esclarecimiento.

Atentamente,



Prof. Luis Alberto Ponce Soto Ph.D.

DNI 29546298

Dictaminador

Arequipa 23 de Noviembre del 2017

Señor Doctor,

Hugo Tejada Pradell

Director de la Escuela de Postgrado de la UCSM

Presente.

Ref.: Dictamen de Jurado de Tesis

De mi consideración,

Me es grato dirigirme a Ud. Con el fin de saludarlo atentamente y en atención al nombramiento como JURADO del Proyecto de Tesis titulado **“REMOCIÓN DE CLORPIRIFOS DE EFLUENTES AGRÍCOLAS, POR ACCIÓN DE *Chlorella vulgaris* Y *Anabaena azollae* EN SISTEMAS BATCH, AREQUIPA 2017.”** Con el que la bachiller Mónica Meylín Yugra Condori, pretende optar el Grado Académico de Magíster en Química del Medio Ambiente, debo decir que, verificado el cumplimiento de los objetivos, y la redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes y realizadas las correcciones sugeridas, considero se encuentra **APTO** para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Escuela de Postgrado.

Atentamente,



Julio César Bernabé Ortiz Ph. D.

DICTAMEN DE BORRADOR DE TESIS PARA EL GRADO DE MAESTRO

Expediente No. 20170000052366

Graduando: YUGRA CONDORI, MONICA MEYLIN

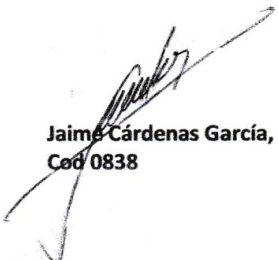
Título de la tesis: REMOCION DE CLORPIRIFOS DE EFLUENTES AGRICOLAS POR ACCION DE *Chlorella vulgaris* y *Anabaena azollae* EN SISTEMAS BATCH, AREQUIPA 2017

Dictamen:

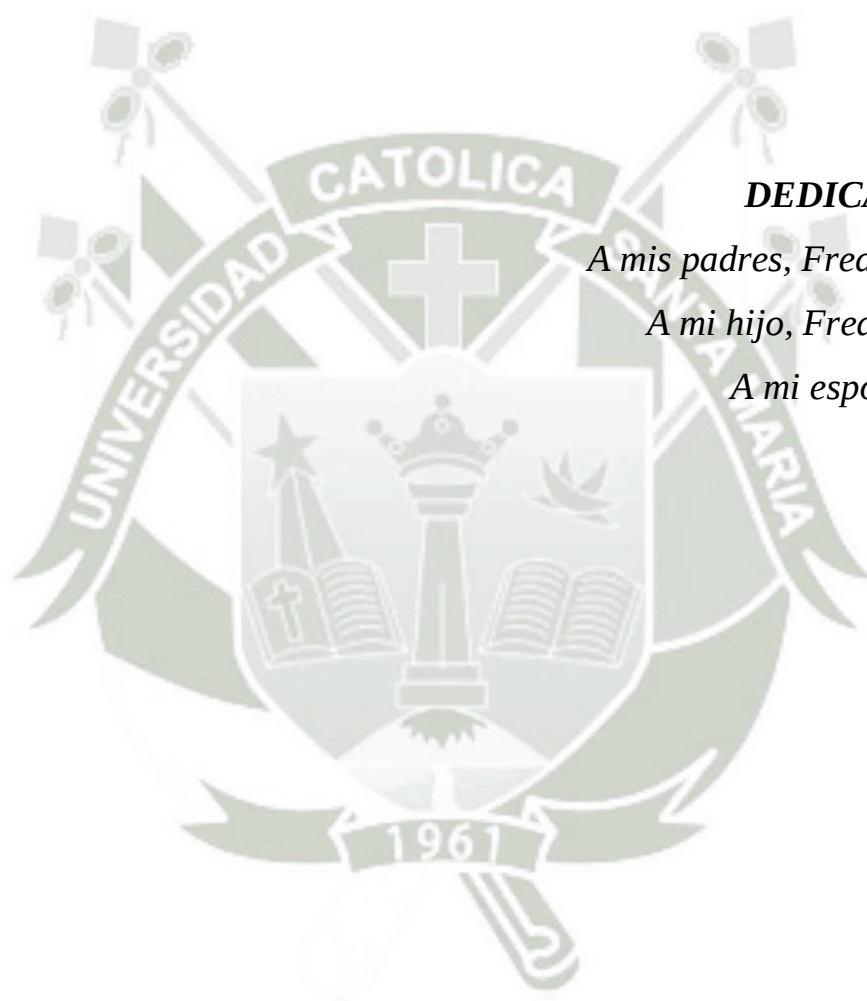
1. Los átomos de oxígeno deben de estar en cursiva cuando se escriben en una fórmula química.
2. En la tesis se debe de definir un solo tipo de formato: O toda la tesis con coma decimal o con punto decimal. No pueden ir juntos.
3. Pág. 34: revisar las ecuaciones para determinar el límite de detección y cuantificación.
4. Pág. 57: dado de que se va a trabajar un ANOVA de dos vías incluir las dos variables o condiciones que se van a evaluar. Para un mejor entendimiento del presente trabajo, recomiendo colocar las correspondientes hipótesis al momento de hacer el ANOVA de dos vías. Esto ayudará a obtener mejores conclusiones. Asimismo, con el fin de que el lector interesado repita los cálculos del ANOVA, indicar en donde están estos resultados o en que anexo.
5. Pág. 74: El párrafo de explicación no se entiende, lo que recomendaría rehacerlo y guiarse por lo mencionado en (5) en este dictamen.
6. Explicar la presencia de la figura 12, pág. 75. Asimismo, la presencia de la fig. 13, pág. 76.
7. Pág. 81: Se tiene un ANOVA de dos vías y se debe de colocar las hipótesis a examinar para así llegar a una mejor conclusión.
8. Pág. 82: En la tabla 14 se menciona que ha habido una transformación. Los datos de esta tabla deben de estar en alguna tabla o anexo si el lector interesado desea evaluar esto.
9. Tabla 15: Colocar las unidades de la concentración de clorofila.
10. Pág. 87: tabla 16 presenta un ANOVA de dos vías y nos e indica las dos variables a evaluar. La totalidad de los datos deben de estar en otra tabla o en un anexo.

Hechas las correcciones e inclusiones sugeridas, el presente trabajo está APTO para su sustentación.

Arequipa 25 de noviembre del 2018


Jaime Cárdenas García, PhD
Cod 0838





DEDICATORIA:

A mis padres, Fredy y Nelly.

A mi hijo, Fredy Matías.

A mi esposo, Julio.

AGRADECIMIENTOS:

A Dios por bendecir mi camino; a la Universidad Católica Santa María y la Escuela de postgrado por los conocimientos brindados por sus docentes; al Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica por brindarme la oportunidad de estudiar la Maestría; a mis Padres Fredy y Nelly, quienes me apoyaron y alentaron para culminar satisfactoriamente; y a Fredy Matías y Julio, por su paciencia y comprensión.



*La presente tesis fue financiada por el
Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e
Innovación Tecnológica CONCYTEC,
Convenio de Gestión N° 033-2015-
FONDECYT.*

LISTA DE ABREVIATURAS

% R_{CPF}: Porcentaje de remoción de Clorpirifos.

A. azollae: *Anabaena azollae*.

AB₆₆₅: Absorbancia a 665 nm.

AB₇₅₀: Absorbancia a 750 nm.

AU: Unidades de área en cromatogramas.

BBM: Medio Basal de Bold.

BG11: Medio azul-verde.

C. vulgaris: *Chlorella vulgaris*.

C.V.: Coeficiente de variación.

C_{CPF}: Concentración de Clorpirifos (mg L⁻¹).

Chl a: Clorofila “a”.

CPF: Clorpirifos.

D.S.R.: Desviación estándar relativa.

DSbl: Intercepción con eje “y” (Desviación estándar).

DT: Tiempo de duplicación (d).

EFS: Extracción en fase sólida.

ELL: Extracción líquido-líquido.

EPA: Agencia de Protección Ambiental de EE. UU.

GD: Generaciones producidas por día (d⁻¹).

H₀: Hipótesis nula.

HPLC: Cromatografía líquida de alta performance.

ICH: Consejo Internacional para la armonización.

LC: Límite de cuantificación.

LD: Límite de detección.

m: Pendiente de la curva.

min.: Minutos.

n: Número de datos.

N_i: Densidad celular (Microorganismos m L⁻¹)

ONP: Organonitrogenados.

OPP: Organofosforado.

PBS: Buffer fosfato salino.

R: coeficiente de correlación.

R²: Coeficiente de determinación.

Ti: Número de tratamiento.

t_i: Tiempo en días (d).

UP: Ultra pura.

USP: Convención de la Farmacopea de los Estados Unidos.

X_i: Concentración de biomasa (g L⁻¹).

Y_{bl}: Intercepción con el eje “y” (Curva de calibración).

μ: Tasa de crecimiento específico de las células (día⁻¹).



RESUMEN

Las diferentes especies nativas de microalgas y cianobacterias se aislaron de muestras colectadas de efluentes impactados con pesticidas de la provincia de Arequipa, a través del método de diluciones sucesivas y plaqueo; se logró obtener cultivos puros de *Chlorella vulgaris* y *Anabaena azollae* como inóculo con un volumen de 5000 mL en medio BBM y BG11, respectivamente. Las condiciones de la cámara de crecimiento fueron a 25 ± 2 °C, bajo luz continua ($65 \text{ mmol radiación activa fotosintética m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) proporcionada por lámparas fluorescentes blancas frías, la agitación se realizó con aireador por burbujeo continuo.

El diseño experimental constó de 12 sistemas Batch con 3 repeticiones; alternando la concentración de Clorpirifos (30; 15; 7.5 y 0 mg L^{-1}) y las especies biológicas por separado y en consorcio. Se validó un método analítico para determinar la concentración de Clorpirifos por cromatografía líquida de alta performance (HPLC), evaluando la linealidad, precisión, exactitud, límites de detección y cuantificación del método. Se estableció un protocolo para la preparación de la muestra con una extracción líquido-líquido del pesticida utilizando hexano.

La determinación de la productividad de biomasa se realizó a través de peso seco y conteo celular, mientras que la viabilidad de las microalgas y cianobacterias se determinó con la concentración de clorofila “a”.

Luego de 26 días de tratamiento, los resultados experimentales se evaluaron estadísticamente utilizando el paquete SPSS v.23.0. De acuerdo con el tamaño del conjunto de datos, se aplicaron estadísticas no paramétricas para todas las comparaciones, la significación estadística se definió con $p < 0.05$.

Los resultados mostraron mayor densidad celular para los cultivos mixtos de *Chlorella vulgaris* y *Anabaena azollae* con 95.67×10^4 Microorganismos mL^{-1} ; en cuanto al peso seco y clorofila los valores más altos se obtuvieron en los cultivos de *Chlorella vulgaris* con 1.21 mg mL^{-1} y 31.92 mg L^{-1} respectivamente. La productividad de biomasa fue mayor para el ensayo control (0 mg L^{-1} de Clorpirifos) de *Chlorella vulgaris*, obteniendo $0.04 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$; por el contrario la menor productividad fue $0.003 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ para *Anabaena azollae* a 30 mg L^{-1} de Clorpirifos. En cuanto a la eficiencia de remoción, se obtuvo mayores porcentajes en los sistemas Batch del cultivo mixto de *Chlorella vulgaris* y *Anabaena azollae* a 7.5 mg L^{-1} de Clorpirifos; removiendo el 81.12%; mientras que el menor porcentaje se obtuvo en el sistema de *Anabaena azollae* con 30 mg L^{-1} de Clorpirifos una eficiencia de remoción de 49.84%.

Por lo que se concluye que a mayor concentración de pesticida la eficiencia de remoción es menor, mientras que el uso de cultivos mixtos puede mejorar la remoción de Clorpirifos.

Palabras clave: Clorpirifos, *Chlorella vulgaris*, *Anabaena azollae*, remoción, productividad de biomasa, recuento celular y clorofila “a”.

ABSTRACT

In this research, the different native species of microalgae and cyanobacteria were isolated from samples collected from pesticide impacted effluents from Arequipa province, using the method of successive dilutions and plaque; pure cultures of *Chlorella vulgaris* and *Anabaena azollae* were obtained as inoculum with a volume of 5000 mL in BBM and BG11 medium, respectively. The growth conditions were 25 ± 2 °C, under continuous light (65 mmol of photosynthetic active radiation $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) provided by cold white fluorescent lamps, stirring was performed with continuous bubbling aerator.

The experimental design consisted of 12 batch systems with three replicates, alternating the concentration of Chlorpyrifos (30; 15, 7.5 and 0 mg L^{-1}) and biological species separately and consortium. An analytical method was valeted to determine the concentration of Chlorpyrifos by High Performance Liquid Chromatography (HPLC); testing the linearity, precision, accuracy, detection and quantification limits of the method. A protocol was established for the preparation of the sample with a liquid-liquid extraction of the pesticide using hexane.

The determination of biomass productivity was made through dry weight and cell count, while the viability of microalgae and cyanobacteria was determined with the concentration of chlorophyll "a".

After 26 days of treatment, the experimental results were statistically evaluated using the SPSS v.23.0 package. Based on the size of the data set, nonparametric statistics were applied for all the comparisons, the statistical significance was defined with $p < 0.05$.

The results showed higher cell density for mixed cultures of *Chlorella vulgaris* and *Anabaena azollae* with 95.67×10^4 Cells mL^{-1} ; in terms of dry weight and chlorophyll, the highest values were obtained in the cultures of *Chlorella vulgaris* with 1.21 mg mL^{-1} and 31.92 mg L^{-1} , respectively. The biomass productivity was higher for the control test (0 mg L^{-1} of Chlorpyrifos) of *Chlorella vulgaris*, obtaining $0.04 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ and the lowest productivity was $0.003 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ for *A. azollae* at 30 mg L^{-1} of Chlorpyrifos. Regarding the removal efficiency, highest percentages were obtained in the batch systems of the mixed culture of *Chlorella vulgaris* and *Anabaena azollae* at 7.5 mg L^{-1} of Chlorpyrifos, removing 81.12%; while the lowest was in the *A. azollae* system with 30 mg L^{-1} of Chlorpyrifos with a removal efficiency of 49.84%

Therefore, it is concluded that a higher concentration of pesticide the removal efficiency is lower, while the use of mixed cultures can improve the elimination of Chlorpyrifos.

Key words: Chlorpyrifos, *Chlorella vulgaris*, *Anabaena azollae*, removal, biomass productivity, cell count and chlorophyll.

ÍNDICE

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMEN

ABSTRACT

CAPÍTULO I	1
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	4
HIPÓTESIS	4
VARIABLES	4
CAPÍTULO II	6
MARCO TEÓRICO	6
2.1. Los Pesticidas.....	6
2.2. Pesticidas en el ambiente acuático.	7
2.3. Los pesticidas organofosforados.	8
2.3.1. Clorpirifos.	9
2.3.2. Estructura química del clorpirifos.	10
2.3.3. Usos y efectos.....	13
2.4. Determinación de organofosforados en muestras de agua.	13
2.4.1. Recolección y preparación de muestras para análisis.	14
2.4.2. Técnicas para aislar y enriquecer los analitos.	16
2.4.3. Preparación de muestras para extracción líquido-líquido (ELL).	17
2.4.4. Condiciones de HPLC.	17
2.5. Biorremediación de lechos acuáticos.	19
2.5.1. Biorremediación por microorganismos.	20
2.5.2. Las microalgas.....	25
2.5.3. El uso de microalgas para la remediación.	27
2.6. La microalga <i>Chlorella vulgaris</i>	31

2.6.1. Requerimientos para el crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i>	33
2.7. <i>Anabaena azollae</i>	37
2.7.1. Cultivo de <i>Anabaena azollae</i>	39
CAPÍTULO III	42
MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
3.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN.....	42
3.2. MATERIALES.....	42
3.3. MÉTODOS.....	44
3.3.1. Aislamiento y cultivo de microalgas.	44
3.3.2. Validación del método analítico para la determinación de clorpirifos por HPLC.....	46
3.3.3. Preparación de la muestra.....	48
3.3.4. Estudio de la capacidad de remoción de Clorpirifos con <i>Chlorella vulgaris</i> y <i>Anabaena azollae</i> en sistemas Batch.....	48
3.3.5. Evaluación de la productividad de biomasa en el crecimiento de las microalgas.	49
3.3.6. Cuantificación de la producción de clorofila “a” por <i>Chlorella vulgaris</i> y <i>Anabaena azollae</i> a diferentes concentraciones de Clorpirifos.....	51
3.3.7. Análisis y procesamiento de datos	51
3.4. FLUJOGRAMA DE ACTIVIDADES.....	52
CAPÍTULO IV	53
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
1.1. Aislamiento y cultivo de microalgas nativas de la región Arequipa.	53
1.2. Validación del método analítico para la determinación de clorpirifos por HPLC.....	55
Linealidad	56
Exactitud	58
Precisión - Repetibilidad.....	60
Límite de detección y cuantificación	62

1.3. Estudio de la capacidad de remoción de clorpirifos con <i>Chlorella vulgaris</i> y <i>Anabaena azollae</i> en sistemas Batch.....	62
1.4. Evaluación de la productividad de biomasa en el crecimiento microalgal. .	71
1.5. Cuantificación de la producción de clorofila por <i>Chlorella vulgaris</i> y <i>Anabaena azollae</i> a diferentes concentraciones de Clorpirifos.....	79
CAPÍTULO V	87
CONCLUSIONES	87
RECOMENDACIONES.....	89
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	90
ANEXOS	110



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Descripción de Variables Independientes y Dependientes	5
Tabla 2.	Propiedades fisicoquímicas de clorpirifos.	11
Tabla 3.	Biosorción de pesticidas y compuestos relacionados por microalgas.	27
Tabla 4.	Tratamientos para la determinación del % de remoción clorpirifos. ..	49
Tabla 5.	Determinación de la media, desviación estándar y coeficiente de variación a diferentes concentraciones de la solución estándar de Clorpirifos.	57
Tabla 6.	Porcentaje de recuperación de Clorpirifos para determinar la exactitud del método analítico.	59
Tabla 7.	Prueba t-Student para medias de dos muestras emparejadas para analizar porcentaje de recuperación.	60
Tabla 8.	Prueba de repetibilidad para determinar la precisión del método analítico.	61
Tabla 9.	Evaluación de la concentración de Clorpirifos en los diferentes tratamientos durante 26 días de cultivo.	65
Tabla 10.	Determinación del porcentaje de remoción de diferentes concentraciones de Clorpirifos por acción de <i>Anabaena azollae</i> y <i>Chlorella vulgaris</i>	67
Tabla 11.	Comparación del porcentaje de remoción de diferentes concentraciones de por acción de <i>Anabaena azollae</i> y <i>Chlorella vulgaris</i>	68
Tabla 12.	Evaluación de la tasa de crecimiento específico, tiempo de duplicación y número de generaciones.	74
Tabla 13.	Determinación de la productividad de biomasa de <i>Anabaena azollae</i> y <i>Chlorella vulgaris</i> a diferentes concentraciones de clorpirifos.	75
Tabla 14.	Comparación de la productividad de biomasa de <i>Anabaena azollae</i> y <i>Chlorella vulgaris</i> en diferentes concentraciones de clorpirifos.	76

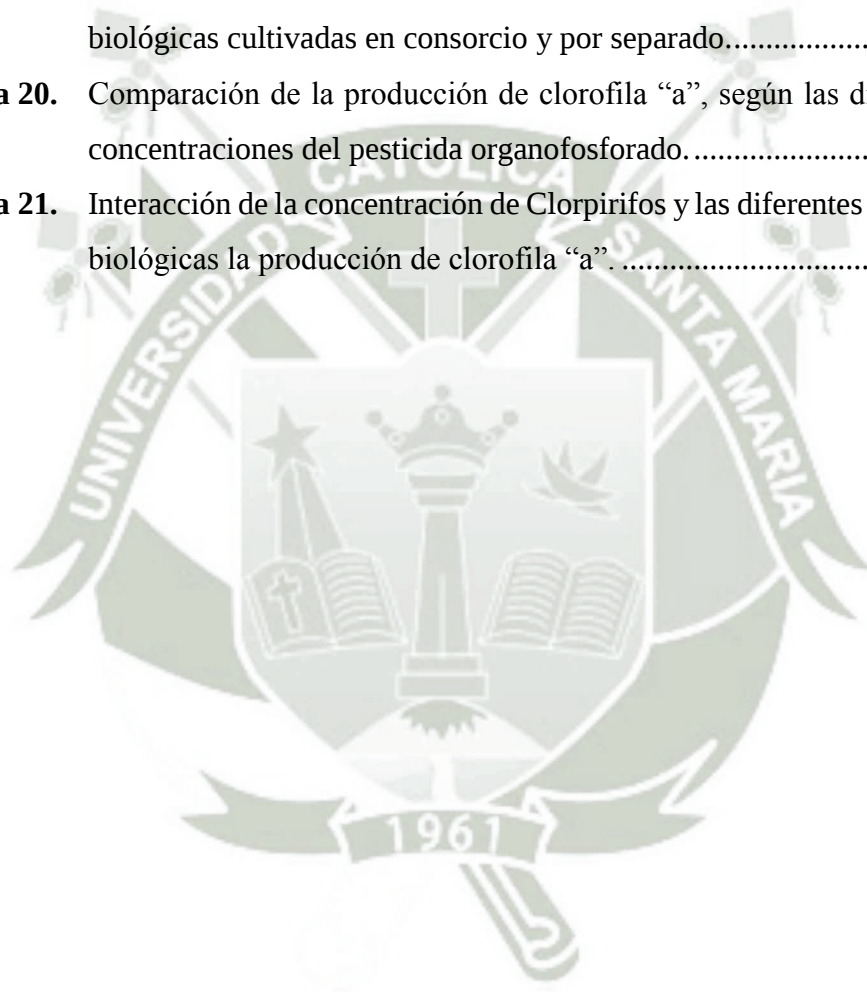
Tabla 15. Determinación de la producción de clorofila “a” en los cultivos de <i>Anabaena azollae</i> y <i>Chlorella vulgaris</i> a diferentes concentraciones de clorpirifos.	80
Tabla 16. Comparación de la producción de clorofila “a” en los cultivos de <i>Anabaena azollae</i> y <i>Chlorella vulgaris</i> a diferentes concentraciones de clorpirifos.	81

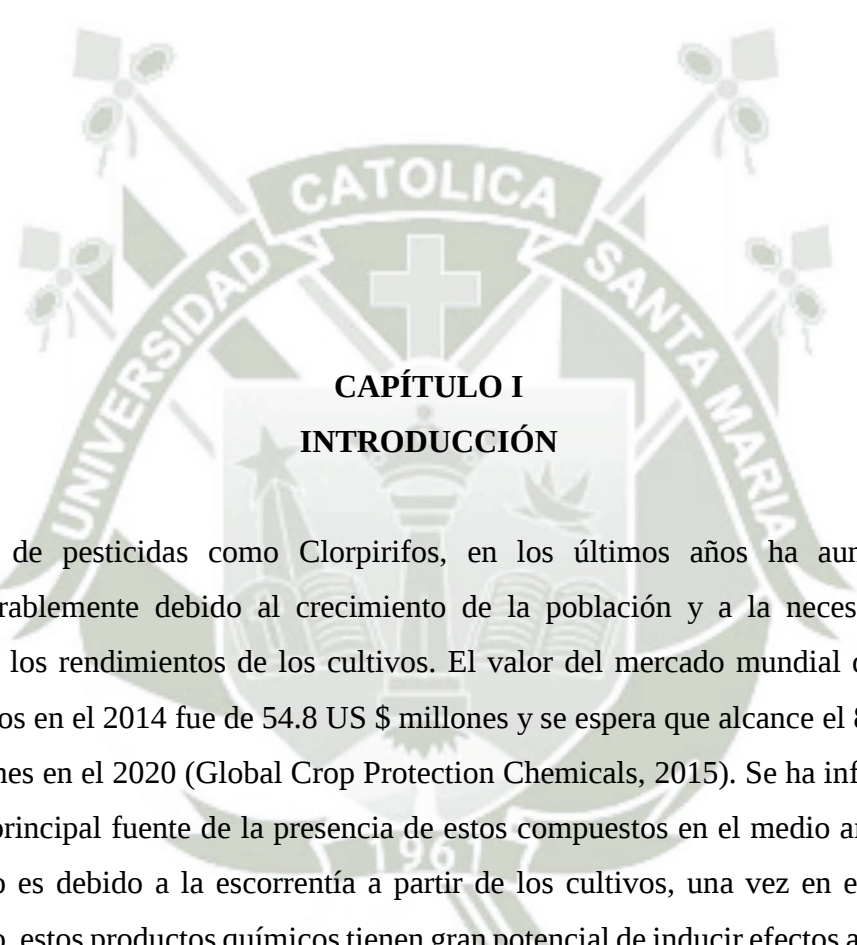


ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Fuentes y destinos de los pesticidas en el ambiente acuático.	8
Figura 2.	Estructura química del clorpirifos.	11
Figura 3.	Etapas principales en el procedimiento analítico para determinar pesticidas organofosforados y organonitrogenados en muestras de agua.....	15
Figura 4.	Imagen de células de la microalgas <i>Chlorella vulgaris</i>	32
Figura 5.	Imagen de <i>Anabaena azollae</i>	37
Figura 6.	<i>Chlorella vulgaris</i> en cámara de Neubauer para realizar conteo celular.	54
Figura 7.	<i>Anabaena azollae</i> en cámara de Neubauer.....	55
Figura 8.	Cromatograma de solución estándar de Clorpirifos con tiempo de retención de 4.3 min.	56
Figura 9.	Regresión lineal para concentraciones de Clorpirifos relacionadas con el área de pico, utilizando HPLC.....	58
Figura 10.	Sistemas Batch a diferentes concentraciones de Clorpirifos con <i>Chlorella vulgaris</i> y <i>Anabaena azollae</i> en consorcio y en cultivos separados.	63
Figura 11.	Remoción de Clorpirifos durante los 26 días de evaluación por acción de <i>Chlorella vulgaris</i> y <i>Anabaena azollae</i> en los diferentes tratamientos.	66
Figura 12.	Comparación del porcentaje de remoción de Clorpirifos, según las diferentes especies biológicas, por separado y en consorcio.....	69
Figura 13.	Comparación del porcentaje de remoción de Clorpirifos, según las diferentes concentraciones iniciales del pesticida organofosforado.	70
Figura 14.	Interacción de la concentración de Clorpirifos y las diferentes especies biológicas en el porcentaje de remoción del pesticida.	71
Figura 15.	Crecimiento de <i>Anabaena azollae</i> y <i>Chlorella vulgaris</i> en los diferentes sistemas de cultivo.....	72

Figura 16.	Comparación de la productividad de biomasa, según las especies biológicas cultivadas en consorcio y por separado.....	77
Figura 17.	Comparación de la productividad de biomasa, según las diferentes concentraciones del pesticida organofosforado.	78
Figura 18.	Interacción de la concentración de Clorpirifos y las diferentes especies biológicas la productividad de Biomasa.	79
Figura 19.	Comparación de la producción de clorofila “a”, según las especies biológicas cultivadas en consorcio y por separado.....	82
Figura 20.	Comparación de la producción de clorofila “a”, según las diferentes concentraciones del pesticida organofosforado.	83
Figura 21.	Interacción de la concentración de Clorpirifos y las diferentes especies biológicas la producción de clorofila “a”.	84





CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

El uso de pesticidas como Clorpirifos, en los últimos años ha aumentado considerablemente debido al crecimiento de la población y a la necesidad de mejorar los rendimientos de los cultivos. El valor del mercado mundial de estos productos en el 2014 fue de 54.8 US \$ millones y se espera que alcance el 81.8 US \$ millones en el 2020 (Global Crop Protection Chemicals, 2015). Se ha informado que la principal fuente de la presencia de estos compuestos en el medio ambiente acuático es debido a la escorrentía a partir de los cultivos, una vez en el medio acuático, estos productos químicos tienen gran potencial de inducir efectos adversos en los ecosistemas (Moore et al., 2007), entre ellos la comunidad de macro invertebrados, en la salud humana y el medio ambiente, incluso a bajas concentraciones (Damásio et al., 2011).

Por otra parte, los pesticidas pueden degradarse por procesos físicos-químicos en uno o más productos de transformación que podrían ser más tóxicos o persistentes que el original. Los residuos de pesticidas también pueden ser adsorbidos en los

sedimentos (Masiá, Vásquez, Campo, & Picó, 2015). Por ejemplo, los productos químicos tales como Atrazina y Alaclor, por nombrar sólo dos, han sido prohibidos por varios gobiernos, mientras que otros, como el malatión o diazinone, se mantienen en constante revisión y es probable que gradualmente sean eliminados o prohibidos. Para minimizar el impacto de esta contaminación, es importante desarrollar tecnologías innovadoras para remediar aguas contaminadas con estos agroquímicos.

Durante años, el uso de plantas para remediar suelos y agua contaminados (denominado fitorremediación) ha ganado atención y popularidad debido a que es una tecnología in situ, que reduce las concentraciones o efectos tóxicos de contaminantes en el medio ambiente (Mitton, Gonzalez, Monserrat, & Miglioranza, 2018; Ye et al., 2014) y que es sostenible para el tratamiento de una variedad de metales pesados como el arsénico (N. K. Singh, Raghubanshi, Upadhyay, & Rai, 2016), como también para pesticidas como mecoprop, atrazina, simazina, diazinona, alachlor, clorfenvinfos, lindano, malatión, pentaclorobenceno, clorpirifos y endosulfán (Matamoros & Rodríguez, 2016). La biorremediación con microalgas se ha utilizado en áreas contaminadas con nutrientes y metales pesados como el cromo y cadmio (Perales-Vela, Peña-Castro, & Cañizares-Villanueva, 2006; Suresh Kumar, Dahms, Won, Lee, & Shin, 2015); y ante el incremento de la contaminación ambiental por pesticidas, las microalgas también pueden remover estos contaminantes del agua a bajo costo (Matamoros & Rodríguez, 2016). Los sistemas de tratamiento de aguas residuales con microalgas podrían ser una solución en áreas remotas de contaminación; por lo que es necesario realizar un estudio en laboratorio, para posteriormente elaborar un plan piloto que ofrezca tratar diferentes tipos de aguas residuales agroindustriales (Labbé, Ramos-Suárez, Hernández-Pérez, Baeza, & Hansen, 2017). Las microalgas tienen muchos usos potenciales para productos farmacéuticos, alimentos, alimentos para animales, productos químicos, cosméticos, biocombustibles y biofertilizantes (Faried et al., 2017); y la producción de cultivos de microalgas llega a ser sostenible y económica por el bajo consumo de energía, agua y nutrientes. Por ejemplo, varias tecnologías de

remediación, tales como humedales o estanques son apropiados para el cultivo y remediación de contaminantes (Vymazal & Březinová, 2016).

Aunque la capacidad de los sistemas de tratamiento de microalgas para eliminar la materia orgánica y los nutrientes de agua contaminada ya ha sido estudiado, pocos estudios se han centrado en la eliminación de microcontaminantes orgánicos. Existen estudios a escala de laboratorio donde se evaluó la capacidad de microalgas para eliminar microcontaminantes orgánicos tales como compuestos fenólicos, agentes tensoactivos biocidas e hidrocarburos aromáticos policíclicos que sugieren que los sistemas de tratamiento de aguas residuales basado en microalgas pueden ser eliminados por biodegradación y absorción (de-Bashan & Bashan, 2010; Haritash & Kaushik, 2009). Sin embargo, poca atención se ha prestado a los procesos que intervienen en la eliminación de pesticidas o el efecto de estos en las microalgas. Por lo mencionado anteriormente, el presente estudio de investigación plantea evaluar la remoción de diferentes concentraciones de Clorpirifos con microalgas y cianobacterias, trabajando por separado y en consorcio en reactores Batch; para lograr remediar efluentes impactados con pesticidas.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Remover Clorpirifos de efluentes agrícolas, por acción de *Chlorella vulgaris* y *Anabaena azollae* en sistemas Batch.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar e identificar microalgas y cianobacterias de efluentes impactados con pesticidas de la región de Arequipa.
- Validar un método analítico para la determinación de Clorpirifos por Cromatografía Líquida de Alta Performance.
- Determinar el porcentaje de remoción de Clorpirifos por acción de *Chlorella vulgaris* y *Anabaena azollae*, en consorcio y por separado a diferentes concentraciones del pesticida.
- Evaluar el crecimiento celular de los tratamientos a través de la productividad de biomasa y tasa de crecimiento específico.
- Cuantificar la producción de clorofila “a” en las diferentes unidades experimentales.

HIPÓTESIS

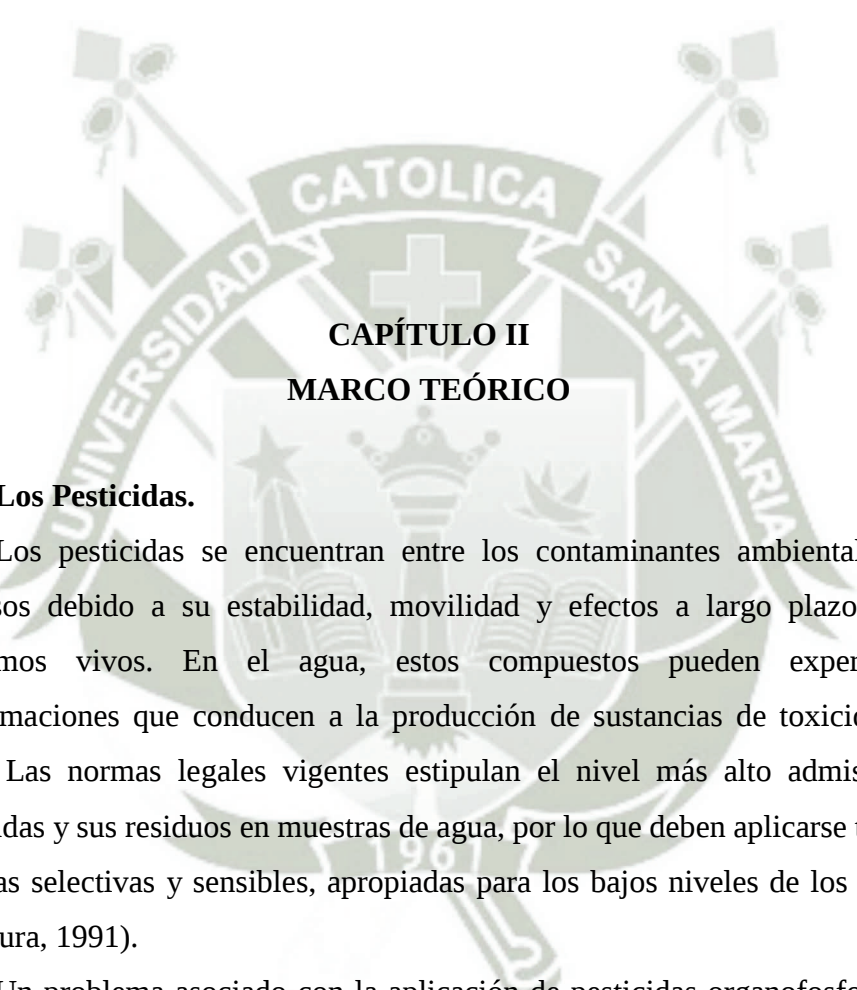
Dado que los lechos acuáticos de las zonas agrícolas son contaminados con residuos de pesticidas y otros contaminantes hidrocarbonados; es posible que las microalgas y cianobacterias aisladas de esos ambientes puedan remover los compuestos orgánicos y remediar ecosistemas acuáticos.

VARIABLES

La siguiente tabla (Tabla 1) muestra las variables e indicadores que se evaluaron en la presente investigación:

Tabla 1. Descripción de Variables Independientes y Dependientes

<i>Variables independientes</i>	<i>Indicadores</i>	<i>Categorías/Unidad</i>	<i>Tipo de variable/ escala</i>
Concentración de Clorpirifos (C_{CPF}).	C_{CPF} inicial en reactores Batch.	- Control - 7.5 mg L^{-1} - 15 mg L^{-1} - 30 mg L^{-1}	Cuantitativa Continua/ Razón
Especie biológica.	<i>Anabaena azollae</i> <i>Chlorella vulgaris</i>	- <i>A. azollae</i> - <i>C. vulgaris</i> - <i>A. azollae</i> + <i>C. vulgaris</i>	Cualitativa/ Nominal
<i>Variables dependientes</i>	<i>Indicadores</i>	<i>Categorías/Unidad</i>	<i>Tipo de variable/ escala</i>
Biomasa de <i>Anabaena azollae</i> y <i>Chlorella vulgaris</i>	Densidad celular de <i>A. azollae</i> y <i>C. vulgaris</i> .	Microorganismos mL^{-1}	Cuantitativa Discreta/ Razón
Concentración de clorofila “a”	Concentración <i>Chl a</i>	mg L^{-1}	Cuantitativa Continua/ Razón
Concentración de Clorpirifos final (C_{CPF}).	C_{CPF} residual en reactores Batch.	mg L^{-1}	Cuantitativa Continua/ Razón
Porcentaje de remoción de Clorpirifos. ($\% R_{CPF}$)	Concentración de CPF removido expresada en porcentaje.	$\% R_{CPF}$	Cuantitativa Continua



CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO

2.1. Los Pesticidas.

Los pesticidas se encuentran entre los contaminantes ambientales más peligrosos debido a su estabilidad, movilidad y efectos a largo plazo en los organismos vivos. En el agua, estos compuestos pueden experimentar transformaciones que conducen a la producción de sustancias de toxicidad aún mayor. Las normas legales vigentes estipulan el nivel más alto admisible de plaguicidas y sus residuos en muestras de agua, por lo que deben aplicarse técnicas analíticas selectivas y sensibles, apropiadas para los bajos niveles de los analitos (Iyaniwura, 1991).

Un problema asociado con la aplicación de pesticidas organofosforados y organonitrogenados es la necesidad de monitorear sus niveles en el ambiente, especialmente en el agua, en vista de su capacidad de acumularse (Galceran & Santos, 2005).

2.2. Pesticidas en el ambiente acuático.

Una vez que los plaguicidas ingresan al medio acuático, disminuyen sustancialmente la calidad de las aguas superficiales y las aguas subterráneas, que constituyen fuentes de agua potable para una gran parte de la población mundial.

Los mayores niveles de concentración se registran en la escorrentía de nieve derretida durante el deshielo en la primavera, cuando los pesticidas se pulverizan sobre los cultivos (Namiesnik, 1998). La Figura 1 ilustra las principales vías de transporte y la circulación de plaguicidas en el medio acuático. Hay muchas fuentes de descarga de plaguicidas en el medio acuático. Pueden provenir tanto de fuentes aéreas (por ejemplo, precipitación atmosférica o tierras de cultivo) como de fuentes puntuales (por ejemplo, efluentes de diversos orígenes o sitios de eliminación de residuos peligrosos). También pueden ser transportados a largas distancias a través del aire (Cairns, 1992).

Una vez que están en el ambiente acuático, los pesticidas están sujetos a una variedad de procesos: físicos (acumulación, deposición, dilución y difusión); químico (hidrólisis y oxidación); fotoquímico (fotólisis y fotodegradación); y, bioquímico (biodegradación, biotransformación y bioacumulación) (Namiesnik, 1998). Estos procesos pueden dar lugar a sustancias de toxicidad aún mayor, que, si se acumulan en organismos acuáticos, pueden provocar cambios irreversibles y un gran daño. Los niveles de concentración de los residuos de plaguicidas suelen ser muy bajos, pero su liberación a largo plazo en el medio ambiente, incluso en pequeñas cantidades, conduce a la acumulación, lo que también produce efectos negativos.

Hoy en día, los seres humanos entran en contacto con pesticidas con más frecuencia que con cualquier otro compuesto químico, incluso contaminantes industriales (Biziuk, 1996). Por eso es tan importante continuar expandiendo nuestro conocimiento de las propiedades de los pesticidas y de las cargas de estos compuestos en los diversos compartimentos del medio ambiente, en particular las aguas naturales.

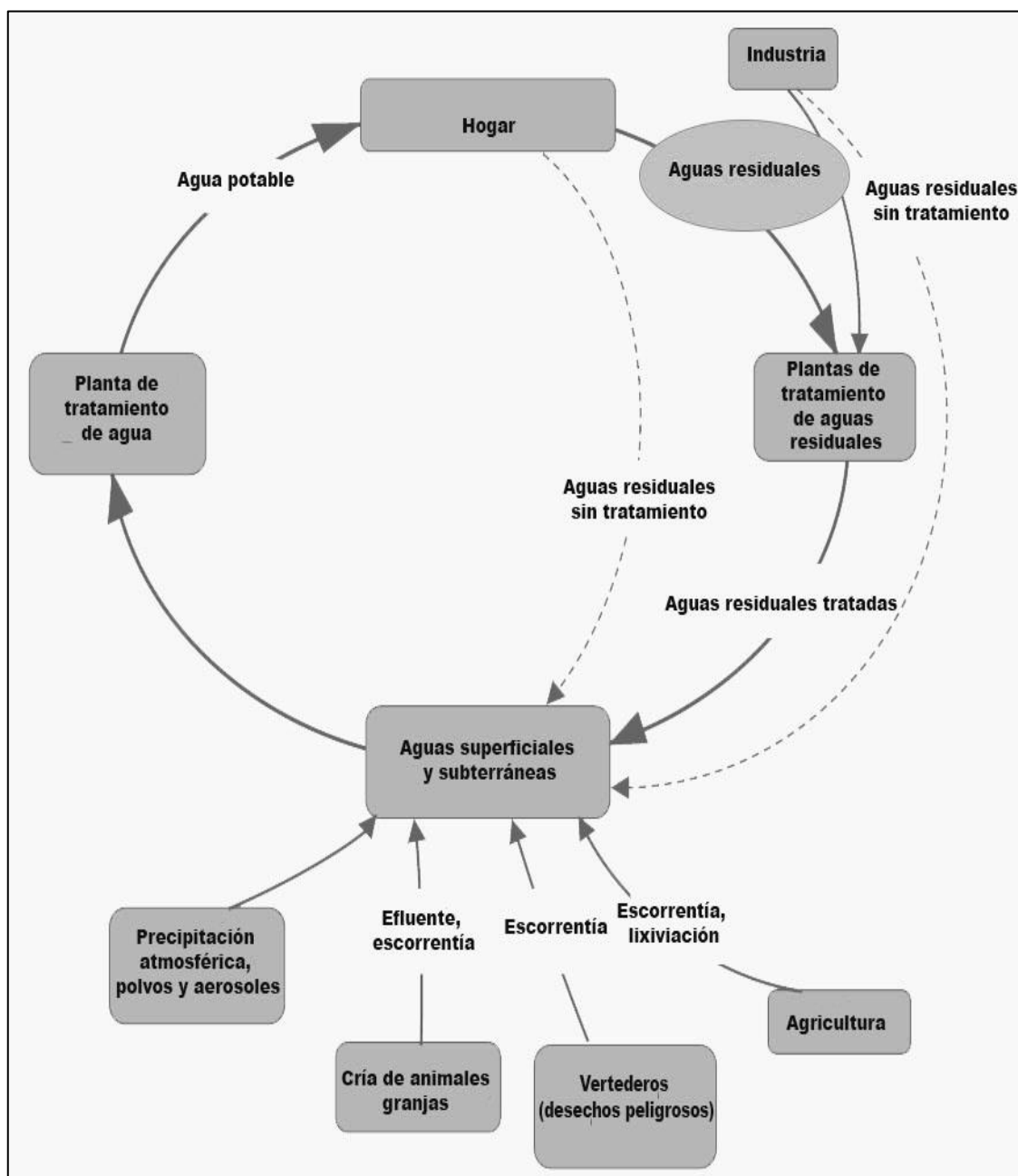


Figura 1. Fuentes y destinos de los pesticidas en el ambiente acuático (Fuente: Cooper y Bidwell, 2006).

2.3. Los pesticidas organofosforados.

Los organofosforados son pesticidas que se usan comúnmente en el mundo (Cooper y Bidwell, 2006). Hay muchos usos para estos compuestos, que incluyen

su uso en la agricultura como pesticidas, medicamentos humanos y veterinarios (por ejemplo, medicamentos contra los piojos), lubricantes, acondicionadores y extinción de incendios (Assadi, 2010; Jaga y Dharmani, 2003). Muchos organotiofosfatos se convierten fácilmente de tiones a oxones. La conversión puede ocurrir en el ambiente bajo la influencia del oxígeno y la luz; y también en el cuerpo, principalmente por la acción de las enzimas microsómicas hepáticas. Aunque los oxones se degradan más fácilmente que los tiones, son mucho más tóxicos que los tiones. Finalmente, los tiones y oxones se hidrolizan en el enlace del éster, dan como resultado fosfatos de alquilo y grupos salientes que son de toxicidad relativamente baja (Rao et al., 2003).

2.3.1. Clorpirifos.

Clorpirifos (CPF) es un insecticida organofosforados con actividad anticolinesterasa no sistémica de contacto. Ha sido ampliamente utilizado en agricultura, horticultura, viticultura y silvicultura en una amplia gama de cultivos, en aplicaciones residenciales y no residenciales para controlar cucarachas, pulgas, garrapatas en el ganado y plagas en casas de animales. La Agencia de Protección Ambiental de EE. UU. (EPA) estima que en los Estados Unidos se usan más de 20 millones de libras de CPF anualmente (US EPA, 2002) de los cuales se aplican aproximadamente 11 millones de libras en entornos no agrícolas.

Actualmente, CPF está registrada en más de 100 países, incluidos países industrializados y en desarrollo; es el más estudiado, con más de 2000 estudios e informes publicados que evalúan el impacto del ingrediente activo en el medio ambiente y la salud humana, especialmente en los niños. De hecho, en los últimos años se ha demostrado un exceso de la ingesta dietética de los niños causada por las actividades en la superficie de alimentos a la mano de los niños (John L. Adgate & Sexton, 2001; Lu, Kedan, Fisker-Andersen, Kissel, & Fenske, 2004); consecuentemente, en 2002, la EPA confirmó la decisión de eliminar todo el uso del propietario y reducir los usos no agrícolas a menos del 3%, limitándolos al control de mosquitos en la salud pública (US EPA, 2002). Además, la EPA indicó

medidas para el uso de los agricultores para mitigar los riesgos ocupacionales y ecológicos (por ejemplo, adoptando un período de espera de 24 horas antes de ingresar a los campos donde se ha aplicado el CPF) (US EPA, 2002).

En Canadá, la Agencia Reguladora del Manejo de Plagas ha implementado medidas para mitigar el riesgo para las personas y el medio ambiente de manera similar a la EPA (PMRA, 2010). La Autoridad Australiana de Plaguicidas y Medicamentos Veterinarios permite el uso de productos que contienen CPF con limitaciones, como las concentraciones límite de CPF (50 g L^{-1}) en formulaciones líquidas vendidas para uso doméstico y aplicaciones para interiores (Storck, Karpouzias, & Martin-Laurent, 2017). En la Unión Europea (UE), CPF está incluido en el Anexo I de la Directiva 91/414/EEC, permitiendo que los productos que contienen CPF como ingrediente activo sean registrados por las autoridades reguladoras de estados miembros individuales de la UE (UE, 1991). En muchos países en desarrollo de las áreas del Pacífico, América Latina y en África existen usos agrícolas y residenciales de grandes cantidades de CPF. Se han reportado cientos de miles de muertes por año en estas áreas debido a episodios de envenenamiento agudo derivados del uso excesivo en la agricultura, uso inadecuado de dispositivos de protección individual (por ejemplo, guantes y ropa de protección) e ingestión intencional (Eyer et al., 2009).

2.3.2. Estructura química del clorpirifos.

El Clorpirifos, *O,O*-dietil-*O*-(3,5,6-tricloro-2-piridil)fosforotioato (Figura 2), se presenta como cristales sólidos cuyo color oscila entre incoloro y blanco amarillento. El compuesto tiene un leve olor similar a mercaptanos, y es sólo ligeramente soluble en agua, pero es soluble en la mayoría de disolventes orgánicos.

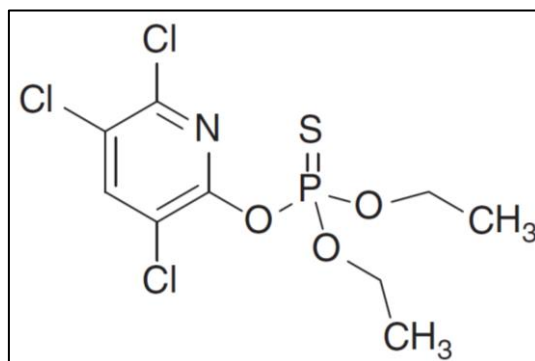


Figura 2. Estructura química del clorpirifos ($C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$) (Liu, Zhao, & Zhang, 2017)

Las propiedades fisicoquímicas más importantes se informan en la Tabla 2.

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de clorpirifos (Testai, Buratti, & Di Consiglio, 2010).

Nombre Químico	<i>O,O</i> -dietil- <i>O</i> -(3,5,6-tricloro-2-piridil)fosforotioato
Peso molecular	350.60 g mol ⁻¹
Fórmula Empírica y estructural	$C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$
Número CAS	2921-88-2
Estado	Sólido cristalino
Color	Blanco a bronceado
Olor	Mercaptano leve
Punto de fusión	41.5–42.5 °C
Punto de ebullición	>300 °C
Presión de vapor	3.35 mPa a 25 °C
Densidad	1.51 g mL ⁻¹ a 21 °C

Solubilidad media	Acetona >400 g L ⁻¹ a 20 °C
	Diclorometano >400 g L ⁻¹ a 20 °C
	Etil acetato >400 g L ⁻¹ a 20 °C
	Metanol 250 g en 100 mL a 20 °C
	Tolueno >400 g L ⁻¹ a 20 °C
	<i>n</i> -Hexano >400 g L ⁻¹ a 20 °C
	Agua 1.05 mg L ⁻¹ (p/v a 25 °C)
Coeficiente de partición (<i>n</i>-octanol y agua)	$K_{ow} = 50000$
Estabilidad	(a) En agua estéril tamponada
	pH 4.7 a 25 °C: vida media de 63 días
	pH 6.9 a 25 °C: vida media de 35 días
	pH 8.1 a 25 °C: vida media de 23 días
	(b) En solventes orgánicos.
	Sin signos de degradación en disolventes xileno aromáticos utilizados en formulaciones de CPF.

El Clorpirifos se degrada lentamente en el suelo en condiciones tanto aeróbicas como anaeróbicas. Tiene una vida media de 60-120 días, degradando a 3, 5,6-tricloro-2-piridinol (TCP) no tóxico, que posteriormente se degrada a compuestos organoclorados y dióxido de carbono. Puede producirse una deriva del rociado a las aguas superficiales, pero el CPF se disipa en sistemas de agua natural microbianamente activos con una vida media de menos de 1 semana y tiende a migrar a los sedimentos; por lo tanto, el riesgo de organismos acuáticos está limitado por la exposición de corta duración (Council, 2007). La concentración ambientalmente aceptable adoptada por la OMS es de 1 µg L⁻¹, incluso en el caso de aplicaciones múltiples.

2.3.3. Usos y efectos.

Los pesticidas organofosforados como el clorpirifos y el profenofos se usan ampliamente para proteger las diferentes frutas, cítricos, maíz, tabaco y vegetales (Bhushan, Bhardwaj y Misra, 2013) (Keehner y Shamim, 1999). El clorpirifos es un pesticida de amplio espectro que controla una gran variedad de plagas. El clorpirifos mata a los insectos al afectar el sistema nervioso, lo que inhibe la descomposición de la acetilcolina y la consiguiente acumulación de acetilcolina en la hendidura sináptica, ocasionando una sobre estimulación de las células neuronales. Produce neurotoxicidad y muerte (Eaton et al., 2008) (Zhang et al., 2013). El clorpirifos y profenofos se utilizan con frecuencia para controlar las plagas en la coliflor y el repollo. Estas verduras se usan comúnmente en ensaladas y comidas en la vida cotidiana.

2.4. Determinación de organofosforados en muestras de agua.

Los pesticidas son utilizados para mejorar la calidad y la cantidad de cultivos. Debido a su efecto peligroso sobre la salud humana, es esencial controlar el uso no deseado de pesticidas. Por lo tanto, es de suma importancia verificar el nivel de pesticidas en diferentes materiales alimenticios. Una serie de técnicas y métodos de muestreo específicos se utilizan para determinar el nivel de plaguicidas en las muestras de alimentos (Pabbi, Kaur, Mittal, & Jindal, 2017).

Los límites máximos de residuos, son la cantidad de un químico dado que queda en las muestras de alimentos y es diferente para cada plaguicida según su potencia. El uso regular o frecuente de plaguicidas organofosforados aumenta las posibilidades de que estos pesticidas se encuentren en vegetales que pueden entrar al cuerpo y dañar la salud humana (Devi y Raha, 2013) (Dasika, Tangirala, y Naishadham, 2012). Los procedimientos de análisis de múltiples residuos ahora se utilizan con mayor frecuencia para la estimación de plaguicidas en muestras debido a sus ventajas sobre los métodos convencionales (Paranthaman, Sudha y Kumaravel, 2012) (Brito et al., 2002).

Hay varias etapas en el procedimiento de determinación completa para muestras ambientales (ver Figura 3). Dichas muestras tienen una composición compleja y contienen diversos niveles de analitos diana, por lo que la preparación adecuada de las muestras para el análisis es crucial. Esto se logra, usando una gama de técnicas eficientes para extraer compuestos diana y para su limpieza antes de la determinación cuantitativa.

En respuesta a la Directiva de la UE sobre el nivel máximo permitido de plaguicidas individuales en el agua potable, es de $0.10 \mu\text{g dm}^{-3}$, se utilizan técnicas analíticas sensibles y selectivas, apropiadas para los bajos niveles de los analitos objetivo (European Commission, Directive of the European Union, 2010). Además, cada procedimiento analítico y sus diversos pasos deben validarse para garantizar la coherencia con las exigencias del procedimiento (Górecki & Namieśnik, 2002).

2.4.1. Recolección y preparación de muestras para análisis.

La etapa de preparación de la muestra y las operaciones realizadas durante la misma pueden afectar el resultado final. Las muestras ambientales comprenden materiales altamente diversos y complejos como consecuencia del sitio de muestreo, el tipo de matriz, la presencia de interferencias y el nivel de concentración del analito. Por lo tanto, esta etapa suele ser una tarea complicada, las operaciones y los procesos que implican pueden causar la pérdida de analitos y contaminación adicional.

Cuando se elige una muestra representativa para el análisis, su composición química debe asemejarse mucho a la composición promedio de la cantidad total de material a analizar. Si la muestra no es representativa, incluso el aparato más actualizado y complicado no puede proporcionar un resultado confiable (Bargańska, Ślebioda, & Namieśnik, 2013). Las muestras representativas se recogen utilizando instrumentos apropiados, cuyo tipo dependerá del tipo de muestra, el objetivo del análisis, el lugar, la frecuencia de muestreo y el tamaño de la muestra.

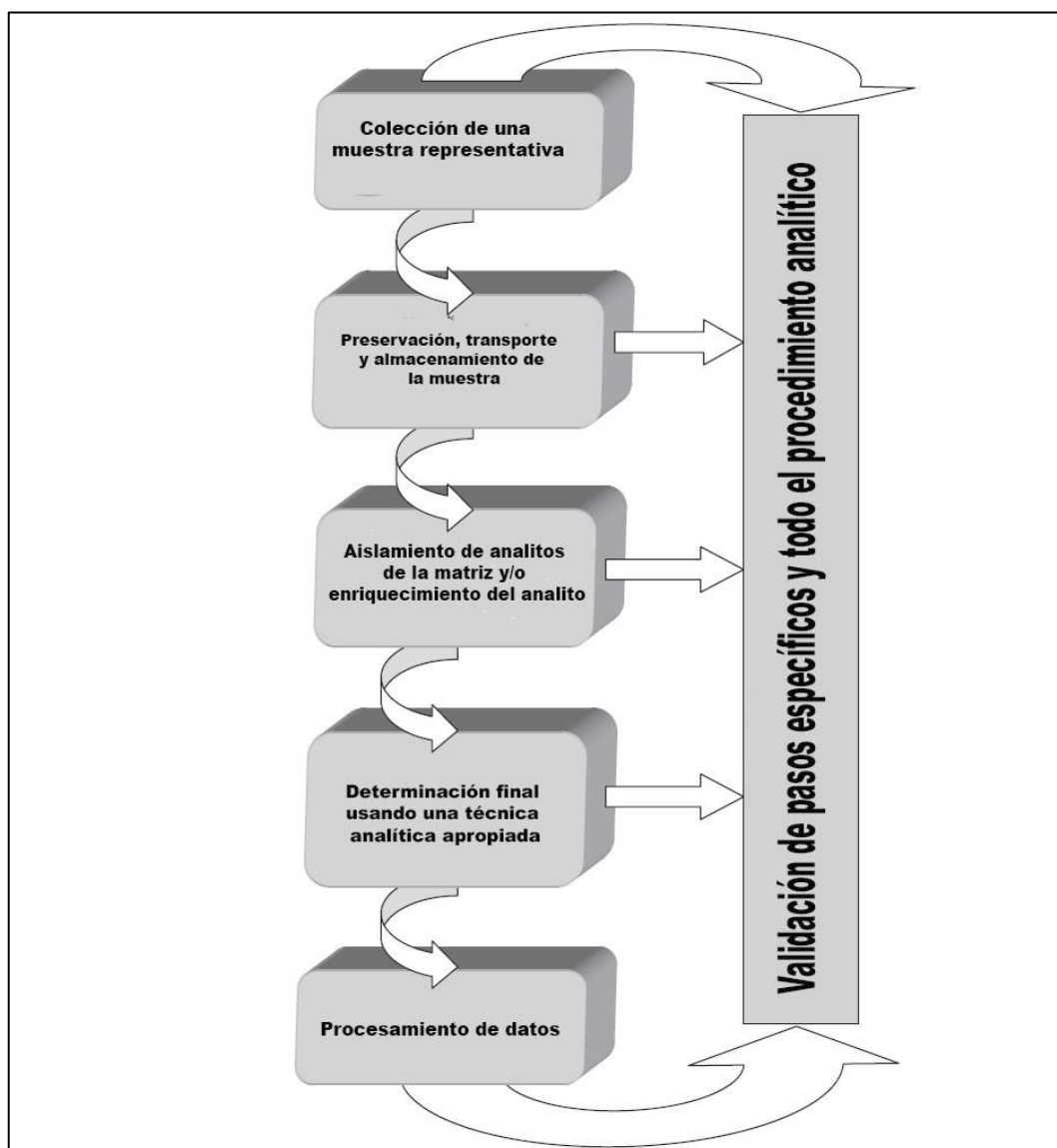


Figura 3. Etapas principales en el procedimiento analítico para determinar pesticidas organofosforados y organonitrogenados en muestras de agua (Kot, Zabiegała, & Namieśnik, 2000).

El agua generalmente se recolecta en botellas de vidrio oscuro y aguas superficiales o aguas residuales (efluentes) en diferentes contenedores (Bigus, Tobiszewski, & Namieśnik, 2014). La literatura está repleta de información sobre aislamiento de analitos y técnicas de enriquecimiento, y sobre métodos de

determinación final, que también rigen el tipo de información que puede proporcionar una muestra. Esto se debe a los bajos niveles de concentración de analitos y la complejidad de las matrices, cuyos componentes pueden causar más errores en etapas posteriores del análisis.

2.4.2. Técnicas para aislar y enriquecer los analitos.

Los niveles de plaguicidas en diferentes compartimentos del medio ambiente suelen ser bajos, por lo que es esencial no solo aislar todos los compuestos orgánicos de la matriz compleja, sino también enriquecerlos antes de la determinación final. Esto es necesario en vista de las imperfecciones de los métodos analíticos disponibles, ya que, en muchos casos, son insuficientemente sensibles para llevar a cabo la determinación final en la muestra original y para determinar los componentes trazas (Cairns y Sherma, 1992). Durante los pasos de extracción y enriquecimiento, los niveles de concentración del analito aumentan hasta el punto en que pueden determinarse. Al mismo tiempo, la transferencia de analitos desde la matriz primaria a una matriz secundaria elimina interferencias. Las técnicas que son apropiadas para el aislamiento y enriquecimiento de OPP a partir de muestras de agua depende estrictamente de sus propiedades (es decir, volatilidad, polaridad, estabilidad y solubilidad en agua y disolventes orgánicos). Las técnicas de extracción más habituales son la extracción líquido-líquido (ELL) y se basa en la división de analitos entre dos líquidos inmiscibles, habitualmente una solución acuosa y un disolvente orgánico.

Los disolventes normalmente utilizados para extraer los OPP incluyen diclorometano (Tahboub, Zaater, & Al-Talla, 2005) y mezclas de: éter de petróleo y diclorometano, cloruro de metileno y hexano (Fontana, Camargo, & Altamirano, 2010). Pero, aunque la ELL es relativamente simple y económica, tiene muchos inconvenientes, entre ellos la necesidad de usar grandes cantidades de solventes que a menudo son tóxicos. Con el fin de lograr el factor de enriquecimiento deseado, el exceso de solvente generalmente debe evaporarse, y la limpieza del extracto también suele ser necesaria.

La EPA de EE. UU. continúa recomendando la ELL para el análisis de OPP y ONP en muestras de agua. Con el fin de eliminar algunos de los inconvenientes que restringen la aplicación de la ELL, se han desarrollado numerosas modificaciones del proceso para reducir las cantidades de disolventes utilizados (Kot et al., 2000). La extracción de membranas puede reemplazar a la ELL, ya que con las membranas puede usarse con cantidades menores de solventes, incluso ninguna en absoluto. Esto elimina una serie de inconvenientes, incluido el problema de la formación de emulsiones. El factor de enriquecimiento del analito no se ve afectado, permaneciendo tan alto como en la ELL (Jönsson & Mathiasson, 2003).

2.4.3. Preparación de muestras para extracción líquido-líquido (ELL).

Para analizar los efectos de los pesticidas en el medio ambiente, es necesario concentrar los pesticidas de varias muestras ambientales. Por ejemplo, las aguas residuales que se originaron en la industria de producción de plaguicidas antes de ser liberadas a las corrientes de agua receptoras deben pre-tratarse y limpiarse de los pesticidas residuales. Diferentes los métodos de separación basados en la extracción se han aplicado para ambos propósitos.

La mayoría de los procedimientos de extracción aplicados convencionalmente se basan en la utilización de disolventes orgánicos que son altamente volátiles o semivolátiles a temperatura ambiente, inflamables y tóxicos. Además, los pesticidas polares han comenzado a aplicarse con frecuencia y reemplazando a los no polares y no pueden extraerse a un ritmo significativo utilizando disolventes orgánicos clásicos (Dimitrijević et al., 2017).

2.4.4. Condiciones de HPLC.

El HPLC moderna usa alta presión para facilitar el paso de la fase móvil y un analito a través de una columna cerrada llena de partículas del tamaño de micras, que constituyen la fase estacionaria. La instrumentación para HPLC se compone típicamente de nueve elementos básicos: fase móvil (reserva de solvente), sistema de suministro de disolvente, dispositivo de introducción de muestra, columna,

detector, sistema de colección, salida de datos, post-detector eluyente y tubos y accesorios de conexión. Todos los componentes son esencial para realizar HPLC.

La fase móvil, su depósito puede ser cualquier contenedor limpio e inerte. Por lo general contiene 0.5-2 L de solvente, y debe tener una tapa que permita una línea de entrada de tubería, que alimenta la fase móvil al sistema de suministro de solvente. Todos los solventes de la fase móvil deben estar recién filtrados y desgasificado (W. R. LaCourse, 2017).

El sistema de entrega de solvente, o bomba de alta presión puede operar de 500 a 20,000 psi. El propósito de la bomba es entregar un flujo de fase móvil exacto, preciso, reproducible y constante a la columna. Las tres principales clases de bombas HPLC se encuentran actualmente en uso: bombas de presión constante, bombas a base de jeringa o de desplazamiento, y bombas de flujo constante. Las bombas de presión constante y basadas en jeringas no se adaptan fácilmente a la entrega de disolvente en gradiente; por lo tanto, las bombas de flujo constante son mucho más comunes.

El dispositivo de introducción de muestra, en muchos casos, es el factor limitante en la precisión de un sistema de HPLC. El inyector de muestra, introduce la muestra en el sistema de HPLC sin despresurizarlo y la dirige hacia la columna. El método más utilizado de inyección de muestra se basa en un bucle que se puede colocar dentro y fuera de la ruta de flujo de fase móvil simplemente cambiando una válvula. Cuando la válvula está en la posición de carga, el circuito de muestra se llena a presión atmosférica. Los tamaños de bucle de muestra a menudo oscilan entre 5 y 500 μL . Para mejores resultados, un exceso de muestra (es decir, 2-5 veces el volumen de inyección) se enjuaga a través del circuito para asegurarse de que no quede rastro de la muestra anterior (M. E. LaCourse & LaCourse, 2017).

La columna es la parte del HPLC en la que ocurre la separación. Se construyen principalmente a partir de tubos de acero inoxidable resistentes a la alta presión de HPLC. La tecnología actual de columna a veces se construye a partir de vidrio de pared gruesa, titanio y plástico (por ejemplo, PEEK) para ofrecer al analista un mejor rendimiento. Están en el rango de 10-30 cm de largo y 4-10 mm

de diámetro. Los tamaños de partículas comunes de embalaje son de 3, 5 y 10 μm . Las columnas se degradan fácilmente por la adsorción irreversible de impurezas de muestras y solventes. Por lo tanto, una columna de guardia se usa a menudo para proteger la integridad de la columna analítica, que es mucho más costosa. Además, para analitos que pueden contener partículas, se puede colocar un filtro en línea entre el inyector y la columna de guardia.

Cuando el analito pasa por la columna, las propiedades químicas o físicas de este; se traducen a una señal eléctrica, y los solutos se controlan como eluidos de la columna. La señal eléctrica, puede ser amplificada y manipulada por los detectores HPLC (W. R. LaCourse, 2017).

Un dispositivo de recopilación y salida de datos (por ejemplo, computadora, integrador o grabadora) está conectado a la salida electrónica del detector. El dispositivo de recolección de datos toma la señal electrónica producida por el detector y genera un gráfico de respuesta frente al tiempo.

Después de que el eluyente pasa a través del detector, a menudo se dirige a un contenedor de desechos.

La tubería conectiva en el sistema de HPLC debe estar hecha de material inerte a solventes y constituyentes de la fase móvil. A menudo, la tubería está hecha de acero inoxidable o materiales basados en polímeros (M. E. LaCourse & LaCourse, 2017).

2.5. Biorremediación de lechos acuáticos.

Las técnicas convencionales utilizadas para la remediación de contaminantes orgánicos en el agua y suelo, como el vertido de residuos, la incineración a alta temperatura o la descomposición química pueden ser efectivas. Sin embargo, también están asociados con muchos inconvenientes tales como la complejidad y los altos costos, y algunos pueden presentar riesgos ambientales; en consecuencia, la aceptación del público suele ser baja. Existe un riesgo significativo en la excavación, manejo y transporte de materiales peligrosos, aparte del costo de remoción del suelo contaminado. Además, estas técnicas tradicionales no siempre

son suficientes y, por lo tanto, se necesitan enfoques de remediación alternativos, bajo costo y métodos sencillos para destruir completamente los plaguicidas, si es posible, o al menos para transformarlos en sustancias inocuas, reduciendo el riesgo tanto para el medio ambiente y salud humana. La biorremediación, es decir, el uso de organismos vivos para remediar sitios contaminados con plaguicidas, es una tecnología emergente (Chawla et al., 2013). La biorremediación de contaminantes incluye diferentes técnicas, como la biodegradación con microorganismos del suelo, la fitorremediación con plantas o la vermiremediación con lombrices. Una de las razones más importantes para utilizar la biorremediación para eliminar contaminantes orgánicos es que es una técnica rentable y respetuosa con el medio ambiente, y ofrece la posibilidad de destruir o inocular contaminantes orgánicos inofensivos mediante la actividad biológica natural. La biorremediación es bien aceptada por el público en general y a menudo puede llevarse a cabo en el sitio. Aunque cualquier procedimiento para eliminar o destruir contaminantes es costoso, los procedimientos biológicos tienden a ser más rentables (Bouwer & Zehnder, 1993).

2.5.1. Biorremediación por microorganismos.

Los principales agentes biológicos utilizados en la biorremediación son bacterias y hongos que utilizan los contaminantes como fuente de nutrientes o energía. La diversidad microbiana del sitio es uno de los parámetros más importantes para la biorremediación, junto con la naturaleza de los contaminantes y algunas propiedades del suelo (pH, contenido de humedad, estado nutricional, temperatura, potencial de oxidación-reducción) (Niti et al., 2013). La Tabla 3 muestra algunos resultados obtenidos mediante el uso de biodegradación por microorganismos para la remediación de suelos contaminados con pesticidas. En la biorremediación de suelos naturales, la microflora nativa existente en el suelo contaminado se usa para degradar los xenobióticos.

La biorremediación de suelos contaminados con plaguicidas ha despertado un gran interés de investigación, principalmente porque la contaminación por

plaguicidas aumenta constantemente y la mayoría de los productos químicos son persistentes en el medio ambiente. Sin embargo, en situaciones en las que las poblaciones microbianas no son lo suficientemente grandes o diversas como para degradar de manera eficiente los contaminantes objetivo, se lleva a cabo la inoculación de consorcios enriquecidos/aclimatados o cepas degradantes de contaminantes individuales; este procedimiento se llama bioaumentación. Lopes et al. (2012) evaluaron la capacidad potencial de atenuación natural o bioaumentación para degradar el molinato en un suelo agrícola, así como el impacto de estas tecnologías de biorremediación en la composición de la microbiota nativa. Se utilizó un consorcio de mineralización de molinato como inóculo en los ensayos de bioaumentación, y se observó una eliminación significativamente mayor de molinato en la bioaumentación que en un sistema de atenuación natural.

Las cepas pueden obtenerse de cepas autóctonas aisladas de la flora del sitio contaminado y seleccionarlas en condiciones de laboratorio de acuerdo con el contaminante (cultivos de enriquecimiento); después del crecimiento, los microorganismos se inoculan en el sitio en el área contaminada. Salunkhe et al. (2015) informan la biodegradación *in vitro* e *in vivo* de tres fungicidas de triazol por cepas aisladas de *Bacillus*. Chen et al. (2014) observaron que *Bacillus sp.* DG-02, previamente aislado de agua residual de fabricación de piretroides, era capaz de degradar la fenpropatrina y una amplia gama de piretroides sintéticos.

Dai et al. (2015) investigaron el potencial de biorremediación de un nuevo degradador para suelos contaminados con 2,4-D y su impacto de bioaumentación en la comunidad de suelos microbianos. Farhan et al. (2014) aislaron cepas microbianas de suelos agrícolas cultivados con algodón que fueron manejados con clorpirifos. Aunque la biodegradación microbiana de plaguicidas se ha estudiado principalmente con bacterias, también se han aislado y caracterizado diversas cepas fúngicas pertenecientes a diferentes géneros para su uso en la biodegradación de diferentes plaguicidas (Maqbool et al., 2016).

Peng et al. (2012) aislaron de un suelo contaminado una cepa fúngica (BP-H-02) capaz de degradar rápidamente el bensulfurón-metilo. Esta cepa podría

usarse para biorremediar la contaminación por herbicidas de sulfonilureas. La biodegradación de clorpirifos se estudió en medio mineral y suelo con la nueva cepa fúngica JAS1 aislada de un suelo de arrozal (Silambarasan y Abraham, 2013). Sin embargo, los enfoques moleculares para estudiar microorganismos para la biorremediación se han convertido en herramientas importantes para evaluar la posible atenuación natural y la necesidad de aplicar una técnica de biorremediación (Chakraborty and Das, 2016).

Por otro lado, la bioestimulación consiste en la adición de nutrientes apropiados (nitrógeno, fósforo, oligoelementos) para proporcionar a los microorganismos un entorno que favorezca el desarrollo de vías metabólicas para la biodegradación de contaminantes. (Qu, Xu, Ai, Liu, & Liu, 2015) Qu et al., estudiaron diferentes parámetros tales como las concentraciones de hidrocarburos y plaguicidas organoclorados (OCP), nutrientes y microorganismos tolerantes en un suelo agrícola para definir su viabilidad para la biorremediación. La disminución en la concentración de contaminantes y el aumento en la actividad microbiana indicaron que el uso de la bioestimulación de microorganismos nativos era factible en un suelo contaminado con hidrocarburos y pesticidas.

En un estudio similar, Ortiz et al. (2013) demostraron que la estimulación de la flora microbiana del suelo mediante la adición de pequeñas cantidades de fuentes secundarias de carbono mejora la biodegradación/mineralización del DDT y sus principales metabolitos. Chen et al. (2016) exploraron los mecanismos de bioestimulación con un donador de electrones para acelerar la degradación del pentaclorofenol (PCP) en suelos ricos en hierro (M. Chen et al., 2016). La bioestimulación de las comunidades microbianas nativas de suelos mediante la adición de lactato y antraquinona-2,6-disulfonato aumentó las tasas de dechloración de pentaclorofenol. Silva et al. (2009) desarrollaron un enfoque de bioaumentación y bioestimulación conjunta para la limpieza de suelos contaminados con altas concentraciones del herbicida atrazina. *Pseudomonas sp.* se usó para bioaumentación y citrato y succinato para la bioestimulación. También concluyeron que el suelo estudiado tenía potencial autóctono para la mineralización de atrazina,

pero que una tasa de mineralización significativa solo tuvo lugar después de una fase de aclimatación (Silva et al., 2009).

Como se mencionó anteriormente, la biodisponibilidad de pesticidas y otros contaminantes orgánicos es una limitación importante para completar la biorremediación de suelos contaminados (EPA, 1999). Afecta el tiempo de limpieza, el costo y el punto final del proceso. Desde el punto de vista de la biodegradación, la biodisponibilidad se definió como la accesibilidad de un químico para su asimilación por microorganismos (Alexander, 1995). El término "bioaccesibilidad" abarca lo que está inmediatamente disponible más aquello que puede estar disponible, mientras que la biodisponibilidad se refiere a lo que está disponible inmediatamente.

En este sentido, se han publicado una serie de evaluaciones de riesgo de suelos contaminantes basadas en estudios de bioaccesibilidad. Para este propósito, se han usado extracciones no exhaustivas para determinar la fracción bioaccesible del contaminante después de diferentes períodos de degeneración.

Recientemente, Villaverde et al. (2012) utilizaron diferentes técnicas de extracción no exhaustivas para determinar si sus capacidades de extracción se correlacionaban con la fracción de diurón bioaccesible en un suelo contaminado. La bioaccesibilidad de diurón se evaluó a través de correlaciones entre el diurón biodegradado después de diferentes períodos (diuron biodegrader microbial consortium) y el diurón extraído por biomimética utilizando una solución 50 mM de hidroxipropil- β -ciclodextrina (HPBCD), 10 mM CaCl_2 , hexano o butanol. Los autores concluyeron que la técnica de extracción acuosa de HPBCD tiene el potencial de convertirse en una herramienta valiosa para estimar la fracción bioaccesible del diurón asociado al suelo en diferentes tiempos de envejecimiento, y esto podría ser aplicable en la evaluación de riesgo y potencial de biorremediación de tierras contaminadas.

Nagy et al. (2013) investigaron métodos confiables para evaluar la microflora del suelo y su actividad como un prerrequisito para la planificación exitosa de la tecnología y la biorremediación sostenible de diferentes sitios contaminados. Las

concentraciones de contaminantes se midieron usando una extracción dura y una extracción biomimética usando una solución de ciclodextrina.

La mayoría de los métodos biológicos y químicos aplicados fueron indicadores confiables de la biodegradación del clorofenol en el suelo. Baczynski et al. (2012) obtuvieron los resultados de la cinética de desorción utilizando la extracción en fase sólida de Tenax (SPE) como predictores después de 3 semanas de efectividad de la biodegradación del suelo anaeróbica para los plaguicidas clorados, gamma-HCH, DDT y metoxicloro. Fenlon et al. (2011) realizaron un estudio sobre la formación de residuos ligados y la mineralización del insecticida cipermetrina en cuatro suelos gestionados orgánicamente. Los potenciales residuos unidos formados se midieron usando tres extracciones no exhaustivas diferentes que emplean soluciones de CaCl_2 0,01 M y HPBCD 0,05 M y disolvente de acetonitrilo; la biodegradación se evaluó mediante bioensayos de mineralización de cipermetrina. La evaluación de la formación de residuos ligados varió de acuerdo con la extracción probada, el tipo de suelo y el período de envejecimiento. Por otro lado, los surfactantes pueden usarse como promotores de biorremediación acelerando la mineralización de plaguicidas a través del aumento de la cantidad del contaminante presente en la solución del suelo. Singh et al. (2016) utilizaron un biosurfactante de ramnolípido, que mejoró la solubilidad en fase acuosa del clorpirifos de 2 a 15 veces.

Singh y Cameotra (2014), estudiaron el efecto de diferentes surfactantes (ramnolípidos y tritón X-100) sobre la biodegradación del herbicida atrazina por una cepa degradadora A6, perteneciente al género *Acinetobacter*. La hidrofobicidad de la superficie de las células bacterianas y la solubilidad de atrazina aumentaron en presencia de tensioactivo. Villaverde et al. (2012) desarrollaron una tecnología de biorremediación basada en ciclodextrina que mostró por primera vez una mineralización de diurón casi completa en el suelo, utilizando un consorcio de biodegradadores de diurón. Ye et al. (2014) realizaron un estudio para investigar el potencial de biodegradación anaeróbica de la bioestimulación por nitrato (KNO_3) y la aplicación de metil- β -ciclodextrina en un suelo de arroz contaminado con

plaguicidas organoclorados. Gao et al. (2015) llevaron a cabo un estudio para verificar la viabilidad de la extracción biomimética de HPBCD para evaluar la biodisponibilidad del DDT y sus metabolitos en los suelos. El efecto de HPBCD en su biodegradación en diferentes suelos también fue investigado. Sin embargo, HPBCD afectó negativamente a la biodegradación del suelo con DDT cuando se aplicó como un bioestimulante. El uso de procesos microbianos se ha utilizado ampliamente para la eliminación de los productos químicos de los efluentes domésticos o industriales como sistemas de tratamiento de desechos. Sin embargo, muchos compuestos no siempre están completamente degradados, no necesariamente debido a la ausencia de una microflora biodegradativa, sino más bien porque la técnica no se ha optimizado, lo que resalta la necesidad de técnicas de biorremediación nuevas o modificadas. Se han desarrollado varios métodos novedosos y prometedores, donde la bioestimulación combinada con la bioaumentación y la mejora de la biodisponibilidad han dado excelentes resultados. Los tratamientos in situ, en los que no se elimina el suelo de la tierra contaminada, tienen varias ventajas, como los costos relativamente bajos, pero la desventaja de un control riguroso disminuido.

2.5.2. Las microalgas.

Las algas son un gran grupo de organismos autótrofos que incluyen alrededor de 30000 especies, que van desde unicelulares (microalgas) para los organismos multicelulares más complejos (macroalgas).

Las algas son organismos fotosintéticos y son capaces de transformar la energía luminosa en energía química de una manera similar a las plantas superiores. Sin embargo, crecen comparativamente más rápido, especialmente las microalgas, que fijan CO₂ de 10-50 veces más rápido que en las plantas (Subashchandrabose, Ramakrishnan, Megharaj, Venkateswarlu, & Naidu, 2013). Cuando se compara con las plantas, las microalgas tienen una estructura celular más sencilla y también son a menudo rodeadas por el fluido, lo que facilita la absorción de agua y nutrientes.

Las microalgas (y cianobacterias) son muy adaptables y muchas especies pueden crecer, heterotróficamente y mixotróficamente. Las condiciones ambientales tales como la luz baja y/o la deficiencia de nutrientes han sido reportados para fomentar mixotrofia (Subashchandrabose et al., 2013). La mixotrofia se define como la capacidad de usar la luz y carbono orgánico al mismo tiempo como fuentes de energía. Esto proporciona a las microalgas una ventaja sustancial competitiva sobre los hongos y bacterias en cuanto a degradación de contaminantes orgánicos (Subashchandrabose et al., 2013).

Las algas taxonómicamente se dividen de acuerdo a sus pigmentos, compuestos de almacenamiento y la principalmente a compuestos presentes en su pared celular. Las clases principales son Chlorophyta (algas verdes), Rhodophyta (algas rojas), Phaeophyta (algas pardas), Euglenophyta, Pyrrophyta y Chrysophyta. *Chlorella vulgaris*, una microalga muy común en ambientes acuáticos pertenece a las Chlorophytas, que incluye microalgas y algas multicelulares. Son similares a las plantas terrestres ya que poseen clorofila a y b y algunos carotenoides, su pared celular está hecho de celulosa y sus principales productos de almacenamiento son almidón.

A finales de 1950, el mundo occidental se interesó en el cultivo de microalgas debido a su alto contenido de proteínas, lo que podría proporcionar una fuente de alimento potencial para apoyar el crecimiento rápido de la población. Otras áreas de aplicación de las microalgas que desde entonces se han investigado son agrícolas, combustibles y productos farmacéuticos (Huntley et al., 2015). También es una tecnología bien establecida el uso de microalgas para la remediación de nutrientes (nitrógeno y fósforo) de las aguas residuales. La reducción de los nutrientes en las aguas residuales es debida a la absorción y asimilación, de las algas. Además, los nutrientes también pueden reducirse por procesos tales como la precipitación (fósforo) y volatilización (amoníaco), debido a pHs altos inducidos por las algas (Hammouda, Gaber, & Abdelraouf, 1995).

2.5.3. El uso de microalgas para la remediación.

Como se mencionó anteriormente, la métodos físico-químicos para la eliminación de metales de las aguas residuales son caros y también ineficaces cuando los metales se encuentran en concentraciones bajas (Mehta y Gaur, 2005) por lo que los métodos biológicos son de principal interés. Las microalgas tienen ciertas ventajas para los procesos biorremediación de aguas. Son eficientes en la absorción de los excesos de nitrógeno y fósforo de aguas residuales debido a su tasa de crecimiento rápido y tiene un buen potencial para la eliminación del CO₂ de centrales térmicas de carbón (Zeiler et al., 1995).

Las algas pueden absorber y eliminar los contaminantes orgánicos tanto a través de biosorción y/o metabolización (Priyadarshani et al., 2011). También las interacciones entre algas y bacterias afectan la biodegradación de pesticidas (Ghasemi et al., 2011).

Tabla 3. Biosorción de pesticidas y compuestos relacionados por microalgas (adaptado de Priyadarshani et al., 2011).

Microalga	Pesticidas
<i>Chlamydomonas sp.</i>	Lindano, naftaleno, fenol
<i>Chlorella sp.</i>	Lindano, clordimeform
<i>Dunaliella sp.</i>	DDT, naftaleno
<i>Euglena gracilis</i>	Fenol
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Naftaleno
<i>Selenastrum capricornutum</i>	Benzopirenos

Biosorción de pesticidas por microalgas.

La biosorción implica un número de procesos fisicoquímicos y metabólicos independientes que incluyen absorción, adsorción, complejación superficial, intercambio iónico y precipitación.

La biosorción sucede al instante y se compone de procesos pasivos que tienen lugar en la pared celular tanto en células vivas y muertas (sus productos excretados y derivados). La mayoría de los estudios de biosorción se han llevado a cabo en los sistemas microbianos tales como hongos, bacterias y microalgas, sin embargo otro material biológico puede ser utilizado para biosorción como la biomasa vegetal (corteza, hojas, aserrín), biomasa animal (crustáceos, cabello), algas marinas (macroalgas), lodos orgánicos residuales, y varios tipos de material de desecho y productos biológicos. La mayoría de la investigación se ha centrado en la biosorción de metales tóxicos, por ejemplo, mercurio, plomo, cadmio, cobre, arsénico, cromo, así como radionucleidos, tales como uranio, cobalto, estroncio, torio, etc. Sin embargo, el término "biosorción" ahora, además, se aplica sobre las partículas y todo tipo de sustancias orgánicas (Gadd, 2009).

Las algas se consideran muy eficiente para biosorción de metales pesados que se encuentran en agua (Rodrigues et al., 2012). Las paredes celulares de algas están rodeadas por una red tridimensional de macromoléculas (polisacáridos y proteínas). Estos llevan grupos funcionales cargados negativamente, tales como grupos carboxilo, hidroxilo, fosfato o amina. Puesto que los iones metálicos en solución de agua generalmente son en forma catiónica, que se adsorben a las paredes celulares de algas. La biosorción de metales de algas es dependiente del pH y en general, las condiciones ácidas de pH 3 a 5 son las más favorables para la sorción de iones metálicos (Mehta y Gaur, 2005).

El uso de la biomasa muerta por biosorción tiene algunas ventajas notables sobre el uso de células vivas y, de hecho algunos estudios han demostrado que la biosorción de metales pesados fue varias veces mayor en las células muertas en comparación a células vivas (Tsang et al., 1999). Además, obviamente no hay riesgo de dañar las células lo que les permite estar expuestos a contaminantes con alta toxicidad y que no requieren adición de otros nutrientes. La biomasa muerta tiene también la capacidad de ser reciclada (Aksu y Dönmez, 2006).

Los iones metálicos unidos a la pared celular de algas pueden ser eliminados por el lavado de la biomasa después de cada ciclo con agentes de desorción (HCL,

NaOH, CaCl_2) y agua desionizada (Chen et al., 2012). Sin embargo, hay que señalar que los procesos metabólicos en las células vivas puede contribuir al proceso de eliminación total (Gadd, 2009).

Las algas son además capaces de biosorber compuestos orgánicos y tienen una afinidad por compuestos hidrófobos no polares (Casserly et al., 1983). Ejemplos de estudios sobre biosorción orgánica incluyen compuestos como los colorantes reactivos y el biocida antiincrustante utilizado en pintura, tributilestaño (Tam, Chong, & Wong, 2002).

Los plaguicidas que han sido retirados por algas y los estudios de biosorción adicionales sobre plaguicidas incluyen aldrín, dieldrina, endrina, lindano, clordano y carbaril (Klekner y Kosaric, 1992).

Friesen-Pankratz et al., (2003) evaluó la eliminación de la atrazina herbicida y el insecticida lindano utilizando el alga verde *Selenastrum capricornutum* durante 11 días de tratamiento. Sus resultados mostraron que la presencia de las algas disminuyó la persistencia acuosa de ambos plaguicidas y por lo tanto especularon si las algas biosorben los plaguicidas para facilitar su degradación. Había menos lindano en la fase acuosa después de 11 días en comparación con la atrazina. Esto posiblemente se puede explicar porque el lindano tiene un mayor potencial de sorción ($\log K_{ow}$ 3.72) en comparación con la atrazina ($\log K_{ow}$ 2,34). Sin embargo, el lindano tiene una presión de vapor superior a la atrazina y son, por tanto, es más propenso a la volatilización de la fase acuosa (Friesen-Pankratz, Doebel, Farenhorst, & Goldsborough, 2003).

Metabolización de los plaguicidas por algas.

Los microorganismos pueden utilizar una amplia gama de contaminantes orgánicos, incluyendo los pesticidas, como fuente de energía para su crecimiento y al mismo tiempo desintoxicar y mineralizar los compuestos. Otro modo de degradación es cuando los microorganismos producen enzimas que rompen los enlaces en las moléculas de plaguicidas (Larsson, Järnmark, & Södergren, 1992). Existen desventajas con la metabolización de algunos pesticidas que son

extremadamente difícil de romper y algunos productos de degradación de los mismos pueden ser peligrosos (Gadd, 2009).

Muchos microorganismos pueden metabolizar los compuestos orgánicos de una manera similar a los mamíferos, aves, peces y algunas plantas. Esto depende en gran parte de la superfamilia de citocromo P450 de enzimas monooxigenasa (Schocken et al., 1997). El citocromo P450 se encuentra universalmente en animales y en las plantas superiores, pero por otra parte se encuentran en bacterias, hongos, virus y protistas y se han detectado en el filo de algas Chlorophyta (algas verdes), Rhodophyta (algas rojas) y Chromophyta. El uso de diferentes vías de estas enzimas oxidan sustratos endógenos tales como dieciséis lípidos, hormonas esteroides, así como sustancias xenobióticas tales como pesticidas y, en particular herbicidas (Pflugmacher y Sandermann, 1998).

Participación de P450 en la biotransformación de compuestos extraños ha sido registrado en la microalga *Chlorella sp.* y la actividad P450 se ha documentado en *C. fusca* y *C. sorokiniana* en presencia del pro-herbicida metflurazon (Thies et al., 1996).

Otros estudios sobre la metabolización de pesticidas y compuestos relacionados que utilizan las algas verdes se han llevado a cabo sobre los plaguicidas organofosforados tales como el metil paratión, paratión, malatión, forato, quinalfos y monocrotofos (Megharaj et al., 1994). Además, se ha sabido desde 1980 que las algas eucariotas y cianobacterias pueden metabolizar los HAP. Las algas verde, rojo y marrón; y cianobacterias podrían oxidar naftaleno (el ingrediente principal de las bolas de naftalina) bajo condiciones fotoautotrópicas, como la alga verde *Selenastrum capricornutum* pudo metabolizar benzopireno (Warshawsky, Keenan, Reilman, Cody, & Radike, 1990).

Otros informes de plaguicidas que han sido metabolizados por microalgas verdes son la degradación de lindano, fenol, Clordimeformo, DDT (Tabla 3) (Priyadarshani et al., 2011). Hasta ahora, pocos estudios han demostrado de compuestos orgánicos con alto peso molecular, de hecho, parece que las algas son capaces de metabolizar los compuestos con bajo peso molecular, tales como

hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) más pequeños; hidroxilaciones de naftaleno (una HAP de dos anillos, 128 g mol^{-1}) y fenantreno (una de tres anillos HAP, 178 g mol^{-1}) se ha demostrado (Ghasemi et al, 2011).

Como se ha mencionado, el consorcio microbiano afecta la biodegradación de pesticidas. Esto incluye cuántos microorganismos están presentes, el contacto entre microorganismos y sustrato; y las condiciones ambientales que les rodean (en particular, el pH, temperatura, salinidad, nutrientes, calidad e intensidad de luz, agua disponible, tensión de oxígeno, potencial redox, superficie de unión y la presencia de sustratos de carbono alternativas). Un aspecto importante de la degradación de los compuestos orgánicos por algas es la interacción con las bacterias. Ellas pueden actuar como socios de degradación, donde las algas a través de la fotosíntesis proporcionan O_2 para las bacterias y consiguen el CO_2 liberado de las bacterias heterótrofas. Esta combinación sinérgica puede mejorar el potencial de degradación de todo el consorcio (Ghasemi et al., 2011). Las bacterias suelen estar presentes en cultivos de algas, incluso si no se añaden intencionalmente. Por lo tanto, debe considerarse la influencia de bacterias en los estudios de degradación de compuestos orgánicos a base de algas.

2.6. La microalga *Chlorella vulgaris*.

La microalga *Chlorella vulgaris* es un género de microalgas verde unicelular que ha atraído un gran interés científico y comercial. El género *Chlorella* fue descrito por primera vez por Beijerinck en 1890, siendo *Chlorella vulgaris* la especie tipo. A partir de entonces, se aisló y caracterizó un gran número de especies de *Chlorella*. Las células de *Chlorella vulgaris* son esféricas o elipsoidales con un tamaño que varía de 2 a $10 \mu\text{m}$ de diámetro. Se distribuyen en diversos hábitats, como el agua dulce, el agua de mar y el suelo, y son de vida libre o simbiótica con líquenes y protozoos. *Chlorella vulgaris* se reproduce a sí misma a través de la producción de autosporas asexuales. El proceso involucra tres fases: crecimiento (aumento del tamaño celular), maduración (cantidades crecientes de sustancias nucleares para la mitosis) y división (división de la célula madre en células hijas)

(Hase, Morimura, & Tamiya, 1957). La ruptura de la pared celular madre libera simultáneamente 2-16 autosporas.

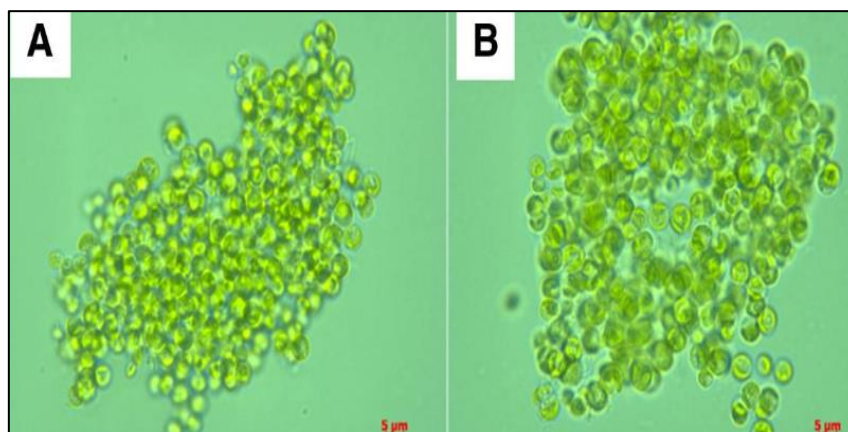


Figura 4. Imagen de células de la microalgas *Chlorella vulgaris* (Pereira et al., 2014).

El éxito del cultivo masivo de *Chlorella vulgaris* ha traído una industria estable principalmente para la nutrición humana y la alimentación animal. La capacidad de *Chlorella vulgaris* de captar y asimilar rápidamente el dióxido de carbono y los nutrientes (por ejemplo, nitrógeno y fósforo) de las corrientes de desechos (por ejemplo, gases de combustión y aguas residuales) y sintetizar grandes cantidades de lípidos también la convierte en un candidato para biocombustibles y biorremediación. Sin embargo, los actuales sistemas y procesos de producción de *Chlorella vulgaris* no son rentables ni energéticamente eficientes, por lo que estas aplicaciones potenciales son poco realistas. Se buscan avances e innovaciones en el desarrollo de tecnologías de próxima generación para la producción de *Chlorella vulgaris* (Krienitz, Huss, & Bock, 2015).

Chlorella vulgaris vive tanto en hábitats acuáticos como terrestres. Debido a su ciclo de vida simple, alto potencial de crecimiento y maquinaria fotosintética y vías metabólicas similares a las plantas superiores, *Chlorella vulgaris* se ha utilizado durante mucho tiempo como un organismo modelo para comprender la

fotosíntesis y la asimilación de carbono en plantas superiores. Presenta un alto contenido de proteínas (hasta 70% del peso seco de las células) además de ser rico en minerales, vitaminas y carotenoides también ha convertido a *Chlorella vulgaris* en un sustituto nutricional ideal para humanos y animales. Hasta la fecha, *Chlorella* se produce como comida sana y como alimento para animales en Alemania, Japón, China y otros países asiáticos. *Chlorella vulgaris* también posee la capacidad de sintetizar grandes cantidades (hasta 50% de peso seco) de lípidos neutros de almacenamiento principalmente en forma de triacilglicerol (TAG) en condiciones de estrés (p. Ej., Alta deficiencia de luz o nitrógeno), convirtiéndolo en un candidato prometedor organismo para biocombustibles a base de lípidos. El posible acoplamiento de la producción de biocombustibles con la biorremediación de aguas residuales y la captura de carbono de centrales eléctricas alimentadas con combustibles fósiles u otras fuentes puntuales grandes puede compensar el costo de la producción de biocombustibles y proporcionar importantes beneficios ambientales (Nakanishi & Deuchi, 2014).

2.6.1. Requerimientos para el crecimiento de *Chlorella vulgaris*.

Chlorella vulgaris se desarrolla bien en un medio estrictamente inorgánico. Los nutrientes inciden en la velocidad de crecimiento y en la composición bioquímica de las células en cultivo. A veces se requieren bajas concentraciones de vitaminas, sobre todo tiamina, biotina y B₁₂ (Sadeghizadeh, Farhad dad, Moghaddasi, & Rahimi, 2017).

Los principales nutrientes requeridos para su crecimiento son:

Carbono

Es el macronutriente más importante, constituye el 50% de la biomasa microalgal. Todas las especies de *Chlorella vulgaris* son fotoautótrofos estrictos y requieren carbono inorgánico para vivir, pudiendo utilizar como fuente tanto CO₂ como bicarbonato. El aporte de carbono inorgánico es el más limitante de los nutrientes, ya que cuanto mayor es la salinidad del medio de cultivo y mayor es la temperatura, menor es la solubilidad del C inorgánico.

El CO₂ se suministra generalmente mezclado con aire, produciendo un burbujeo que sirve también de agitación. Se producen pérdidas a la atmósfera, sobre todo en estanque donde, debido a la poca profundidad de los recipientes las burbujas no permanecen en fase líquida el tiempo suficiente para que el CO se disuelva.

Nitrógeno

El nitrógeno es un nutriente básico en el cultivo de *C. vulgaris*, por dos razones: Es esencial para su crecimiento y tiene una estrecha relación con la capacidad de sintetizar lípidos. *C. vulgaris* puede utilizar nitrato, nitrito, amonio o urea como fuente de nitrógeno para su crecimiento siendo la preferente para los cultivos masivos el nitrato ya que el amonio es tóxico a concentraciones superiores a 5μMolar y pH superior a 8, y la urea es un suministro adicional de carbono inorgánico que estimula el crecimiento de organismos heterótrofos y aumenta el contenido de amonio en el medio.

El NO₃Na es el más eficientemente usado por el alga para su desarrollo, con tasas máximas de crecimiento a concentraciones cercanas a 5 μMolar. Distintos resultados muestran que se produce gran variabilidad tanto en el crecimiento como en la composición bioquímica debido a las variaciones en concentración de nitrógeno. Cuando el nitrógeno se agota o deja de suministrarse, el crecimiento cesa, ya que no se almacena en el interior celular (Sánchez-Varo, 1995).

Fósforo

El Crecimiento es óptimo a concentraciones de fosfato inorgánico inferiores a 0.1 μMolar. *Chlorella vulgaris* puede acumularlo intracelularmente hasta concentraciones de 0.5 Molar, así en un medio sin fósforo puede utilizar reservas durante varios ciclos de división. Hay que mantener baja la concentración de este elemento ya que la presencia conjunta de Calcio y Fosfato en el cultivo provoca la precipitación de fosfato cálcico a pH > 8 y la floculación de las algas, disminuyendo su crecimiento (Sánchez-Varo, 1995).

Sulfatos

El máximo crecimiento a 2 μMolar, cuando es limitante la división celular se detiene, aumenta el tamaño de las células y se estimula la acumulación de lípidos.

Está en el agua dulce natural a una concentración de 30 μMolar y en el agua corriente por lo que no es necesario añadirlo. A muy altas concentraciones y en presencia de Calcio puede precipitar y reducir el crecimiento del alga (Sánchez-Varo, 1995).

Magnesio

Se requiere una concentración de 1 μMolar . *C. vulgaris* puede acumularlo en su interior hasta 300 μMolar . Está presente en el agua corriente a una concentración próxima a 50 μMolar . A $\text{pH} > 9$ precipita como hidróxido o carbonato de Magnesio (Sánchez-Varo, 1995).

Otros nutrientes

- Potasio (1 μMolar para crecimiento óptimo.) No hay que añadirlo si se usa agua natural (10 μMolar).
- Calcio (concentración óptima es 0.1 μMolar); a pH superiores a 8 puede precipitar en forma de distintas sales.
- FeCl_3 en forma de complejo quelado con EDTA a 1 μMolar .
- Los micronutrientes son requeridos a bajas concentraciones y en exceso resultan tóxicos: Mn, Zn, Co y Cu a concentración μMolar (5, 1, 0.1 y 0.01 respectivamente). No hay que añadirlos en medio de cultivo con agua natural.

pH y Temperatura

C. vulgaris tolera entre 5.5-8, siendo 6.8 el pH óptimo de su crecimiento. Respecto a la temperatura, presenta amplia tolerancia, siendo la óptima de 20 a 30 $^{\circ}\text{C}$. *Chlorella vulgaris* es viable a 3 $^{\circ}\text{C}$ y su movilidad cesa a -18 $^{\circ}\text{C}$, permaneciendo fotosintéticamente activa por debajo de -8 $^{\circ}\text{C}$ (Sánchez-Varo, 1995).

Incidencia del Oxígeno y luz

Las microalgas son sensibles a la concentración de oxígeno en el medio, y los niveles de O_2 en los fotobiorreactores pueden dar lugar a efectos inhibitorios en el crecimiento del alga.

La intensidad de luz es importante para el crecimiento de alga. Una luz de baja o media intensidad da lugar a tasas de crecimiento menores que aquella de intensidad alta. Sin embargo, existe un nivel de luz saturante para el crecimiento de *C. vulgaris* que probablemente se encuentra en el rango de 200 a 400 $\mu\text{W m}^{-2}$ según estudios recientes.

Además parece existir una relación entre el efecto inhibitorio del oxígeno e intensidad de la luz, de manera que concentraciones altas de oxígeno se vuelven más inhibitorias a medida que la intensidad de luz aumenta (Sánchez-Varo, 1995).

Agitación

La agitación de la suspensión celular es uno de los requerimientos más importantes en el cultivo masivo de algas, ya que incide fuertemente sobre la tasa de productividad. La agitación produce el movimiento del agua lo cual implica una serie de efectos positivos:

- Distribución homogénea de los nutrientes dentro del cultivo, evitándose la formación de gradientes nutricionales alrededor de las células durante periodos metabólicos activos, que afectarían a su crecimiento y por tanto a la productividad del proceso.
- Prevención de la estratificación térmica: en estanques con mala agitación puede existir hasta 8 °C de diferencia entre la temperatura de la superficie del tanque y el fondo.
- Evita que las células sedimenten o precipiten en el fondo del estanque. Si la velocidad de mezclado es demasiado lenta las algas muertas y otros restos celulares se depositan en el fondo, creando zonas de estancamiento que llevarán a la formación de regiones anaerobias que tendrán un efecto nocivo sobre las células y además reducirán la cantidad y calidad de la biomasa producida. En ocasiones se pueden formar compuestos tóxicos a partir de la descomposición del material orgánico causando la pérdida de todo el cultivo. Además ésta biomasa deteriorada en el fondo fomentará la aparición de microorganismos heterótrofos como bacterias, es decir, contaminación.

2.7. *Anabaena azollae*.

Es una microalga verde-azulada perteneciente al grupo de las Cianofitas, dentro del grupo de algas filamentosas como en los géneros *Nostoc*, *Cylindrospermum* y *Anabaena*. Conocidas también como cianobacterias, estas tienen una amplia distribución y ocupan un gran rango de hábitas al igual que las bacterias, que incluyen suelo y agua, tanto en regiones tropicales y templadas como de climas externos. Según Kohlhase (1988), *Anabaena* se encuentra principalmente como colonias filamentosas que flotan libremente en lagos, estanques y charcas semipermanentes (Kohlhase & Pohl, 1988). Una especie habita las raíces aéreas de algunas cícadas donde también existen bacterias fijadoras de nitrógeno. La asociación simbiótica entre *Azolla* y la cianobacteria filamentosa *Anabaena* por su alta capacidad fijadora de nitrógeno ha adquirido en los últimos tiempos mucha importancia para la agricultura. *Azolla* es un helecho acuático que alberga en las cavidades en la base de la fronda una cianobacteria del género *Anabaena*. (Montaño, 2005).

Esta simbiosis es permanente y hereditaria y cuya relación mutualista es la única conocida en la naturaleza entre una pteridofita y una procariota diazotrófica.



Figura 5. Imagen de *Anabaena azollae* (Qiu & Yu, 2003).

La reproducción de la *Anabaena* puede ocurrir por la fragmentación de los tricomas de forma aleatoria. Otra característica de la *Anabaena* es la presencia de heterocistos los cuales se desarrollan a partir de células vegetativas y pueden encontrarse en hilera, en pares o solos (Figura 5). Poseen una pared celular ancha, con muchas capas y son aparentemente herméticos.

Los heterocistos sintetizan la enzima nitrogenasa, la cual permite la fijación del nitrógeno atmosférico o disuelto en agua (N_2) bajo condiciones anaeróbicas, el cual se mantiene dentro del heterocisto. La forma y la ubicación de los heterocistos en el tricoma está aparentemente, determinada genéticamente; pero la frecuencia en los tricomas dentro de la población depende del suplemento de nitrógeno en el medio ambiente, el cual disminuye con elevados niveles de NH_4^+ NO_3^- (Rai, Sharma, & Rai, 2006).

Otra célula diferenciada a partir de las células vegetativas son los acinetos. Los acinetos son células en descanso que se desarrollan de células individuales o después de la fusión de dos o más células vecinas. Generalmente surgen cerca del final del periodo del crecimiento vegetativo, aunque su producción no es obligatoria. Su morfología, tamaño, posición dentro del tricoma, características de la pared celular y modo de germinación aparentemente están determinados genéticamente y han sido utilizados como caracteres críticos para distinguir el género y especie (R. P. Singh & Singh, 1989).

En algunas especies dentro del género *Anabaena*, *Aphanizomenon* y *Anabaenopsis* los acinetos se desarrollan en una configuración definida de hasta cinco en una hilera. Los acinetos pueden aparecer unidos directamente al heterocisto o pueden estar distantes a él, separados ya sea por una o muchas células vegetativas. Cuando maduran pueden ser más largas que las células vegetativas (Wehr & Sheath, 2015). Los acinetos en *Anabaena* se presentan con frecuencia junto a los heterocistos. Según Espardellier (1978) la presencia de heterocistos no es esencial para la formación de acinetos, sin embargo ellos imponen el arreglo espacial de los acinetos a lo largo del filamento (Figura 5) (Joset-Espardellier, Astier, Evans, & Carr, 1978). Generalmente se los encuentra formando blooms en

agua dulce, varias especies suelen ser encontradas en el suelo y otras en agua salada. Muchas veces estos blooms pueden ser tóxicos ya que ciertas especies de *Anabaena* como la *Anabaena flos-aquae* produce anatoxinas, veneno neuromuscular convirtiéndose así en un peligro para animales de granja (Brett et al., 1999).

Chaurasia, describe a la *Anabaena sp.* como biofertilizante (Chaurasia & Apte, 2011), también Morales et al. (2002) la describe como fuente de pigmentos y exopolisacáridos. Sin embargo la mayoría de estudios que se han realizado sobre *Anabaena sp.* van más vinculados hacia la biología molecular de los ficobilisomas, purificación de ARN polimerasa y la diferenciación de heterocistos (Buikema y Haselkorn, 1991) además de la inducción de proteínas (Giraldez et al., 1997).

Anabaena sp. es una de las microalgas más utilizadas para la investigación por la facilidad de extracción de sus pigmentos y exopolisacáridos, y la elevada estabilidad de su biomasa (Loreto y Morales, 2003). Dentro de la composición bruta de *Anabaena sp.* se encuentran la clorofila a, proteínas y exopolisacáridos. La clorofila a es un pigmento fotosintético primario y su acumulación parece estar íntimamente coordinada con la actividad fotosintética y el desarrollo de los tilacoides. El contenido proteico de las microalgas depende de la fuente de nitrógeno suministrado y se estima que el porcentaje encontrado en peso seco de *Anabaena cilíndrica* oscila entre 43% y 56% (Abalde et al., 1995). Los exopolisacáridos también son sintetizados por *Anabaena sp.*; sin embargo una acumulación de exopolisacáridos ayuda a la formación de biofilms, los cuales son comunidades complejas de microorganismos recubiertas de polímeros extracelulares que ayuda retener el alimento, pero su acumulación puede ocasionar problemas en tuberías y favorece la corrosión de superficies metálicas (Piera, Tejedor-Tejedor, Zorn, & Anderson, 2003).

2.7.1. Cultivo de *Anabaena azollae*.

Temperatura

Las temperaturas óptimas de cultivos de microalgas marinas generalmente van desde 15 °C a 22 °C. Otros rangos de temperatura encontrados como óptimos

son 28 ± 2 °C en función del pH y CO₂ (Morales et al., 2002) y 30 ± 2 °C en relación a la concentración de nitrógeno e irradiancia (Loreto et al, 2003). Para cada tipo de *Anabaena* se debe considerar la temperatura a la que está desarrollándose en su medio natural (Carr, 1969).

Intensidad de luz

La luz es indispensable para el crecimiento de las cianobacterias ya que necesitan de esta para su crecimiento, sin embargo según Mun et al. (1978) el requerimiento de intensidad de luz es más bajo que el de las algas. En efecto Loreto et al. (2003) obtuvo mayor densidad celular a una irradiancia de $78 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sin embargo los valores más elevados de pigmentos y proteínas se obtuvieron a $156 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Fotoperiodo

La productividad de las cianobacterias fluctúa con las variaciones de luz, es decir requieren de períodos de luz y oscuridad, por lo cual, muchos aspectos de la fisiología microalgal requieren de esta periodicidad (Sournia, 1974). Algunos aspectos fisiológicos que requieren periodicidad son:

- *División celular*: La división celular ocurre en momentos determinados del día o la noche, hecho por el cual necesitan de la sincronización de la luz.
- *Capacidad fotosintética*: Se observa con frecuencia una mayor tasa de fotosíntesis en la mañana.
- *Absorción de nutrientes*: Se ha observado en el día mayor tasa de absorción de nitrógeno y fósforo. En estudios con la microalga *Chaetoceros gracilis* e *Isochrysis galbana* se obtuvieron mayores tasas de crecimiento en el régimen de luz – oscuridad (Nagao et al., 2010).

Rango de pH

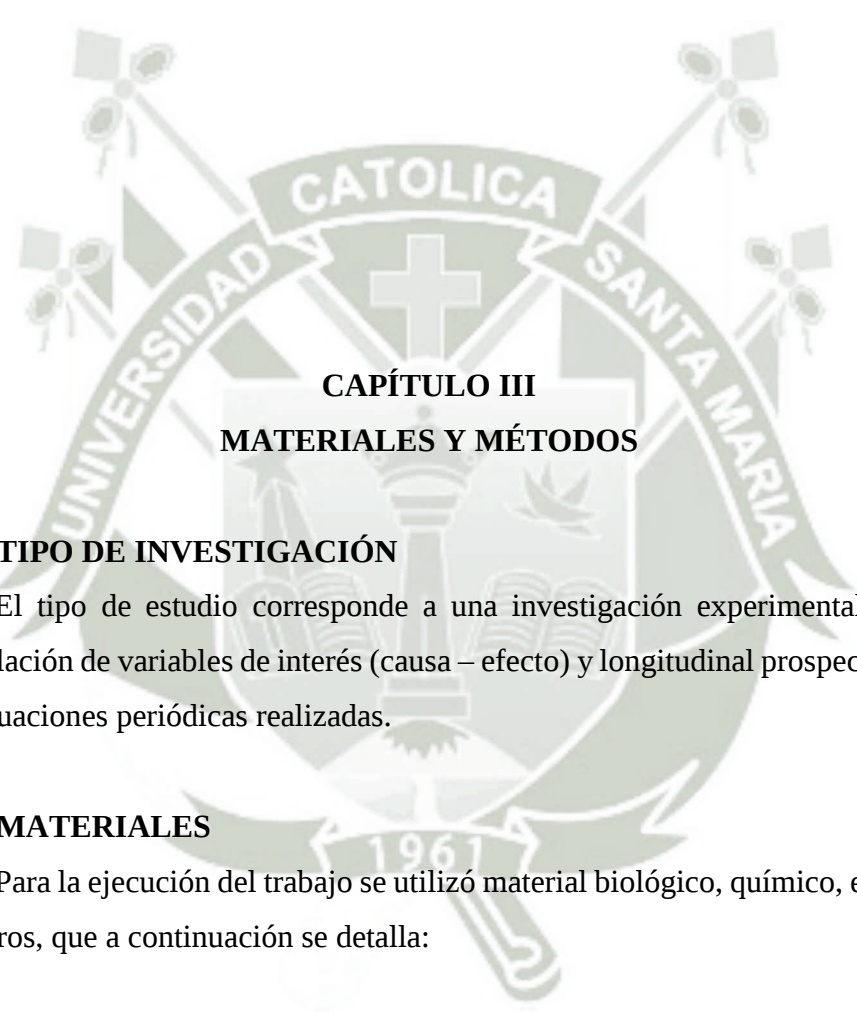
La mayoría de cianobacterias requieren un pH entre 7-10. Morales et al. (2002) encontró que a pH 8.0-9.0 hay mayor crecimiento en diversos cultivos de *Anabaena sp.*

Agitación

La aireación es necesaria para el crecimiento de *Anabaena* y, esta, a la vez, sirve como agitación. El medio en el que se encuentren reproduciéndose las cianobacterias no es homogéneo por lo cual las bacterias no recibirán la misma concentración de nutrientes para su crecimiento, este factor hace necesaria la utilización de agitación para optimizarlo. El método más efectivo para la agitación es la aireación dado que el aire a la vez que agita suministra el CO₂ y O₂ que requieren las bacterias para la fotosíntesis. Efectivamente, trabajos con la microalga *Phaeodactylum tricornutum* demostraron un aumento en la tasa de crecimiento y densidad celular final con el suministro de aire con CO₂ (Fábregas et al., 1994).

Salinidad

En algunos microorganismos como *Dunaliella salina* se encontró un aumento en el contenido de carotenos a altas concentraciones de sal (Brown, et al, 1989) lo cual indica que ésta tiene efectos sobre la producción de microalgas. Con respecto al crecimiento *Anabaena* sp. tolera salinidades de hasta 15g L⁻¹, sin embargo a 20g L⁻¹ se inhibe su crecimiento (Moisander et al., 2002).



CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN

El tipo de estudio corresponde a una investigación experimental por la manipulación de variables de interés (causa – efecto) y longitudinal prospectiva por las evaluaciones periódicas realizadas.

3.2. MATERIALES

Para la ejecución del trabajo se utilizó material biológico, químico, equipos, entre otros, que a continuación se detalla:

A) Equipos:

- Bomba de Aire Hailea (3600 L h^{-1}).
- Centrífuga Hettich EBA20S Portable C2080.
- Cromatógrafo Líquido de Alta Performance Primaide Hitachi ® (HPLC-DAD).

- Espectrofotómetro Agilent Cary 60 UV-VIS.
- Microscopio Binocular HT-B3-220ASC con objetivo de 100X.
- Balanza analítica OhausPioneer® Tm.
- Equipo Barnstead® Easy Purell (agua 18.2 MΩ).
- Pipetas automáticas de 20 µL, 200 µL y 1000 µL (Eppendorf).

B) Material de vidrio:

- Botellas de vidrio 100, 250, 500 y 1000 mL (Boeco).
- Pipetas de 2 y 10 mL (Kyntel).
- Vasos de precipitado de 500 mL (Kyntel).
- Pipeta de 1 mL (Boeco).
- Tubos de ensayo, 12x75 mL borosilicato (Giardino).
- Probeta de 250 mL (Kyntel).
- Probeta de 500 mL (Kyntel).
- Matraz de 1000 mL.
- Tubería de vidrio de 5 mm.
- Embudo de vidrio.
- Tubos de ensayo de 75x100 mL.
- Porta objetos y cubre objetos.

C) Reactivos:

- Agua destilada, Agua ultra pura (18.2 MΩ), Agar, NaNO₃, CaCl₂·2H₂O, MgSO₄·7H₂O, K₂HPO₄, KH₂PO₄, NaCl, EDTA, FeSO₄·7H₂O, H₂SO₄, H₃BO₃, ZnSO₄·7H₂O, MnCl₂·4H₂O, MoO₃, CuSO₄·5H₂O, Co(NO₃)₂·6H₂O, K₂HPO₄·3H₂O, MgSO₄·7H₂O, Ácido cítrico, Citrato de amonio férrico, MgNa₂EDTA·H₂O, Na₂CO₃, Na₂MoO₄·2H₂O, Metanol, Buffer PBS, Estándar de pesticida Clorpirifos Sigma Aldrich, Acetonitrilo grado HPLC, Metanol grado HPLC, Hipoclorito de sodio 5% y etanol 70°.

D) Biológico:

- Microalga *Chlorella vulgaris* y cianobacteria *Anabaena azollae* certificada por el laboratorio de Biología Marina de la Escuela profesional de Biología de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.

E) Otros Materiales:

- Columna de separación Hypersil GOLD™ Sílica Columnas LC de dimensiones 5 μm x 20 mm x 250 mm.
- Cámara de Neubauer.
- Gradilla para 48 tubos de ensayo.
- Aireadores de 5 Watts.
- Mangueras.
- Llaves de paso para flujo de aire.

3.3. MÉTODOS

3.3.1. Aislamiento y cultivo de microalgas.

Las diferentes especies nativas de muestras de microalgas fueron colectadas de efluentes impactados con pesticidas de la provincia de Arequipa, luego se

aislaron mediante los métodos de diluciones sucesivas y plaqueo en agar 1.5%. Los medios de cultivo utilizados fueron BG11 (Blue-Green Medium) (Stanier, Kunisawa, Mandel, & Cohen-Bazire, 1971), BBM-Medium (Bold's Basal Medium) (Bischoff & Bold, 1963) y medio Chu's (Chu, 1942). Una vez aisladas fueron identificadas y certificadas por el laboratorio de Biología Marina de la Escuela Profesional de Biología de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.

Diluciones sucesivas

Este método consistió en realizar diluciones de 10^{-1} hasta 10^{-10} , observando el crecimiento celular del último tubo de dilución; del que se tomó una alícuota de 0.1 mL que fue colocado en la placa de cultivo hasta observar el crecimiento celular (Rout Nutan Prasad et al., 2013).

Plaqueo

Se utilizó agar bacteriológico con 14.5 g por cada litro de agua destilada, después de disolver el agar y añadieron los nutrientes en proporción a la cantidad de medio que se deseó preparar. Posteriormente se llevó al autoclave a 15lb pulg⁻² y 121 °C por 15 minutos, luego se procedió a llenar las placas Petri dentro de una cámara de flujo laminar y finalmente se sembró con la técnica de estriado (Andersen, 2005).

Los cultivos aislados en la placas Petri fueron transferidos a frascos de 250 mL con 200 mL de medio de cultivo y mantenidos en cámara de crecimiento a 25 ± 2 °C, bajo luz continua (65 mmol radiación activa fotosintética m⁻² s⁻¹) proporcionada por lámparas fluorescentes blancas frías, la agitación se realizó por burbujeo de aire a través de una tubería de vidrio de 5 mm. Todos los experimentos se realizaron con cultivos de células en crecimiento exponencial (Kandilian, Jesus, Legrand, Pilon, & Pruvost, 2017) y se fueron inoculando en recipientes de mayor capacidad, hasta obtener un volumen total de 10 L para luego ser inoculados en los reactores Batch.

3.3.2. Validación del método analítico para la determinación de clorpirifos por HPLC

Se validó un método analítico para la cuantificación de la concentración de Clorpirifos utilizando el Cromatógrafo Líquido de Alta Performance Primaide Hitachi® (HPLC-DAD). Se utilizó una columna Hypersil GOLD™ Sílica Columns LC de dimensiones 5 μm x 20 mm x 250 mm y estándar de Clorpirifos Sigma Aldrich®. La fase móvil fue de Acetonitrilo: Agua UP (70:30), a un flujo de 2 mL min^{-1} , temperatura de 25 $^{\circ}\text{C} \pm 5$ y a 210 nm.

Linealidad

Se prepararon 6 soluciones de 5, 9, 13, 17, 21, 25, y 29 mg L^{-1} a partir de una solución a 1000 mg L^{-1} de Clorpirifos. Se realizaron tres repeticiones de cada concentración siguiendo la técnica de preparación estándar. Se calculó la ecuación de regresión y el coeficiente de determinación (R^2).

Exactitud

Se eligieron tres concentraciones de 7.5, 15 y 30 mg L^{-1} de clorpirifos; y se analizaron por triplicado individualmente, se tomó en cuenta el valor teórico versus el obtenido durante la práctica. Se calculó la media, la desviación estándar y el porcentaje de recuperación para todas las muestras.

Precisión - Repetibilidad

Se preparó una solución de muestra de 15 mg L^{-1} de Clorpirifos; se realizaron 10 repeticiones de acuerdo con el procedimiento práctico. Se registró en el tiempo de retención y el área del pico; calculando posteriormente la media, desviación estándar y la desviación estándar relativa.

Límite de detección

Se determinó la concentración detectable más baja de la solución estándar, utilizando los datos obtenidos por linealidad, seis concentraciones analizadas por

triplicado, de las que se halló tanto el área de pico, como la concentración. También, se realizó la correlación lineal de las concentraciones más bajas analizadas con la desviación estándar correspondiente, para así poder obtener los dos interceptos usados en la siguiente ecuación para obtener el LD (Quattrochi, 1992).

$$LD = \frac{Y_{bl} + 3 DS_{bl}}{m} \times \frac{1}{\sqrt{n}}$$

Dónde:

LD: Límite de detección

Y_{bl}: Intercepción con el eje “y” (Curva de calibración)

DS_{bl}: Intercepción con eje “y” (Desviación estándar)

m: Pendiente de la curva

n: Número de datos

El ICH hace referencia a una relación señal-ruido de 3:1. (Baalbaki, Zein Eddine, Jaber, Amasha, & Ghauch, 2018)

Límite de cuantificación

Es la concentración más baja a la que un analito en la matriz de muestra se puede determinar con la precisión y exactitud requerida para el método en cuestión.

Se determinó la concentración cuantificable más baja de la solución estándar, utilizando los datos obtenidos por linealidad, seis concentraciones analizadas por triplicado, de las que se halló tanto el área de pico, como la concentración. También, se realizó la correlación lineal de las concentraciones más bajas analizadas con la desviación estándar correspondiente, para así poder obtener los dos interceptos usados en la siguiente ecuación para obtener el LC (Quattrochi, 1992).

$$LC = \frac{Y_{bl} + 10 DS_{bl}}{m} \times \frac{1}{\sqrt{n}}$$

Dónde:

LC: Límite de cuantificación

Ybl: Intercepción con el eje “y” (Curva de calibración)

DSbl: Intercepción con eje “y” (Desviación estándar)

m: Pendiente de la curva

n: Número de datos

El límite de cuantificación para métodos cromatográficos debe tener una relación señal-ruido de 10:1. (Shabir, 2004).

3.3.3. Preparación de la muestra

Se tomó 2 mL de muestra de cada unidad experimental, utilizando un portafiltro. Se realizó una extracción líquido-líquido del clorpirifos contenido en la muestra, utilizando hexano como solvente, luego se sonicó durante 5 minutos y se centrifugó a 5000 rpm por 5 minutos. Se descartó el exceso de humedad de la fase orgánica de la solución extraída, haciéndola pasar por sulfato de sodio deshidratado en una jeringa. Luego la fase orgánica de la extracción (hexano-clorpirifos) se evaporó en atmósfera inerte y se reconstituyó el clorpirifos de la muestra a un volumen final de 2 mL con acetonitrilo; las muestras reconstituidas pasaron a través de una unidad de filtración Millex-LCR de 0.45 μ m antes de su análisis en el HPLC.

3.3.4. Estudio de la capacidad de remoción de Clorpirifos con *Chlorella vulgaris* y *Anabaena azollae* en sistemas Batch.

Para determinar la capacidad de remoción de clorpirifos de las especies *Chlorella vulgaris* y *Anabaena azollae* por separado y en consorcio, se elaboró el siguiente diseño experimental; realizando 3 repeticiones por tratamiento.

Tabla 4. Tratamientos para la determinación del porcentaje de remoción de clorpirifos.

Código de Tratamiento	Especie Biológica	Medio de Cultivo	Concentración de Clorpirifos mg L ⁻¹
T1	<i>Anabaena azollae</i>	BG11	30
T2	<i>Anabaena azollae</i>	BG11	15
T3	<i>Anabaena azollae</i>	BG11	7.5
T4	<i>Anabaena azollae</i>	BG11	0
T5	<i>Chlorella vulgaris</i>	BBM	30
T6	<i>Chlorella vulgaris</i>	BBM	15
T7	<i>Chlorella vulgaris</i>	BBM	7.5
T8	<i>Chlorella vulgaris</i>	BBM	0
T9	<i>A. azollae</i> + <i>C. vulgaris</i>	BG11+BBM	30
T10	<i>A. azollae</i> + <i>C. vulgaris</i>	BG11+BBM	15
T11	<i>A. azollae</i> + <i>C. vulgaris</i>	BG11+BBM	7.5
T12	<i>A. azollae</i> + <i>C. vulgaris</i>	BG11+BBM	0

La Tabla 4, esquematiza los diferentes niveles de las variables de este estudio, la especie biológica y la concentración de clorpirifos inicial.

3.3.5. Evaluación de la productividad de biomasa en el crecimiento de las microalgas.

Se utilizó un método modificado de Tang para determinar el peso seco de las células (g L⁻¹), centrifugando la suspensión microalgal a 3000 rpm por 10

minutos; las células precipitadas se mantuvieron a 60 °C por 48 horas y luego fueron pesadas (Tang, Han, Li, Miao, & Zhong, 2011).

La productividad de biomasa ($\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$) se calculó a partir de la variación en la concentración de biomasa (g L^{-1}) durante el tiempo de cultivo (d) de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$P = \frac{X_1 - X_0}{t_1 - t_0}$$

Dónde:

X_1 y X_0 : Concentración de biomasa (g L^{-1})

t_1 y t_0 : Tiempo en días (d)

La tasa de crecimiento específico μ (d^{-1}) se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$\mu = \frac{\ln \left(\frac{N_1}{N_0} \right)}{t_1 - t_0}$$

Dónde:

N_1 y N_0 : Densidad celular (Microorganismos m L^{-1})

t_1 y t_0 : Tiempo en días (d)

Según Miriam (2016), el tiempo de duplicación (DT) requerido para que la población de microorganismos sea el doble, se calculó usando la siguiente fórmula (Monisha Miriam, Edwin Raj, Kings, & Adhi Visvanathan, 2017):

$$DT = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Así también, el número de las generaciones producidas por día (GD) se calculó como sigue:

$$GD = \frac{\mu}{\ln 2}$$

3.3.6. Cuantificación de la producción de clorofila “a” por *Chlorella vulgaris* y *Anabaena azollae* a diferentes concentraciones de Clorpirifos.

La clorofila es el pigmento principal producto de la conversión fotosintética y se determinó por método espectrofotométrico (X. Chen et al., 2011). Se centrifugaron 3 mL de muestra del cultivo de microalgas a 5000 rpm durante 10 minutos y se lavó con buffer PBS dos veces. El precipitado de células se mezcló con 3 mL de metanol, calentado en un baño de agua a 70 °C durante 10 minutos y se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos. Se midió la absorbancia del sobrenadante a una longitud de onda de 665 nm y 750 nm.

$$Chl\ a = 13.9 \times (AB_{665} - AB_{750})$$

Dónde:

Chl a: Concentración clorofila a (mg L⁻¹)

*AB*₆₆₅: Absorbancia a 665 nm

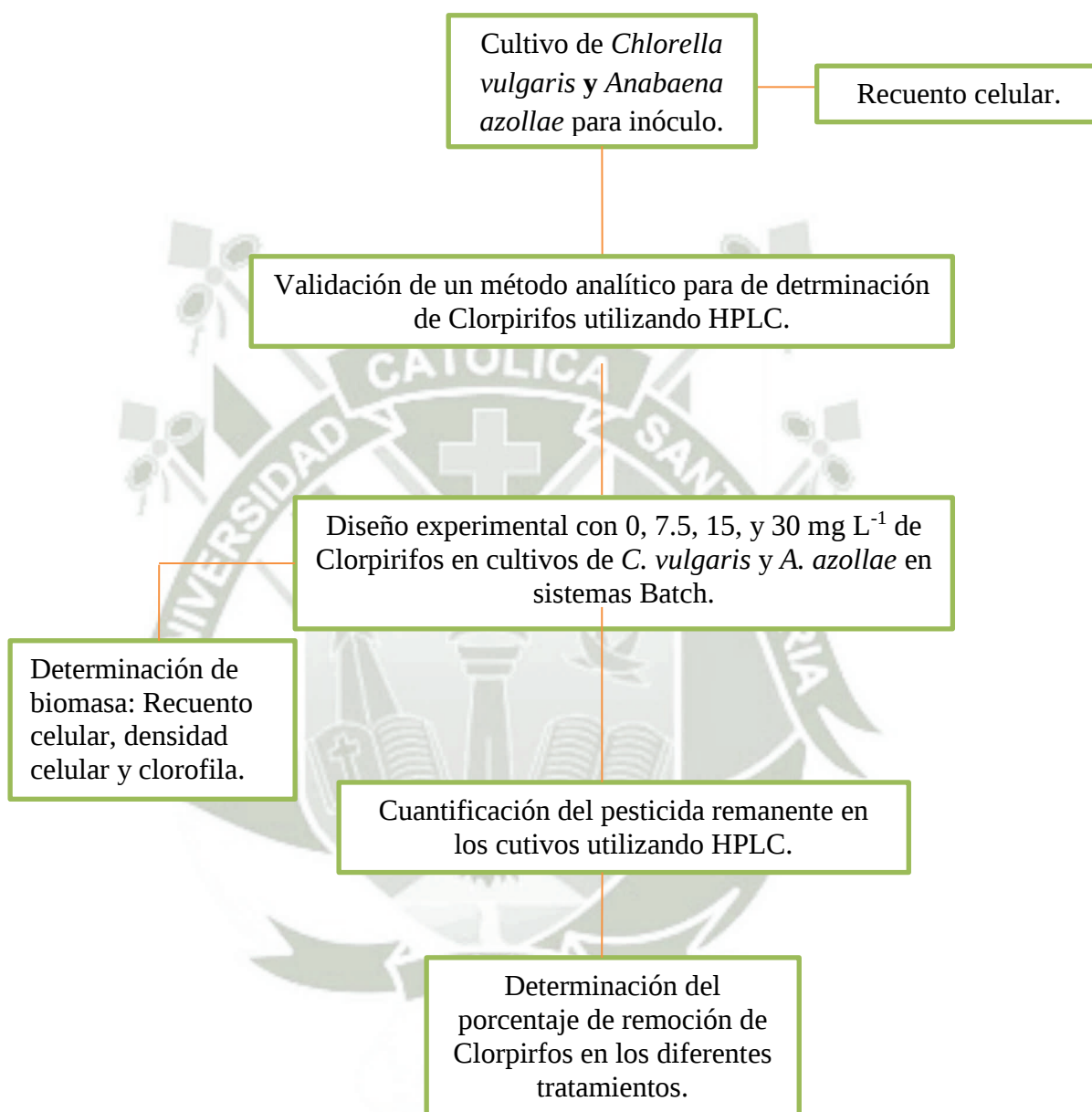
*AB*₇₅₀: Absorbancia a 750 nm

3.3.7. Análisis y procesamiento de datos

Para el procesamiento de datos se consideró los estadísticos descriptivos como medias y desviaciones estándar. Para la comparación de las variables como el crecimiento y concentración de clorpirifos durante la ejecución del ensayo se utilizaron gráficos de ambos parámetros según el tiempo.

Para la comparación del porcentaje de remoción de clorpirifos, la productividad de biomasa y la concentración de clorofila “a” se emplearon pruebas estadísticas de ANOVA de dos vías; ya que las variables a evaluar serán la Especie biológica (*Chlorella vulgaris*, *Anabaena azollae* y *Chlorella vulgaris*+*Anabaena azollae*) y la Concentración inicial de Pesticida (0, 7.5, 15 y 30 mg L⁻¹ de Clorpirifos). Se realizaron gráficos de interacción para determinar el mejor tratamiento en las variables evaluadas. La significación estadística se definió con $p < 0.05$.

3.4. FLUJOGRAMA DE ACTIVIDADES.



CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.1. Aislamiento y cultivo de microalgas nativas de la región Arequipa.

Se lograron aislar e identificar dos especies biológicas; la microalga *Chlorella vulgaris* y la cianobacteria *Anabaena azollae*, certificadas por el laboratorio de Biología Marina de la Universidad Nacional de San Agustín (Anexo 1). Las coordenadas del lugar donde se realizaron los muestreos fueron 16.648594 -72.687244, ubicado en el distrito de Samuel Pastor La Pampa, Provincia de Camaná. Para ambas especies, el escalamiento se inició con un volumen de 250 mL de cultivo, a las dos semanas se pasaron a frascos de 1 L y a la quinta semana se logró obtener un inóculo inicial de 10 L con una densidad celular de 20×10^4 Microorganismos mL^{-1} .

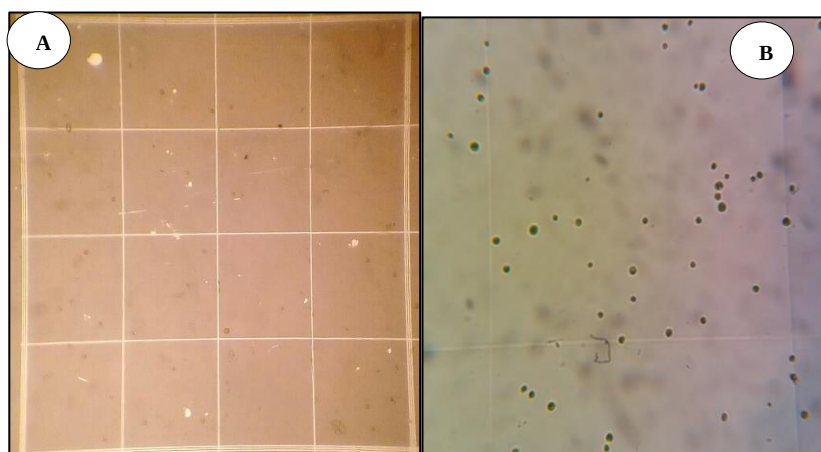


Figura 6. *Chlorella vulgaris* en cámara de Neubauer para realizar conteo celular. A) Se observa una panorámica de los cuadrantes a 10X; B) Cuadrante enfocado a 40X.

En la Figura 6 podemos apreciar a las especies durante un conteo en la cámara de Neubauer. *C. vulgaris* es un organismo autotrófico eucariota unicelular, se presenta como esferas cocoides verdes con una aparente pared celular rígida, en el interior se puede distinguir los cloroplastos del núcleo celular; vive en solitario y se reproduce exclusivamente por autosporogénesis.

La especie *Chlorella* ha sido muy estudiada por su manejo sencillo y crecimiento muy predecible como lo indica Krienitz (Krienitz et al., 2015), ya que esto favorece su uso en pruebas de laboratorio; por eso su versatilidad la hace una candidata para diversas aplicaciones biotecnológicas (Sadeghizadeh et al., 2017).



Figura 7. *Anabaena azollae* en cámara de Neubauer. A) Morfología filamentosa de *A. azollae*; B) Cianobacteria enfocada en cuadrante a 40X.

La cianobacteria *Anabaena azollae* (Figura 7) se presenta como una alineación de células como filamentos, de los cuales se puede distinguir los heterocistos; fijadores de nitrógeno molecular y acinetos; encargados de la germinación de nuevos filamentos para su reproducción.

A. Azollae puede existir por sí misma, pero generalmente se encuentra dentro de las cavidades ovoides de las hojas del helecho acuático *Azolla*, con quien ha formado una relación simbiótica en la cual la cianobacteria recibe fuentes de carbono y nitrógeno de la planta a cambio de nitrógeno fijo (Rai et al., 2006). *A. Azollae* es un organismo modelo usado comúnmente en laboratorios para el estudio de la diferenciación genética en la formación de heterocistos (R. P. Singh & Singh, 1989).

1.2. Validación del método analítico para la determinación de clorpirifos por HPLC.

El método validado incluyó las consideraciones recomendadas por la Conferencia Internacional de Armonización (ICH) cuyas directrices permiten validar métodos analíticos desde la preparación de la muestra hasta la detección de analitos, otorgando estabilidad y robustez a los ensayos para lograr su optimización en la práctica.

El método se validó para la cuantificación de la concentración de clorpirifos utilizando el Cromatógrafo Líquido de Alta Performance Primaide Hitachi® con la columna Hypersil GOLD™ Sílica Columnas LC de dimensiones 5 μm x 20 mm x 250 mm. La fase móvil constó de una elución isocrática de Acetonitrilo: Agua UP en una proporción de 70:30 para una mejor separación de picos, siendo el flujo 2 mL min^{-1} , temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5$ y a 210 nm; para un tiempo de retención de 4.3 min (Figura 8).

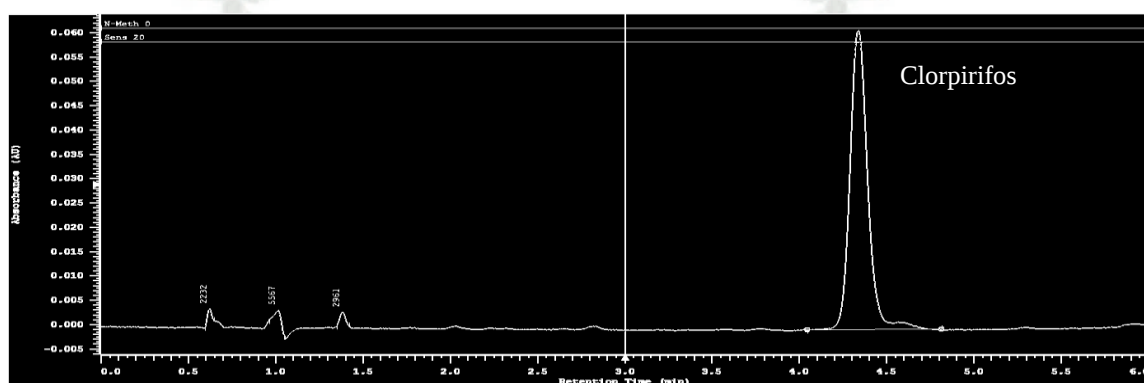


Figura 8. Cromatograma de solución estándar de Clorpirifos con tiempo de retención de 4.3 min.

Linealidad

La linealidad es la capacidad de obtener resultados (dentro de un rango determinado) que varían de una manera directamente proporcional (lineal) a los cambios en la concentración (cantidad) del analito en la muestra a través de una regresión lineal (Konieczka, 2012).

Tabla 5. Determinación de la media, desviación estándar y coeficiente de variación a diferentes concentraciones de la solución estándar de Clorpirifos.

Concentración (mg L ⁻¹)	Área I	Área II	Área III	$\bar{X}$	s	C.V.
5	43906	43950	43332	43729.33	344.80	0.79
9	79305	78193	78547	78681.67	568.10	0.72
13	111325	110607	116106	112679.33	2989.22	2.65
17	144916	142028	159141	148695.00	9161.02	6.16
21	186344	181945	188947	185745.33	3539.18	1.91
25	218408	214545	235946	222966.33	11405.46	5.12
29	263466	255469	268405	262446.67	6527.96	2.49

La forma común de determinar la linealidad se basa en el uso de una curva de calibración obtenida para un instrumento de medida dado. Para eso, se midieron seis niveles de concentración del analito (por triplicado).

La Tabla 5, describe las concentraciones analizadas. Obviamente, la elección de las concentraciones de analito en soluciones estándar debe reflejar los contenidos esperados del analito en la muestra.

Gonzales et al, también realizó tres réplicas de cada punto en la curva de calibración para la determinación de carbofuran y 3-hidroxycarbofuran, considerando las diferentes matrices de extracción del analito, puntos que fueron útiles para determinar después los límites de detección y cuantificación (Gonçalves et al., 2017).

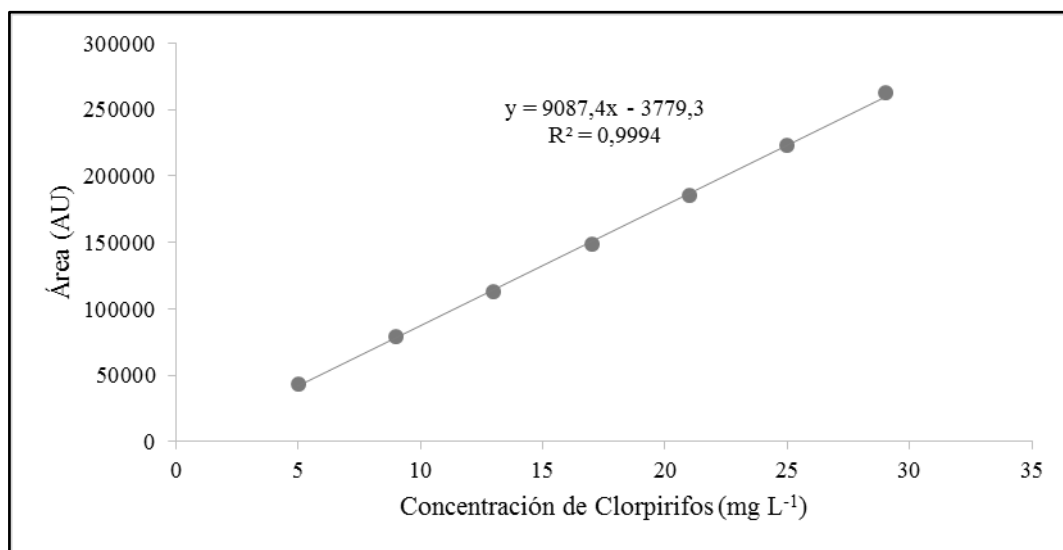


Figura 9. Regresión lineal para concentraciones de Clorpirifos relacionadas con el área de pico, utilizando HPLC.

En la Figura 9 se observa la ecuación lineal que se obtuvo:

$$y = 9087.4 x - 3779.3$$

También se determinaron los parámetros de regresión lineal; el coeficiente de determinación (R^2) fue 0.9994, el coeficiente de correlación (R) fue 0.9997; siendo $\geq$ a 0.999 y encontrándose dentro del rango que establece la ICH para seis niveles de concentración (Kumar, Bhutani, & Singh, 2007). El valor de la pendiente fue 9087.4 y el intercepto con el eje “y” fue -3779.3; que es $\leq$ 2% del área que le corresponde a la concentración objetivo que fue 29 mg L⁻¹ con un área 259755.3 AU.

Exactitud

Se define como el grado de cercanía o proximidad entre la cantidad medida y el valor real de la cantidad medida. Se determinó calculando el porcentaje de recuperación de 3 concentraciones diferentes de clorpirifos en una muestra, a las que se les añadió una concentración determinada de clorpirifos.

Tabla 6. Porcentaje de recuperación de Clorpirifos para determinar la exactitud del método analítico.

Conc. Estimada (mg L ⁻¹)	Muestra		Estándar (5 mg L ⁻¹)		Muestra + Estándar		% de Recuperación	
	Área	Concentración Real	Área	Concentración Real	Área	Concentración Real		
7.5	63295	7.38	41357	4.97	107790	12.28	98.58	
	63827	7.44	41357	4.97	109403	12.45	100.97	100.13
	62998	7.35	41357	4.97	108513	12.36	100.84	
15	130513	14.78	41357	4.97	175368	19.71	99.38	
	132181	14.96	41357	4.97	176579	19.85	98.36	98.15
	131346	14.87	41357	4.97	175001	19.67	96.72	
	265172	29.60	41357	4.97	310679	34.60	100.82	
30	268245	29.93	41357	4.97	312847	34.84	98.81	99.11
	267113	29.81	41357	4.97	311209	34.66	97.69	

Los porcentajes de recuperación para las concentraciones de 7.5, 15 y 30 mg L⁻¹; fueron 100.13, 98.15 y 99.11% respectivamente. La Tabla 6 nos muestra que el promedio de los porcentajes fue 99.13%, el que se encuentra entre el 90 al 110% de los valores teóricos para productos no regulados según la USP (Gad, 2014); validando el método como un procedimiento exacto.

Además, se determinó la desviación estándar que fue 1.50 y desviación estándar relativa (D.S.R.) de 1.52 para realizar la prueba estadística t de Student. Según la Tabla 7, se halló el valor de t_{exp} y se comparó con el $t_{teórico}$ para 8 grados de libertad, con un nivel de significancia del 95%.

Tabla 7. Prueba t-Student para medias de dos muestras emparejadas para analizar porcentaje de recuperación.

	% Teórico	% Recuperado
Media	100.00	99.13
Varianza	0.00	2.26
Observaciones	9.00	9.00
Diferencia hipotética de las medias	0.00	
Grados de libertad	8.00	
Estadístico t	1.734	
P(T<=t) una cola	0.061	
Valor crítico de t (una cola)	1.860	
P(T<=t) dos colas	0.121	
Valor crítico de t (dos colas)	2.306	

Como se observa en la tabla el valor de $t_{\text{teórico}}$ (2.306) es mayor al valor de t_{exp} (1.734) lo que valida la hipótesis en la que afirmamos que no existe diferencia significativa entre los valores del porcentaje de recuperación para las diferentes concentraciones de trabajo.

Precisión - Repetibilidad

Se define como la proximidad entre los valores de una determinada cantidad de analito, la que es medida por réplicas utilizando los mismos instrumentos y bajo las mismas condiciones de trabajo.

Luego de realizar las 10 mediciones a una muestra de aproximadamente 15 mg L⁻¹ de concentración, se hallaron el promedio, la desviación estándar y la desviación estándar relativa; tanto para el área de los picos de los cromatogramas, como para la concentración (Tabla 8).

Según la ICH (Kumar et al., 2007), cuando un método es preciso; los valores del coeficiente de variación porcentual o también llamado D.S.R. se encuentran por debajo del 2%. Para los lineamientos de USP (Gad, 2014), los valores admisibles para considerar la precisión deben ser inferiores a 2.7%; por lo cual consideramos que el método es preciso al obtener 1.10 y 1.07, para área y concentración respectivamente.

Tabla 8. Prueba de Repetibilidad para determinar la precisión del método analítico.

Prueba (15 mg L ⁻¹)	Área (AU)	Concentración (mg L ⁻¹)
1	130513	14.78
2	132181	14.96
3	131346	14.87
4	129531	14.67
5	127973	14.50
6	130747	14.80
7	128035	14.51
8	128752	14.58
9	131029	14.83
10	129728	14.69
MEDIA	129983.5	14.72
D.S.	1424.67	0.16
D.S.R.	1.10	1.07

Límite de detección y cuantificación

El límite de detección (LD), es la concentración más baja que se puede medir (detectar) con significación estadística por medio del procedimiento analítico estudiado. Prácticamente, se determina sobre la base del nivel de ruido que con frecuencia debe ser tres veces más alto para no alterar el resultado.

El límite de cuantificación (LC) representa la cantidad más pequeña o la menor concentración posible de una sustancia que es posible determinar por el procedimiento analítico planteado.

Debido al hecho de que el nivel de ruido es el parámetro principal, que afecta a LD y LC, es muy importante estimar su nivel.

Luego de aplicar las ecuaciones planteadas se obtuvo el límite de detección para determinar clorpirifos con nuestro método, el cual fue 0.34 mg L^{-1} y el límite de cuantificación fue 0.73 mg L^{-1} . Estos resultados nos ofrecen la certeza de que nuestro método tiene la capacidad de hallar valores bajos por encima de los 0.70 mg L^{-1} .

De igual manera se validó un método analítico para determinar carbofuran y sus metabolitos en órganos de animales, los parámetros analíticos de validación fueron linealidad, precisión y efecto de recuperación en la matriz. El método fue lineal en el rango de 6.25 a $100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ y los valores del coeficiente de correlación (R^2) fueron > 0.9811 para todas las matrices. La exactitud y precisión del método fue determinada por el coeficiente de variación (C.V.) y la desviación estándar relativa (D.S.R.), y ambos fueron menos del 15%. La recuperación varió de 74.29 a 100.1% para carbofuran y de 64.72 a 100.61% para 3-hidroxicarbofurano (Gonçalves et al., 2017).

1.3. Estudio de la capacidad de remoción de clorpirifos con *Chlorella vulgaris* y *Anabaena azollae* en sistemas Batch.

Se realizó el montaje de los sistemas Batch en frascos de 250 mL, se utilizó el 80% de la capacidad del frasco, el resto se consideró para realizar el intercambio gaseoso en caso de burbujeo en el interior del sistema. Se añadieron 40 mL de

inóculo con una concentración de 20×10^4 Microorganismos mL^{-1} tanto de *Chlorella vulgaris* y *Anabaena azollae* en cada tratamiento como se indica la Tabla 4.

Para lograr las concentraciones deseadas de clorpirifos se preparó una solución de 100 mL a 4800 mg L^{-1} a partir de clorpirifos comercial Tifón 4E Farnagro®; a los tratamientos de 30 mg L^{-1} se les agregó 1.25 mL, a los de 15 mg L^{-1} 0.625 mL y a los de 15 mg L^{-1} 0.3125 mL. El volumen final de cada tratamiento fue 200 mL, el cual se alcanzó añadiendo los medios de cultivo para *Chlorella vulgaris*, BBM; y para *Anabaena azollae*, BG11.

En los tratamientos mixtos, se añadieron microalgas y cianobacterias en proporciones iguales, complementando con los medios de cultivo correspondientes.



Figura 10. Sistemas Batch a diferentes concentraciones de Clorpirifos con *Chlorella vulgaris* y *Anabaena azollae* en consorcio y en cultivos separados.

Los sistemas fueron sellados con tapones de jebe, los cuales tenían 2 aberturas de aproximadamente 5 y 3 mm, en el primer agujero se colocó tubería de vidrio que permitió el ingreso de aire proporcionado por la bomba; el segundo

orifico sirvió para liberar el oxígeno generado producto de la fotosíntesis. La instalación de los sistemas Batch se pueden apreciar en la Figura 10.

Las condiciones ambientales fueron 20 ± 2 °C, bajo luz continua (65 mmol radiación activa fotosintética $\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), la que se obtuvo por lámparas fluorescentes de luz blanca y fría; a su vez se monitoreó la humedad relativa que tuvo un máximo de 92% y un mínimo de 53%.

Todos los tratamientos se realizaron por triplicado, obteniendo un total de 36 unidades experimentales, el comportamiento de cada sistema para la remoción de clorpirifos se pueden observar en la Tabla 9 y la Figura 11.

Algunas industrias como la agrícola, cuentan con aguas residuales que se encuentran muy contaminadas con sólidos suspendidos que limitan la penetración de la luz, por lo tanto se puede dar una reducción del crecimiento de microalgas (Khalid, Yaakob, Abdullah, & Takriff, 2018). Es por eso, que se buscó que las condiciones lumínicas para todos los tratamientos fueran iguales, además esto implicaría una mejora en el desarrollo y en consecuencia en la tasa de crecimiento.

Sin embargo, hay estudios que demuestran que las microalgas tienen una probada capacidad para prosperar en aguas residuales con abundantes nutrientes; pero siempre se requerirá una etapa de adaptación para que las especies puedan degradar los contaminantes sin factores desfavorables para su desarrollo (Guldhe, Ansari, Singh, & Bux, 2017).

Tabla 9. Evaluación de la concentración de Clorpirifos en los diferentes tratamientos durante 26 días de cultivo.

Días	Tratamientos											
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
1	29.69	14.97	7.46	0.00	29.71	15.00	7.45	0.00	30.07	14.94	7.48	0.00
6	27.10	12.86	6.49	0.00	25.31	11.83	6.20	0.00	24.44	10.95	5.37	0.00
11	21.04	10.53	4.81	0.00	19.87	9.66	4.30	0.00	17.98	8.78	4.10	0.00
16	19.35	9.92	4.29	0.00	17.99	8.40	3.68	0.00	16.07	7.60	3.22	0.00
21	16.40	8.35	3.84	0.00	14.20	6.49	2.46	0.00	13.01	5.42	2.05	0.00
26	14.89	5.98	3.14	0.00	12.17	4.73	1.95	0.00	10.81	2.90	1.41	0.00

En la Tabla 9 podemos observar los valores de las concentraciones de Clorpirifos, monitoreados durante 26 días de ensayo.

T4, T8 y T12 corresponden a los controles del diseño experimental, es decir no se incluyó el pesticida organofosforado en los cultivos.

El tiempo de remoción consideró el periodo de crecimiento microalgal, evaluando la fase exponencial de desarrollo; la que se encuentra dentro del tiempo de persistencia del pesticida. Kenfack reportó los efectos de Clorpirifos en ratas de género masculino, 90 días después de la exposición; hallando una disminución en el número y movimiento de espermatozoides, además de diferencias histológicas en testículos (Kenfack et al., 2015).

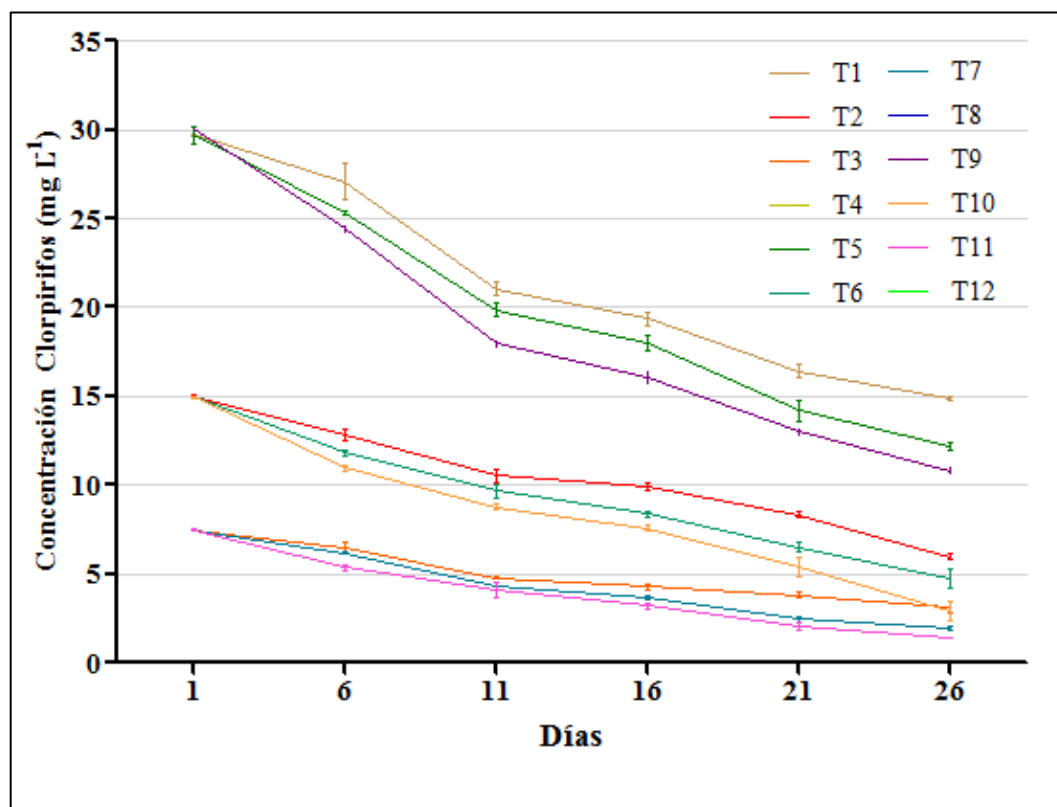


Figura 11. Remoción de Clorpirifos durante los 26 días de evaluación por acción de *Chlorella vulgaris* y *Anabaena azollae* en los diferentes tratamientos.

En la Figura 11 se puede observar la variación de la concentración de Clorpirifos durante la ejecución del ensayo. Se puede observar que el pesticida es removido con eficacia hasta aproximadamente el día 11. Según Matamoros, la eficiencia de remoción se da entre el día 2 y 8; tiempo en el que se remueve el 20% de mecoprop, atrazina, simazina, diazinona, alacloro, clorfenvinfos, lindano, malatión, pentaclorobenceno, clorpirifos, endosulfán y ácido clofíbrico; por acción de un consorcio de microalgas de *Chlorella sp.* y *Scenedesmus sp.* (Matamoros & Rodríguez, 2016).

Bednarska evaluó la concentración Clorpirifos en suelo contaminado al inicio del experimento (t_0) y al final de la fase de absorción (t_{16}); alcanzando una degradación más rápida con *Eisenia fétida* y con el medio enriquecido con cobre;

dejando sólo el 54.4% del contenido inicial de Clorpirifos después de 16 días de tratamiento (Bednarska, Choczyński, Laskowski, & Walczak, 2017).

Tabla 10. Determinación del porcentaje de remoción de diferentes concentraciones de Clorpirifos por acción de *Anabaena azollae* y *Chlorella vulgaris*.

Concentración de Clorpirifos	Especie Biológica		
	<i>Anabaena azollae</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>A.azollae</i> + <i>C. vulgaris</i>
	$\bar{X} \pm S$ (% R _{CPF})	$\bar{X} \pm S$ (% R _{CPF})	$\bar{X} \pm S$ (% R _{CPF})
Control	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
7.5 mg L⁻¹	58.00 ± 3.68	73.79 ± 1.61	81.12 ± 0.31
15 mg L⁻¹	60.04 ± 0.98	68.49 ± 3.71	80.62 ± 3.54
30 mg L⁻¹	49.84 ± 0.16	59.03 ± 1.16	64.04 ± 0.63

Se observa en la Tabla 10, los promedios de los porcentajes de remoción de Clorpirifos según los tratamientos del diseño experimental, en el que se busca determinar la influencia de las especies biológicas y la concentración inicial de pesticidas organofosforado sobre su remoción; durante 26 días de evaluación.

Matamoros et al. (2016) logró obtener un porcentaje similar en sus reactores de microalgas en bloque, a fin de determinar la importancia de las microalgas para eliminar los plaguicidas del agua agrícola; obteniendo una remoción moderada entre el 50-70% de lindano, alacloro, pentaclorobenceno y clorpirifos (Matamoros & Rodríguez, 2016).

Tabla 11. Comparación del porcentaje de remoción de diferentes concentraciones de por acción de *Anabaena azollae* y *Chlorella vulgaris*.

Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significancia (P)
Especie Biológica (A)	1267.12	2	633.56	167.72	0.000...(P<0.01) (A.S)
Concentración de Clorpirifos (B)	30476.41	3	10158.80	2689.26	0.000...(P<0.01) (A.S)
(A) x (B)	523.76	6	87.29	23.11	0.000...(P<0.01) (A.S)
Error	90.66	24	3.78		
Total	120860.58	36			

En la Tabla 11, se muestran los valores del ANOVA de 2 factores obtenido para el porcentaje de remoción de Clorpirifos, al interactuar: Especies biológicas (*Anabaena azollae*, *Chlorella vulgaris* y la combinación de ambas); y 4 concentraciones del pesticida; incluyendo el control (Anexo 3).

Para “ H_0 =no hay diferencia significativa en la remoción de Clorpirifos entre las especies biológicas”; se halló que si existe diferencia altamente significativa, al obtener un valor de $p<0.01$; por lo tanto *A.azollae*, *C. vulgaris* y ambas en consorcio; remueven el Clorpirifos de manera particular.

Para “ H_0 =no hay diferencia significativa en la remoción de Clorpirifos al evaluar las concentraciones iniciales del pesticida”; se halló que si existe diferencia altamente significativa, al obtener un valor de $p<0.01$; por lo tanto la concentración inicial del pesticida es un factor relevante al determinar su remoción.

Finalmente la interacción de ambos factores nos proporciona una diferencia altamente significativa en cuanto a la remoción de Clorpirifos de los medios de cultivo.

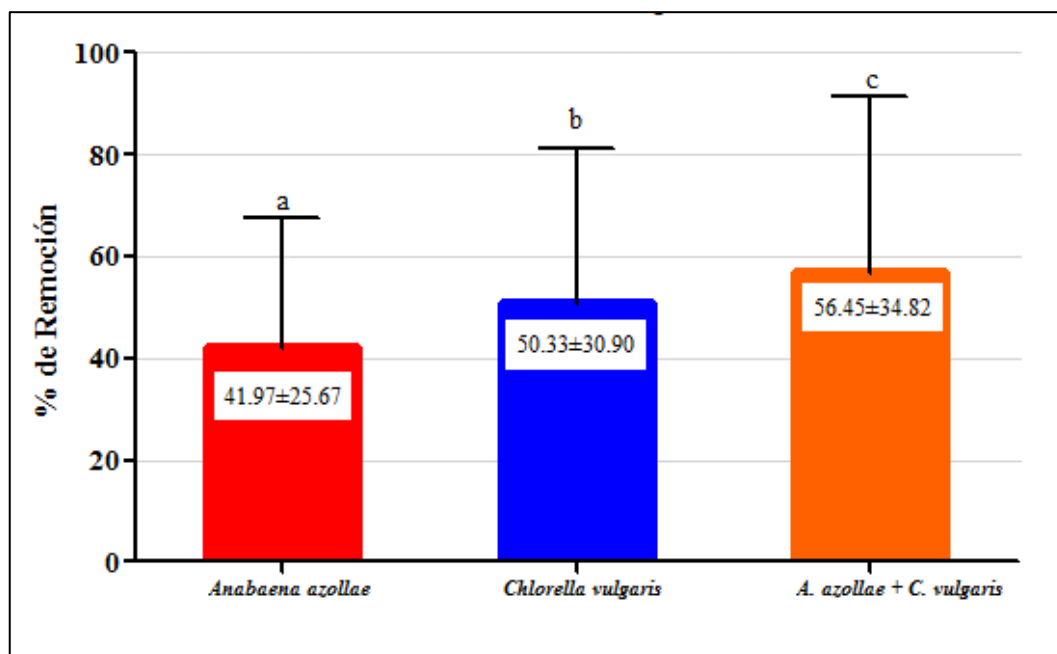


Figura 12. Comparación del porcentaje de remoción de Clorpirifos, según las diferentes especies biológicas, por separado y en consorcio.

Se muestran los promedios y desviaciones estándar en el porcentaje de Clorpirifos removido en la Figura 12, donde los valores mayores se lograron en los cultivos mixtos de *Chlorella vulgaris* con *Anabaena azollae* con $56.45 \pm 34.82\%$ de pesticida organofosforado removido (c).

Las cianobacterias son uno de los grupos más grandes y más importantes de algas en la tierra, son microorganismos fotosintéticos vitales que contribuyen a la fertilidad del suelo al fijar nitrógeno atmosférico, liberando pequeñas cantidades del principal producto fertilizante, amoníaco; así como otros polipéptidos nitrogenados pequeños durante su crecimiento. Sin embargo, las cianobacterias son muy sensibles a herbicidas porque poseen muchas características de plantas

superiores (Shen, Liao, Guo, & Su, 2017). Esta podría ser una razón por la que se obtuvo un bajo valor en la remoción de Clorpirifos.

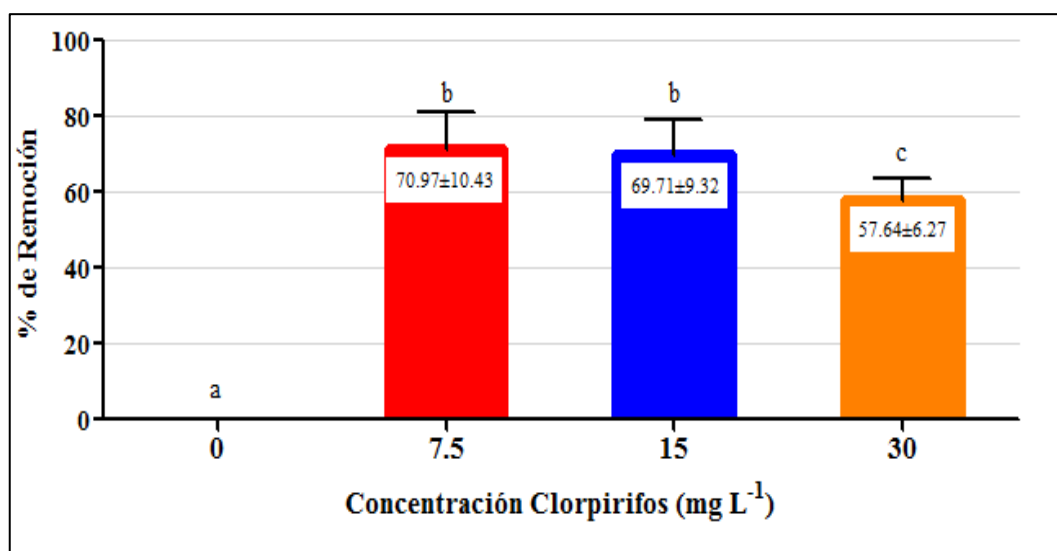


Figura 13. Comparación del porcentaje de remoción de Clorpirifos, según las diferentes concentraciones iniciales del pesticida organofosforado.

La Figura 13 muestra la prueba de Tukey, la que indica que los mayores porcentajes de remoción se obtuvieron en los cultivos con 7.5 mg L⁻¹ de Clorpirifos, con 70.97 ± 10.43% de remoción promedio; seguido de la concentración de 15 mg L⁻¹ de organofosforado con 69.71 ± 9.32% removido, mientras que con 30 mg L⁻¹ de Clorpirifos se obtuvo 57.64 ± 6.27% de remoción promedio.

Para Xing Jian, la viabilidad del uso de plantas acuáticas para acelerar la eliminación de nutrientes adicionales y plaguicidas organofosforados como el clorpirifos aún no está tan estudiada. Los cambios en los parámetros fisicoquímicos, nutrientes, niveles de clorpirifos y comunidad bacteriana planctónica en aguas fueron monitoreados periódicamente a lo largo de su experimento (Xu et al., 2018).

Entonces se puede considerar la concentración de Clorpirifos un factor determinante, para lograr la remoción del cuerpo acuático.

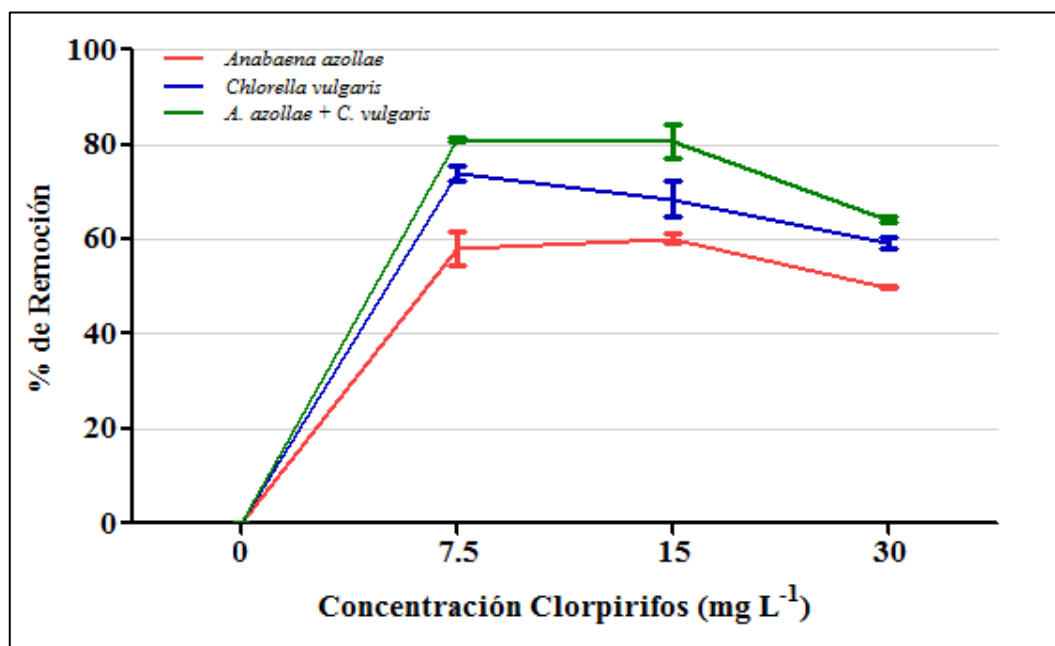


Figura 14. Interacción de la concentración de Clorpirifos y las diferentes especies biológicas en el porcentaje de remoción del pesticida.

La Figura 14 muestra que el mayor porcentaje promedio de remoción de Clorpirifos, se presentó con la interacción de *C. vulgaris* con *A. azollae* a los 7.5 mg L⁻¹ del pesticida, seguida de la interacción con 15 mg L⁻¹ de clorpirifos. Mientras que los porcentajes más bajos se obtuvieron con 30 mg L⁻¹ del pesticida organofosforado en todos los cultivos.

1.4. Evaluación de la productividad de biomasa en el crecimiento microalgal.

El crecimiento de *A. azollae* y *C. vulgaris* en los diferentes tratamientos se determinó por recuento celular y peso seco. La densidad del inóculo inicial que se transfirió a todos los cultivos fue aproximadamente 20x10⁴ Microorganismos mL⁻¹. Luego de 26 días de cultivo se obtuvo una mayor densidad celular en el cultivo mixto de *A. azollae* y *C. vulgaris* en el ensayo control (sin pesticida) con 95.67x10⁴ Microorganismos mL⁻¹ y la menor densidad celular se observó en los cultivos de *A. azollae* en el ensayo control (sin pesticida) con 55.67x10⁴ Microorganismos mL⁻¹.

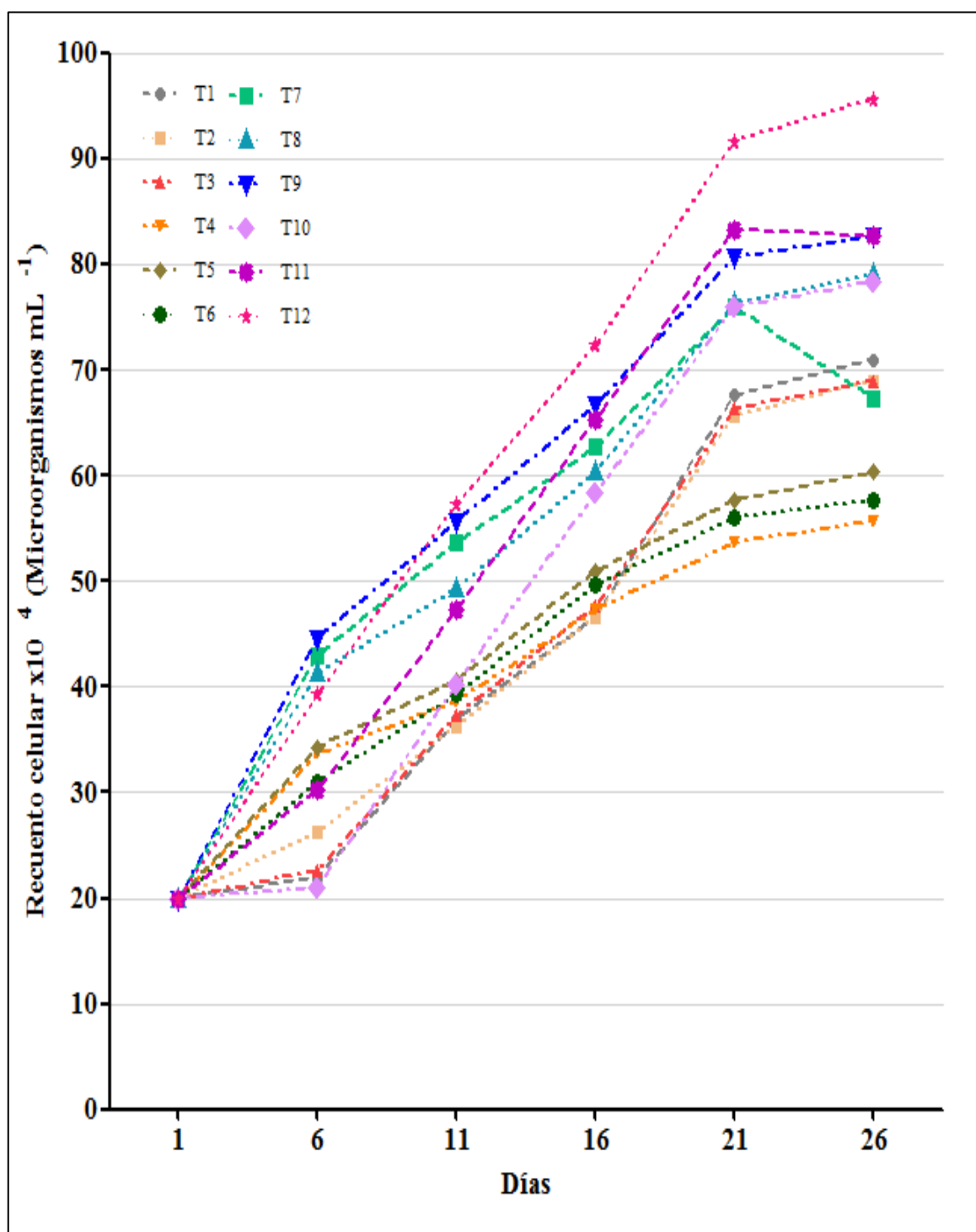


Figura 15. Crecimiento de *Anabaena azollae* y *Chlorella vulgaris* en los diferentes sistemas de cultivo.

En la Figura 15 se muestra el crecimiento de las microalgas y cianobacterias en los diferentes sistemas. La densidad del inóculo inicial que se transfirió a todos los cultivos fue aproximadamente 20×10^4 Microorganismos mL^{-1} .

Luego de 26 días de cultivo, se obtuvo una mayor densidad celular en el cultivo mixto de *A. azollae* y *C. vulgaris* en el ensayo control (sin pesticida) con 95.67×10^4 Microorganismos mL^{-1} y la menor densidad celular se observó en los cultivos de *A. azollae* en el ensayo control (sin pesticida) con 55.67×10^4 Microorganismos mL^{-1} .

La curva de crecimiento que se obtuvo muestra las dos fases principales de desarrollo microalgal; la fase exponencial o fase logarítmica (con máximo rendimiento y alta concentración de proteínas) y la fase estacionaria (caracterizado por un crecimiento relativo o nulo con un alto contenido de carbohidratos y glucógeno). Khalid estudió el crecimiento para otras subespecies de *Chlorella*, cuya fase exponencial se llevó a cabo hasta el día 18 de crecimiento (Khalid et al., 2018).

Qian estudió el crecimiento para *Anabaena flos-aquae*, determinando la fase exponencial y estacionaria. Las células crecieron lentamente en la fase inicial hasta el día 5, y luego se dio la fase exponencial que duró hasta el día 15; entonces las células alcanzaron la fase estacionaria, durante la cual la tasa de crecimiento permaneció básicamente inalterado entre los días 15 y 25. La densidad celular en el día 19 fue 13-18 veces más que la del día 0 (Qian et al., 2017).

Se determinó la tasa de crecimiento específico (μ) para todos los tratamientos durante la fase exponencial que correspondió a los 21 días de crecimiento.

Tabla 12. Evaluación de la tasa de crecimiento específico, tiempo de duplicación y número de generaciones.

Tratamiento	Tasa de crecimiento específica “ μ ” (d ⁻¹)	Tiempo de duplicación (d)	Número de Generaciones (d ⁻¹)
T1	0.06 ± 0.00	11.38 ± 0.16	0.09 ± 0.00
T2	0.06 ± 0.00	11.71 ± 0.75	0.09 ± 0.01
T3	0.06 ± 0.00	11.57 ± 0.36	0.09 ± 0.00
T4	0.05 ± 0.00	14.09 ± 0.79	0.07 ± 0.00
T5	0.05 ± 0.00	13.14 ± 0.77	0.08 ± 0.00
T6	0.05 ± 0.00	13.54 ± 0.97	0.07 ± 0.01
T7	0.07 ± 0.00	10.41 ± 0.46	0.10 ± 0.00
T8	0.07 ± 0.00	10.35 ± 0.15	0.10 ± 0.00
T9	0.07 ± 0.00	9.94 ± 0.14	0.10 ± 0.00
T10	0.07 ± 0.00	10.41 ± 0.47	0.10 ± 0.00
T11	0.07 ± 0.00	9.73 ± 0.41	0.10 ± 0.00
T12	0.08 ± 0.00	9.13 ± 0.39	0.11 ± 0.00

En la Tabla 12 se describen los valores para la tasa de crecimiento específico determinada a través de la densidad celular; tiempo de duplicación y el número de generaciones. Con las condiciones ambientales óptimas, las microalgas durante su fase exponencial crecen rápidamente y pueden duplicar su biomasa tanto como ocho veces al día (Tandon & Jin, 2017).

Tabla 13. Determinación de la productividad de biomasa de *Anabaena azollae* y *Chlorella vulgaris* a diferentes concentraciones de clorpirifos.

Concentración de Clorpirifos	Especie Biológica		
	<i>Anabaena azollae</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>A. azollae</i> + <i>C. vulgaris</i>
	$\bar{X} \pm S \text{ (g L}^{-1} \text{ d}^{-1}\text{)}$	$\bar{X} \pm S \text{ (g L}^{-1} \text{ d}^{-1}\text{)}$	$\bar{X} \pm S \text{ (g L}^{-1} \text{ d}^{-1}\text{)}$
Control	0.02 ± 0.01	0.04 ± 0.00	0.01 ± 0.01
7.5 mg L⁻¹	0.01 ± 0.00	0.04 ± 0.01	0.02 ± 0.00
15 mg L⁻¹	0.01 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.00
30 mg L⁻¹	0.00 ± 0.00	0.04 ± 0.01	0.02 ± 0.00

Se observa en la Tabla 13 los promedios de productividad por día de biomasa celular para *Anabaena azollae* y *Chlorella vulgaris*, y las diferentes concentraciones iniciales de Clorpirifos hasta los 26 días de evaluación. Se obtuvieron los promedios más altos de productividad con la especie *C. vulgaris* con valores ente 0.03 a 0.04 g L⁻¹ d⁻¹. Por otro lado, la productividad de los cultivos mixtos fue similar para todas las concentraciones de Clorpirifos; el cual podría ser un factor favorable para el desarrollo de ambas especies.

Los pesticidas pueden producir efectos nocivos en las microalgas al inhibir su crecimiento o alterando la fotosíntesis. El insecticida organofosforado triclorfon disminuyó el crecimiento celular y el contenido de pigmento de *Scenedesmus bijuga* y *Dunaliella salina* (Huang, Li, Liu, & Lin, 2014).

Tabla 14. Comparación de la productividad de biomasa de *Anabaena azollae* y *Chlorella vulgaris* en diferentes concentraciones de clorpirifos.

Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significancia (P)
Especie Biológica (A)	0.01	2	0.00	102.23	0.000...(P<0.01) (A.S.)
Concentración de Clorpirifos (B)	0.00	3	0.00	0.61	0.618...(P<0.01) (N.S.)
(A) x (B)	0.00	6	0.00	2.77	0.034...(P<0.01) (S.)
Error	0.00	24	0.00		
Total	0.03	36			

En la Tabla 14, se muestran los valores del ANOVA de 2 factores para la productividad de biomasa, al interactuar: 3 tipos de cultivos biológicos (*Anabaena azollae*, *Chlorella vulgaris* y la combinación de ambas) y 4 concentraciones de Clorpirifos (Anexo 3).

Para “ H_0 =no hay diferencia significativa en la productividad de biomasa entre las especies biológicas”; se determinó que si existe diferencia altamente significativa, al obtener un valor de $p<0.01$; por lo tanto, en *A.azollae*, *C. vulgaris* y ambas en un cultivo mixto; la productividad de biomasa obtenida a través del peso seco depende de la especie biológica.

Para “ H_0 =no hay diferencia significativa en la productividad de biomasa al evaluar las concentraciones iniciales del pesticida”; se halló que no existe diferencia

significativa, al obtener un valor de $p=0.618$; por lo tanto la concentración inicial del pesticida no fue un factor relevante al determinar la producción de biomasa.

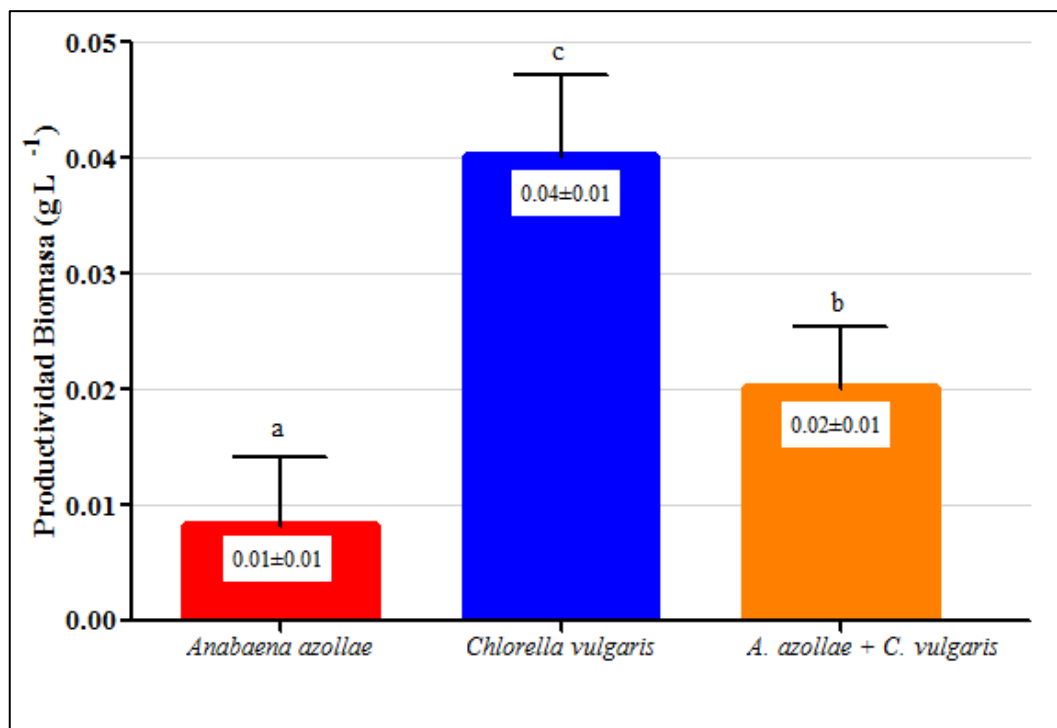


Figura 16. Comparación de la productividad de biomasa, según las especies biológicas cultivadas en consorcio y por separado.

La Figura 16 muestra los promedios y desviaciones estándar en la productividad de biomasa microalgal, donde los valores de mayor productividad se observan en los cultivos con *Chlorella vulgaris* con 0.04 ± 0.01 g L⁻¹ d⁻¹ (c).

La diferencia en la productividad de biomasa, se puede deber a que las microalgas son los organismos fotosintéticos que crecen más rápido, además de consumir CO₂ y compuestos basados en N₂, son uno de los productores más importantes de oxígeno. Su biomasa contiene aproximadamente 50% de carbono por peso seco. Durante la producción de 100 toneladas de biomasa de microalgas usando luz natural o artificial, aproximadamente 180 toneladas de CO₂ pueden ser

fijadas. También se debe nombrar la estimulación para acumular lípidos neutros, sobretodo en *Chlorella sp.* (H. Chen et al., 2018).

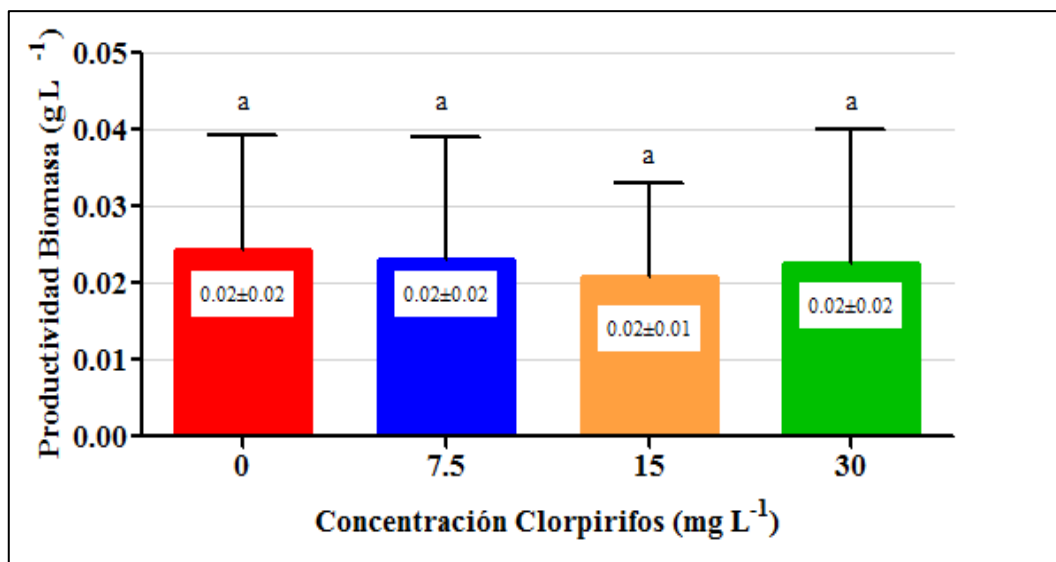


Figura 17. Comparación de la productividad de biomasa, según las diferentes concentraciones del pesticida organofosforado.

En la Figura 17 se muestra la prueba de Tukey, la misma que indica que no existió diferencia significativa entre los tratamientos en cuanto a la productividad de biomasa, ya que la capacidad de las microalgas, en especial *Chlorella sp.*; para cargar sus células con lípidos incrementa el contenido en biomasa, pues poseen mayor tasa de crecimiento y productividad, acelerando la generación de biomasa en un corto período de tiempo (Mohd-Sahib et al., 2017). Al contar con la microalga *Chlorella vulgaris* en todas las concentraciones de clorpirifos, los valores de productividad se asemejan para todos los tratamientos.

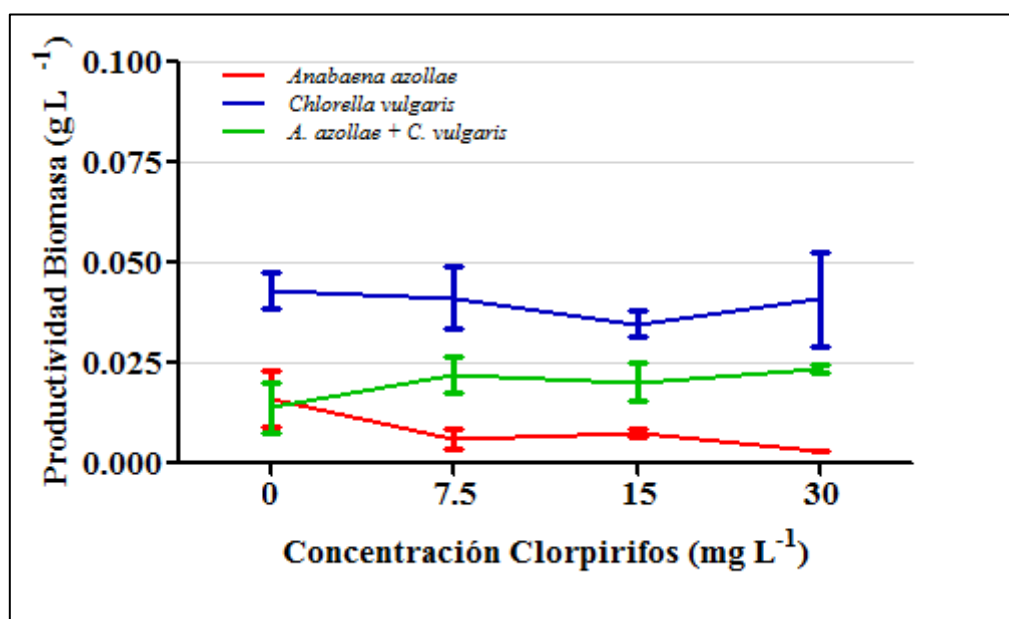


Figura 18. Interacción de la concentración de Clorpirifos y las diferentes especies biológicas en la productividad de Biomasa.

La Figura 18 muestra que la mayor productividad de biomasa promedio en la remoción de Clorpirifos, se presentó con la interacción de *Chlorella vulgaris* y en los tratamientos sin Clorpirifos con valores de $0.043 \pm 0.00 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ de biomasa promedio; seguido de la interacción de *Chlorella vulgaris* y 7.5 mg L^{-1} de Clorpirifos, con $0.041 \pm 0.00 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ de biomasa.

1.5. Cuantificación de la producción de clorofila por *Chlorella vulgaris* y *Anabaena azollae* a diferentes concentraciones de Clorpirifos.

El contenido de clorofila “a” fue cuantificado mediante espectrofotometría, a partir de la biomasa de *Chlorella vulgaris* y *Anabaena azollae* en todos los tratamientos ejecutados hasta el día 26 de crecimiento, bajo condiciones de laboratorio; a continuación se muestran los resultados obtenidos en la Tabla 15.

Tabla 15. Determinación de la producción de clorofila “a” en los cultivos de *Anabaena azollae* y *Chlorella vulgaris* a diferentes concentraciones de clorpirifos.

Concentración de Clorpirifos	Especie Biológica		
	<i>Anabaena azollae</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>A. azollae</i> + <i>C. vulgaris</i>
	$\bar{X} \pm S$ (mg L ⁻¹ Chl a)	$\bar{X} \pm S$ (mg L ⁻¹ Chl a)	$\bar{X} \pm S$ (mg L ⁻¹ Chl a)
Control	2.50 ± 0.05	21.81 ± 0.22	13.56 ± 0.30
7.5 mg L⁻¹	3.20 ± 0.06	28.37 ± 0.74	12.17 ± 0.13
15 mg L⁻¹	1.80 ± 0.01	31.92 ± 2.34	16.48 ± 0.17
30 mg L⁻¹	2.00 ± 0.06	26.61 ± 0.09	13.31 ± 0.33

Se observa en la Tabla 15 los promedios alcanzados con sus respectivas desviaciones estándar para cada tratamiento, obteniendo mayores concentraciones de clorofila “a” en los cultivos de *Chlorella vulgaris* y los más bajos con *Anabaena azollae*, como se sabe la clorofila es un componente esencial de los cloroplastos que son responsables de la fotosíntesis.

De todas las formas de clorofila, la clorofila “a” es el pigmento más importante para conversión de la energía lumínica a química y *Chlorella* puede contener grandes cantidades de clorofila, de manera similar a plantas superiores, y en concentraciones mucho más altas (Nakanishi & Deuchi, 2014).

Chakraborty expuso a *Anabaena sphaerica* a diferentes concentraciones de malatión (0, 5, 10, 20, 30 µg mL⁻¹) ocasionando toxicidad a la cianobacteria en las concentraciones más altas, sin embargo a 5 µg mL⁻¹ malatión indujeron ligeramente el crecimiento un 3.13% más que la prueba control en el día 12 de incubación (Chakraborty, Tiwari, Singh, Srivastava, & Mishra, 2017). El crecimiento se

evidenció evaluando la concentración de clorofila, ficocianinas, proteínas y eficiencia fotosintética. Tal comportamiento se puede observar con las concentraciones de clorofila en los cultivo de *Anabaena azollae*.

Se ha reportado que herbicidas como tiobencarb, inhibió la síntesis de proteínas; ocasionando efectos secundarios sobre el crecimiento Chlorophytas y Cyanophytas. En el caso de las cianobacterias como *Anabaena* y *Nostoc*, se ha reportado que el tiobencarb redujo la formación de heterocistos e inhibe la asimilación fotosintética del CO₂ (Battah, Shabana, Kobbia, & Eladel, 2001).

Tabla 16. Comparación de la producción de clorofila “a” en los cultivos de *Anabaena azollae* y *Chlorella vulgaris* a diferentes concentraciones de clorpirifos.

Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significancia (P)
Especie Biológica (A)	3697.69	2	1848.84	3483.80	0.000...(P<0.01) (A.S.)
Concentración de Clorpirifos (B)	79.29	3	26.43	49.81	0.000...(P<0.01) (A.S.)
(A) x (B)	113.84	6	18.97	35.75	0.000...(P<0.01) (A.S.)
Error	12.74	24	0.53		
Total	11449.38	36			

En la Tabla 16, se muestran los valores del ANOVA de 2 factores para la concentración de clorofila “a” producida; teniendo como variables: las 2 especies biológicas cultivadas en consorcio y por separado, y para las 4 concentraciones de Clorpirifos (Anexo 3).

Para “ H_0 =no hay diferencia significativa en la concentración de clorofila a producida por las especies biológicas”; se determinó que si existe diferencia altamente significativa, al obtener un valor de $p<0.01$; por lo tanto, en *A.azollae*, *C. vulgaris* y ambas en un cultivo mixto; la concentración de clorofila “a” depende del tipo de microorganismo.

Para “ H_0 =no hay diferencia significativa en la concentración de clorofila a al evaluar las concentraciones iniciales del pesticida”; se halló que si existe diferencia altamente significativa, al obtener un valor de $p<0.01$; por lo tanto, la concentración de Clorpirifos afectó la producción de clorofila en los tratamientos.

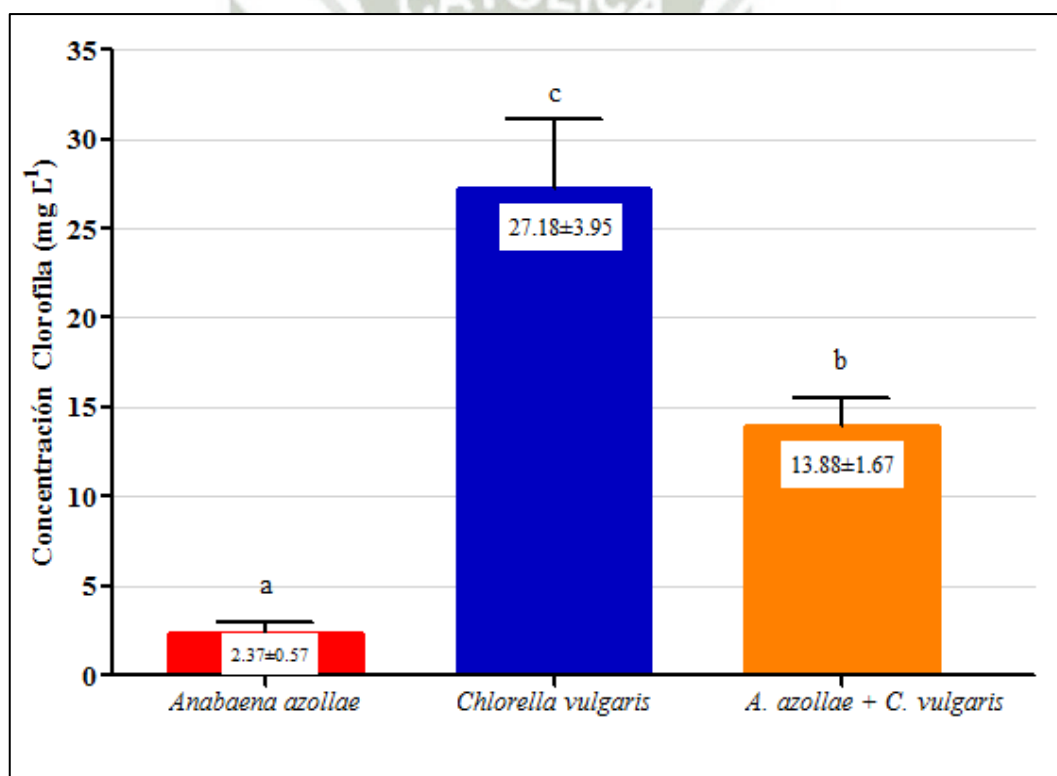


Figura 19. Comparación de la producción de clorofila “a”, según las especies biológicas cultivadas en consorcio y por separado.

Se muestran los promedios y desviaciones estándar en la concentración de clorofila, donde la mayor concentración se observa en los cultivos de *Chlorella vulgaris* con 27.18 ± 3.95 mg L⁻¹ de clorofila “a” (c).

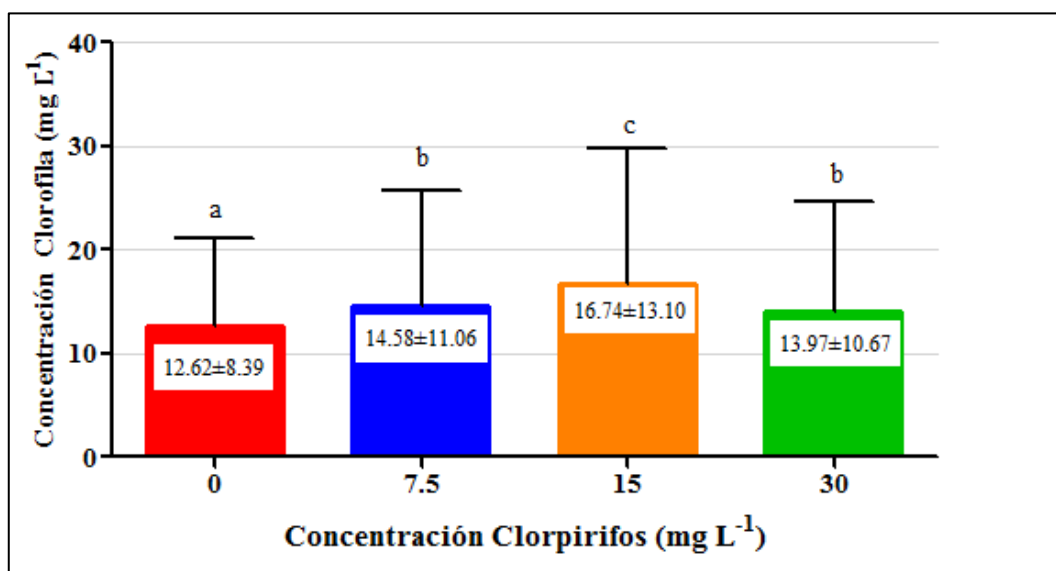


Figura 20. Comparación de la producción de clorofila “a”, según las diferentes concentraciones del pesticida organofosforado.

Se muestra la prueba de Tukey, la misma que indica que con la concentración de 15 mg L⁻¹ de Clorpirifos se alcanzó la mayor concentración de clorofila “a” promedio en todos los tratamientos ejecutados, con 16.74 ± 13.10 mg L⁻¹; seguido de la concentración de 7.5 mg L⁻¹ de Clorpirifos con 14.58 ± 11.06 mg L⁻¹. Con 30 mg L⁻¹ de Clorpirifos se obtuvo 13.97 ± 10.67 mg L⁻¹ de clorofila promedio, mientras que sin Clorpirifos se presentó la menor concentración con 12.62 ± 8.39 mg L⁻¹.

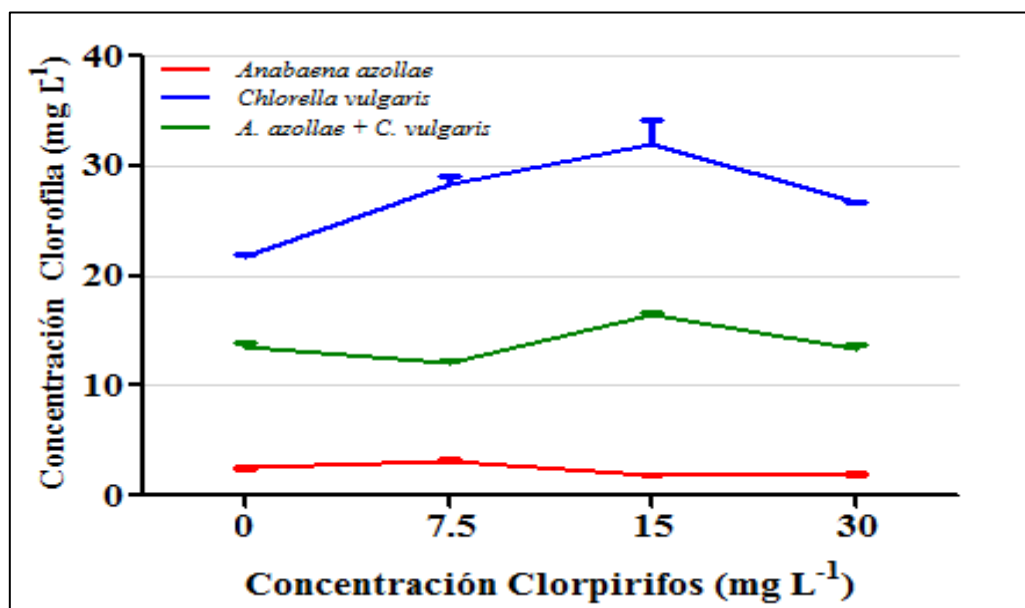


Figura 21. Interacción de la concentración de Clorpirifos y las diferentes especies biológicas en la producción de clorofila “a”.

La Figura 21 muestra que la mayor concentración de clorofila “a” promedio, se obtuvo con la interacción de 15 mg L⁻¹ de Clorpirifos y en el cultivo de *Chlorella vulgaris* con 31.92 ± 2.34 mg L⁻¹ de clorofila; seguido de la interacción de 7.5 mg L⁻¹ de Clorpirifos, también con *Chlorella vulgaris*; con 28.37 ± 0.74 mg L⁻¹ de clorofila “a” promedio. Los resultados mostraron un efecto positivo en los cultivos de microalgas y cianobacterias con las diferentes concentraciones del pesticida organofosforado sobre la producción de clorofila.

Finalmente, los resultados obtenidos durante todo el desarrollo del proyecto; nos proponen que, en las observaciones del microscopio se mostraron que las células de *Chlorella vulgaris* son predominantes a lo largo de los experimentos en comparación a la cianobacteria *Anabaena azollae*, estos resultados fueron similares a los observados en el estudio realizado por Matamoros & Rodríguez, (2016), donde la concentración promedio de biomasa en los cultivos de alimentación continua fue de 150 mg L⁻¹, 560 mg L⁻¹ y 634 mg L⁻¹ en un tiempo de 2, 4 y 8 días,

respectivamente. Otros estudios también encontraron resultados similares mostrando que a cierto tiempo de exposición hay una mayor eliminación de plaguicidas adsorbidos por la biomasa (Martínez, Sánchez, Jiménez, El Yousfi, & Muñoz, 2000).

Por ejemplo, Matamoros et al., (2007) informaron que con tiempo de exposición de 4 días con consorcio de *Chlorella sp.* y *Scenedesmus sp.* fue capaz de eliminar hasta el 90% de lindano, endosulfán y pentaclorobenceno y entre 80-90% de alacloro y clorpirifos, y de 20% de mecoprop y simazine (Matamoros, Puigagut, García, & Bayona, 2007). Moore también informó que después de 35 días, un promedio de 52% de atrazina se transfiere o transforma (Moore, Rodgers Jr, Cooper, & Smith Jr, 2000). Del mismo modo, Runes et al. (2003) informaron que la atrazina removida fue de 16-24% en 7 días (Runes, Jenkins, Moore, Bottomley, & Wilson, 2003). Otros estudios mostraron que el clorpirifos disminuyó en un 98% después de 3 días de incubación (Sherrard, Berr, Murray-Gulde, Rodgers, & Shah, 2004).

En el estudio realizado por Matamoros & Rodríguez, (2016), se observó una eliminación de hasta el 97% del clorpirifos, este autor menciona que la estrategia de un cultivo de alimentación continua ayuda a la degradación de pesticidas adsorbidos a las microalgas debido al mayor recambio de microalgas (fase de crecimiento exponencial) y la liberación de pesticidas en el compartimento acuoso, donde los compuestos pueden eliminarse por biodegradación (clorpirifos) o fotodegradación (pentaclorobenceno). En el caso de los cultivos discontinuos, las microalgas alcanzan la fase de crecimiento estacionario y, por lo tanto, disminuyen su capacidad para eliminar los plaguicidas. Por lo tanto, aunque los estudios de matraces agitados pueden ser útiles para tener una idea inicial de la capacidad de las microalgas para eliminar contaminantes, también se deben incluir estudios paralelos de alimentación continua, ya que se ha demostrado que son capaces de aumentar la eficacia de eliminación de pesticidas (Matamoros & Rodríguez, 2016).

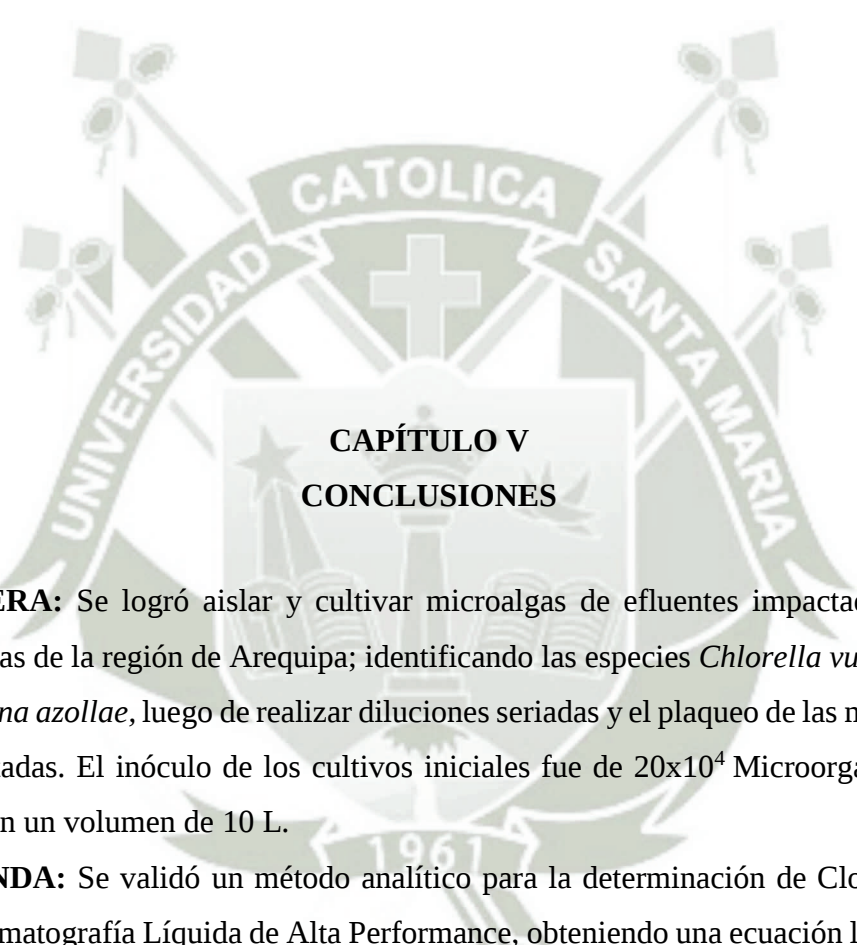
El crecimiento en términos de clorofila “a” fue mayor en las células no tratadas, en comparación con el cultivo tratado lo cual podría deberse a la inhibición

de la actividad fotosintética de las cianobacteria *Anabaena azollae* por el pesticida; por ejemplo en un estudio realizado por Sahu, Bastia y Rath (2015) con *Anabaena variabilis* y *Nostoc commune* menciona que el contenido de estos pigmentos disminuyó a los 16 días de cultivo, a la concentración más alta de pesticidas y concluyen que ambas cepas de cianobacterias en general no resisten a altas concentraciones de insecticidas Monocrotofos y Clorpirifos, revelando que el contenido de proteína se redujo a un máximo a mayores concentraciones de ambos insecticidas lo que afectó los carotenoides totales de *Anabaena variabilis* y *Nostoc commune* (D. Sahu, 2015).

Por el contrario, Subramanian; en un estudio usando compuestos organofosforados los cuales no tuvieron ningún efecto sobre el crecimiento de las cianobacterias (Subramanian, Sekar, & Sampooram, 1994).

Así mismo, cultivos axénicos de *Nostoc*, *Oscillatoria* y *Phomidium* aislados del suelo enriquecido con metil paratión crecieron en medios suplementados con metil paratión u otros pesticidas organofosforados como única fuente de fósforo orgánico y nitrato utilizando el fósforo del pesticida para su crecimiento y desarrollo (Subramanian et al., 1994). Las cianobacterias también fueron capaces de oxidar el grupo nitro de para-nitrofenol acompañado por la liberación de nitrito en los medios de crecimiento (Megharaj, Pearson, & Venkateswarlu, 1991).

No se sabe qué sistema enzimático de cianobacterias está involucrado en este proceso; sin embargo, es probable que el metabolismo/asimilación del nitrito liberado dependa de la actividad de la nitrito reductasa codificada por el operón nir. También se observó el vínculo entre el metabolismo del nitrógeno y la eficacia de la utilización del fósforo a partir de plaguicidas organofosforados (Subramanian et al., 1994), sin embargo, los autores no analizaron los posibles efectos de diversas fuentes de nitrógeno fijado sobre la biodegradación. Otras investigaciones también muestran la supresión del crecimiento en cultivos de *Chlorella vulgaris* expuestos a altas concentraciones de oproturón y terbutrina (Rioboo, González, Herrero, & Cid, 2002) y en cultivos de *C. vulgaris* y *Anabaena doliolum* expuestos a los herbicidas dimetoato y endosulfán (Panda, Mohapatra, & Mohanty, 1999).



CAPÍTULO V CONCLUSIONES

PRIMERA: Se logró aislar y cultivar microalgas de efluentes impactados con pesticidas de la región de Arequipa; identificando las especies *Chlorella vulgaris* y *Anabaena azollae*, luego de realizar diluciones seriadas y el plaqueo de las muestras recolectadas. El inóculo de los cultivos iniciales fue de 20×10^4 Microorganismos mL^{-1} con un volumen de 10 L.

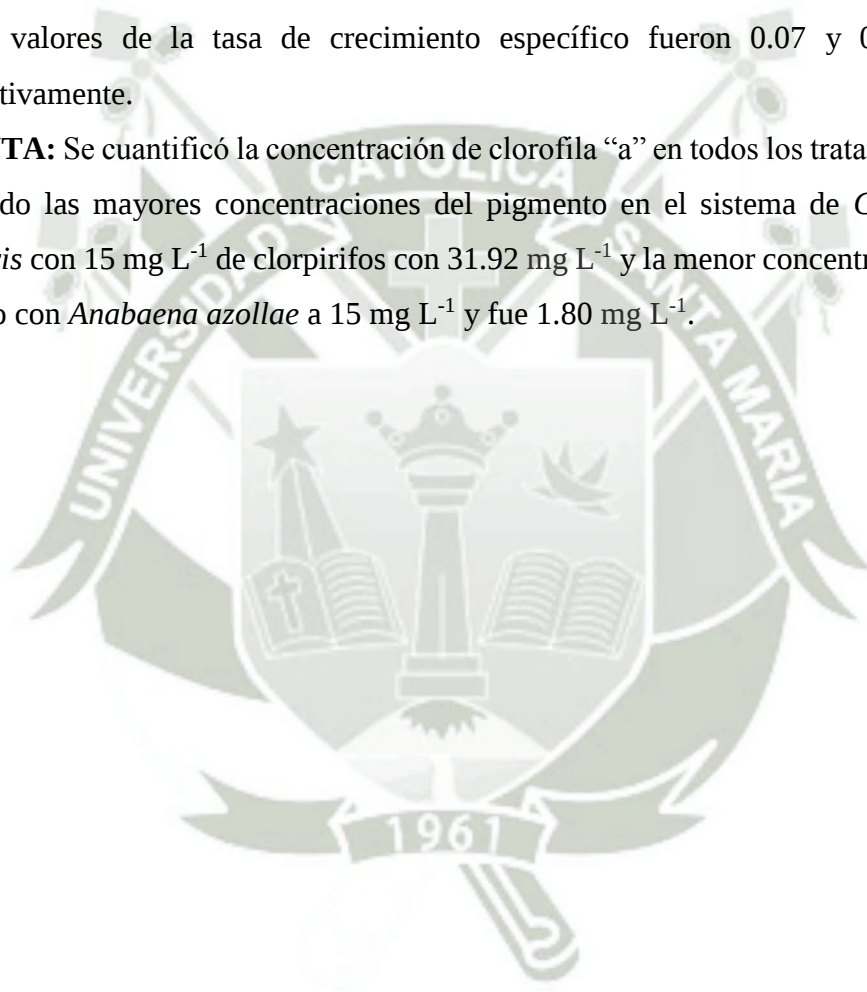
SEGUNDA: Se validó un método analítico para la determinación de Clorpirifos por Cromatografía Líquida de Alta Performance, obteniendo una ecuación lineal de $y=9087.4x-3779.3$ con un R^2 de 0.9994. En cuanto a la exactitud, el valor para la desviación estándar relativa fue 1.10%, el límite de detección fue 0.34 mg L^{-1} y el límite de cuantificación fue 0.73 mg L^{-1} .

TERCERO: Se determinó el porcentaje de remoción de Clorpirifos con las diferentes especies biológicas por separado y en consorcio; y a diferentes concentraciones iniciales del pesticida. El mayor porcentaje de clorpirifos removido

fue 81.12% con el sistema de *Chlorella vulgaris* y *Anabaena azollae* a 7.5 mg L⁻¹ de pesticida; y el porcentaje más bajo fue 49.84% con el sistema de *Anabaena azollae* a 30 mg L⁻¹ de pesticida.

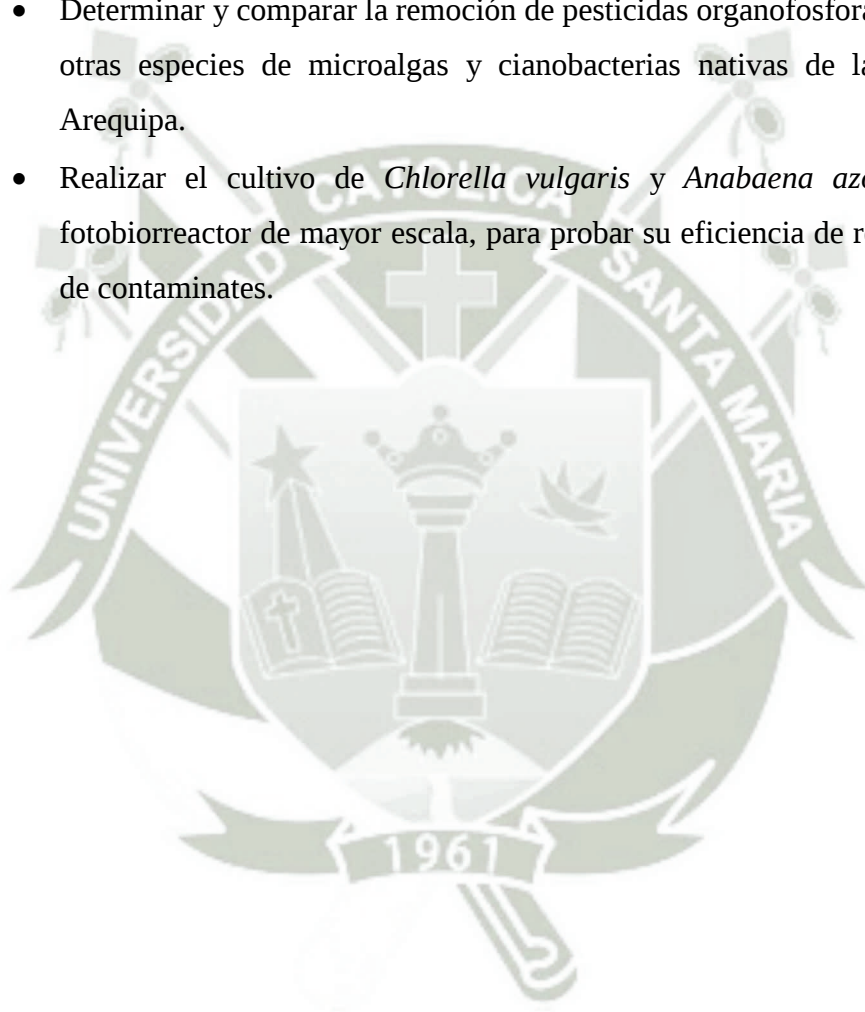
CUARTA: Se evaluó el crecimiento celular de los diferentes tratamientos a través de la productividad de biomasa, la cual fue mayor para el sistema control de *Chlorella vulgaris* (sin pesticida) con 0.04 g L⁻¹ d⁻¹; y la productividad más baja fue con el sistema de *Anabaena azollae* a 30 mg L⁻¹ de pesticida con 0.003 g L⁻¹ d⁻¹; cuyos valores de la tasa de crecimiento específico fueron 0.07 y 0.06 d⁻¹, respectivamente.

QUINTA: Se cuantificó la concentración de clorofila “a” en todos los tratamientos, logrando las mayores concentraciones del pigmento en el sistema de *Chlorella vulgaris* con 15 mg L⁻¹ de clorpirifos con 31.92 mg L⁻¹ y la menor concentración se obtuvo con *Anabaena azollae* a 15 mg L⁻¹ y fue 1.80 mg L⁻¹.



RECOMENDACIONES

- Realizar estudios a nivel de expresión génica respecto de la resistencia–adaptación a pesticidas organofosforados implicados en la biosíntesis de las clorofilas a través de una plataforma proteómica.
- Determinar y comparar el uso de otros tipos de fotobiorreactores como tubulares o de panel para la remoción de pesticidas organofosforados.
- Determinar y comparar la remoción de pesticidas organofosforados con otras especies de microalgas y cianobacterias nativas de la región Arequipa.
- Realizar el cultivo de *Chlorella vulgaris* y *Anabaena azollae* en fotobiorreactor de mayor escala, para probar su eficiencia de remoción de contaminates.



REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Abalde J., Cid A., Hidalgo J P., Torres E. y Herrero C. (1995). Microalgas: Cultivo y Aplicaciones. Universidad de La Coruña, España.
2. Aksu, Z., Dönmez, G. (2006). Binar biosorption of cadmium (II) and nickel(II) onto dried *Chlorella vulgaris*: Co-ion effect on mono-component isotherm parameters. *Process Biochemistry* 41: 860–868.
3. Alexander, M., (1995). How toxic are toxic-chemicals in soil. *Environ. Sci. Technol.* 29, 2713–2717.
4. Andersen, R. A. (2005). *Algal Culturing Techniques* 1st Edition. USA: Elsevier Academic Press.
5. Assadi B. (2010). A review of the structure and function of organophosphates. *Faculty Paramed Sci Army Islamic Republic Iran* 5: 24–30.
6. Baalbaki, A., Zein Eddine, N., Jaber, S., Amasha, M., & Ghauch, A. (2018). Rapid quantification of persulfate in aqueous systems using a modified HPLC unit. *Talanta*, 178(Supplement C), 237-245.
7. Baczynski, T.P., Pleissner, D., Krylow, M., (2012). Bioremediation of chlorinated pesticides in field-contaminated soils and suitability of Tenax solid- phase extraction as a predictor of its effectiveness. *Clean: Soil, Air, Water* 40, 864–869.
8. Bargańska, Ż., Ślebioda, M., & Namieśnik, J. (2013). Pesticide residues levels in honey from apiaries located of Northern Poland. *Food Control*, 31(1), 196-201.
9. Battah, M. G., Shabana, E. F., Kobbia, I. A., & Eladel, H. M. (2001). Differential Effects of Thiobencarb Toxicity on Growth and Photosynthesis of *Anabaena variabilis* with Changes in Phosphate Level. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 49(3), 235-239.
10. Bednarska, A. J., Choczyński, M., Laskowski, R., & Walczak, M. (2017). Combined effects of chlorpyrifos, copper and temperature on

- acetylcholinesterase activity and toxicokinetics of the chemicals in the earthworm *Eisenia fetida*. *Environmental Pollution*, 220(Part A), 567-576.
11. Bhushan, C., Bhardwaj, A., & Misra, S. S. (2013). State of Pesticide Regulations in India. Centre for Science and Environment, New Delhi, 1–72.
 12. Bigus, P., Tobiszewski, M., & Namieśnik, J. (2014). Historical records of organic pollutants in sediment cores. *Marine Pollution Bulletin*, 78(1), 26-42.
 13. Bischoff, H. W., & Bold, H. C. (1963). Phycological studies IV. Some soil algae from enchanted rock & related algal species. . Univ. of Texas Publ., 6318, 1–95.
 14. Bouwer, E. J., & Zehnder, A. J. B. (1993). Bioremediation of organic compounds — putting microbial metabolism to work. *Trends in Biotechnology*, 11(8), 360-367.
 15. Brett N., Dittmann E., Rouhiainen L., Bass A. R., Schaub V., Sivonen K. y Börner T. (1999). Nonribosomal peptide síntesis and toxigenicity of cyanobacteria. *Journal of Bacteriology*. 4089-4097.
 16. Brito, N. M., Navickiene, S., Polese, L., Jardim, E. F. G., Abakerli, R. B., & Ribeiro, M. L. (2002). Determination of pesticide residues in coconut water by liquid–liquid extraction and gas chromatography with electron-capture plus thermionic specific detection and solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with ultraviolet detecti. *Journal of Chromatography A*, 957(2), 201–209.
 17. Brown J. (1989). Nutricional aspects of microalgae used in mariculture: a literatura review. CSIRO Marine Reports, N°2005.
 18. Carr, N. G. (1969). Chapter II Growth of Prototrophic Bacteria and Blue-Green Algae. In J. R. Norris & D. W. Ribbons (Eds.), *Methods in Microbiology* (Vol. 3, pp. 53-77): Academic Press.

19. Casserly, D.M., Davis, E.M., Downs, T.D., Guthrie, R.K. (1983). Sorption of Organics by *Selenastrum capricornutum*. Water Res. Vol. 17, No. 1. 1591-159.
20. Chakraborty, J., Das, S., (2016). Molecular perspectives and recent advances in microbial remediation of persistent organic pollutants. Environ. Sci. Pollut. Res. 23, 16883–16903.
21. Chakraborty, S., Tiwari, B., Singh, S. S., Srivastava, A. K., & Mishra, A. K. (2017). Differential physiological, oxidative and antioxidative responses of cyanobacterium *Anabaena sphaerica* to attenuate malathion pesticide toxicity. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 11(Supplement C), 56-63.
22. Chaurasia, A. K., & Apte, S. K. (2011). Improved Eco-Friendly Recombinant *Anabaena* sp. Strain PCC7120 with Enhanced Nitrogen Biofertilizer Potential. Applied and Environmental Microbiology, 77(2), 395-399.
23. Chawla, N., Suneja, S., Kukreja, K., Kumar, R., (2013). Bioremediation: an emerging technology for remediation of pesticides. Res. J. Chem. Environ 17, 88–105.
24. Chen, C-Y., Chang, H-W., Kao, P-C., Pan, J-L., Chang, J-S. (2012). Biosorption of cadmium by CO₂-fixing microalga *Chlorella vulgaris* obliquus CNW-N. Bioresource Technology 105: 74–80
25. Chen, H., Wang, J., Zheng, Y., Zhan, J., He, C., & Wang, Q. (2018). Algal biofuel production coupled bioremediation of biomass power plant wastes based on *Chlorella* sp. C2 cultivation. Applied Energy, 211, 296-305.
26. Chen, M., Liu, C., Chen, P., Tong, H., Li, F., Qiao, J., & Lan, Q. (2016). Dynamics of the microbial community and Fe(III)-reducing and dechlorinating microorganisms in response to pentachlorophenol transformation in paddy soil. Journal of Hazardous Materials, 312(Supplement C), 97-105.

27. Chen, S., Chang, S., Deng, Y., An, S., Hu, Dong, Y.H., Zhou, J., Hu, M., Zhong, G., Zhang, L.H., (2014). Fenpropathrin biodegradation pathway in bacillus sp. DG-02 and its potential for bioremediation of pyrethroid-contaminated soils. J. Agric. Food Chem. 62, 2147–2157.
28. Chen, X., Goh, Q. Y., Tan, W., Hossain, I., Chen, W. N., & Lau, R. (2011). Lumostatic strategy for microalgae cultivation utilizing image analysis and chlorophyll a content as design parameters. Bioresource Technology, 102(10), 6005-6012.
29. Chu, S. P. (1942). The Influence of the Mineral Composition of the Medium on the Growth of Planktonic Algae: Part I. Methods and Culture Media. Journal of Ecology, 30, 284-325.
30. Cooper NL, Bidwell JR. (2006). Cholinesterase inhibition and impacts on behavior of the Asian clam, *Corbicula fluminea*, after exposure to an organophosphate insecticide. Aquatic Toxicol 76:258–67.
31. Council, N. R. (2007). Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy. Washington, DC: The National Academies Press.
32. D. Sahu, A. K. B., B. Rath. (2015). Toxicity of Organophosphorus pesticides on ricefield Cyanobacteria. International Journal of Geology, Agriculture and Environmental Sciences, 3(6), 6-10.
33. Dai, Y., Li, N., Zhao, Q., Xie, S., (2015). Bioremediation using *Novosphingobium* strain DY4 for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-contaminated.
34. Damásio, J., Fernández-Sanjuan, M., Sánchez-Avila, J., Lacorte, S., Prat, N., Rieradevall, M., Barata, C. (2011). Multi-biochemical responses of benthic macroinvertebrate species as a complementary tool to diagnose the cause of community impairment in polluted rivers. Water research, 45(12), 3599-3613.
35. Dasika, R., Tangirala, S., & Naishadham, P. (2012). Pesticide residue analysis of fruits and vegetables. J Environ Chem Ecotoxicol, 4(2), 19–28.

36. de-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2010). Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects. *Bioresource Technology*, 101(6), 1611-1627.
37. de-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2010). Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects. *Bioresource Technology*, 101(6), 1611-1627.
38. Devi, N. L., & Raha, P. (2013). Contamination of Organochlorine pesticides (OCPs) in India. *Bulletin of Environmental and Scientific Research*, 2(1), 9–14.
39. Dimitrijević, A., Ignjatović, L., Tot, A., Vraneš, M., Zec, N., Gadžurić, S., & Trtić-Petrović, T. (2017). Simultaneous extraction of pesticides of different polarity applying aqueous biphasic systems based on ionic liquids. *Journal of Molecular Liquids*, 243(Supplement C), 646-653.
40. Eaton, D. L., Daroff, R. B., Autrup, H., Bridges, J., Buffler, P., Costa, L. G., Nadel, L. (2008). Review of the toxicology of chlorpyrifos with an emphasis on human exposure and neurodevelopment. *Critical Reviews in Toxicology*, 38(sup2), 1–125.
41. EPA (U.S. Environmental Protection Agency), 1999. Waste Research Strategy. EPA/600/R- 98/154. Office of.
42. European Commission, Directive of the European Union 98/83/EC of 3.XII.1998 r. on the quality of water intended for human consumption, 2002 (accessed 26.02. 2010).
43. Eyer, F., Roberts, D. M., Buckley, N. A., Eddleston, M., Thiermann, H., Worek, F., & Eyer, P. (2009). Extreme variability in the formation of chlorpyrifos oxon (CPO) in patients poisoned by chlorpyrifos (CPF). *Biochemical Pharmacology*, 78(5), 531-537.
44. Fábregas, J., Herrero, C., Gamillo, Y., Otero, A., Paz, J.M. y Vecino, E. (1994). Decrease of plasma cholesterol with the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* in hypercholesterolemic rats. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 40: 533-540.

45. Farhan, M., Ali-Butt, Z., Khan, A.U., Wahid, A., Ahmad, M., Ahmad, F., Kanwal, A., (2014). Enhanced biodegradation of chlorpyrifos by agricultural soil isolate. *Asian J. Chem.* 26, 3013–3017.
46. Faried, M., Samer, M., Abdelsalam, E., Yousef, R. S., Attia, Y. A., & Ali, A. S. (2017). Biodiesel production from microalgae: Processes, technologies and recent advancements. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 79(Supplement C), 893-913.
47. Fenlon, K.A., Andreou, K., Jones, K.C., Semple, K.T., (2011). The extractability and mineralisation of cypermethrin aged in four UK soils. *Chemosphere* 82, 187–192.
48. Fontana, A. R., Camargo, A. B., & Altamirano, J. C. (2010). Coacervative microextraction ultrasound-assisted back-extraction technique for determination of organophosphates pesticides in honey samples by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217(41), 6334-6341.
49. Friesen-Pankratz, B., Doebel, C., Farenhorst, A., & Goldsborough, L. G. (2003). Interactions between algae (*Selenastrum capricornutum*) and pesticides: implications for managing constructed wetlands for pesticide removal. *J Environ Sci Health B*, 38(2), 147-155.
50. Gad, S. C. (2014). United States Pharmacopoeia (USP) A2 - Wexler, Philip *Encyclopedia of Toxicology* (Third Edition) (pp. 881-882). Oxford: Academic Press.
51. Gadd, G.M. (2009). Biosorption: critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 84:13–28.
52. Galceran, M. T., & Santos, F. J. (2005). GAS CHROMATOGRAPHY | Environmental Applications A2 - Worsfold, Paul. In A. Townshend & C. Poole (Eds.), *Encyclopedia of Analytical Science* (Second Edition) (pp. 129-139). Oxford: Elsevier.

53. Gao, H., Gao, X., Cao, Y., Xu, L., Jia, L., (2015). Influence of hydroxypropyl- β -cyclodextrin on the extraction and biodegradation of p,p'-DDT, o,p'-DDT, p,p'-DDD, and p,p'-DDE in soils. *Water Air Soil Pollut.* 226, 208–213.
54. Ghasemi, Y., Rasoul-Amini, S., Fotooh-Abadi, E. (2011). Review: The Biotransformation, Biodegradation, and Bioremediation of Organic Compounds by Microalgae. *Journal of Phycology.* 47: 969–980.
55. Giraldez, R. N., Mateo P., Bonilla I. y Fernández-Piña F. (1997). The relationship between intracellular pH, growth characteristics and calcium in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 exposed to low pH. *New Phytologist* 137: 599-605.
56. Global Crop Protection Chemicals (Pesticides) Market—Growth, Trends And Forecasts 2015–2020), Mordor intelligence, 2015.
57. Gonçalves, V., Hazarbassanov, N. Q., de Siqueira, A., Florio, J. C., Ciscato, C. H. P., Maiorka, P. C., de Souza Spinosa, H. (2017). Development and validation of carbofuran and 3-hydroxycarbofuran analysis by high-pressure liquid chromatography with diode array detector (HPLC-DAD) for forensic Veterinary Medicine. *Journal of Chromatography B*, 1065-1066(Supplement C), 8-13.
58. Górecki, T., & Namieśnik, J. (2002). Passive sampling. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 21(4), 276-291.
59. Guldhe, A., Ansari, F. A., Singh, P., & Bux, F. (2017). Heterotrophic cultivation of microalgae using aquaculture wastewater: A biorefinery concept for biomass production and nutrient remediation. *Ecological Engineering*, 99(Supplement C), 47-53.
60. Hammouda, O., Gaber, A., & Abdelraouf, N. (1995). Microalgae and Wastewater Treatment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 31(3), 205-210.

61. Haritash, A. K., & Kaushik, C. P. (2009). Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials*, 169(1), 1-15.
62. Hase, E., Morimura, Y., & Tamiya, H. (1957). Some data on the growth physiology of *Chlorella* studied by the technique of synchronous culture. *Arch Biochem Biophys*, 69, 149-165.
63. Huang, Y., Li, L., Liu, J., & Lin, W. (2014). Botanical pesticides as potential rotifer-control agents in microalgal mass culture. *Algal Research*, 4(Supplement C), 62-69.
64. Huntley, M. E., Johnson, Z. I., Brown, S. L., Sills, D. L., Gerber, L., Archibald, I., Greene, C. H. (2015). Corrigendum to “Demonstrated large-scale production of marine microalgae for fuels and feed” [*Algal Res.* 10 (July 2015) 249–265]. *Algal Research*, 11(Supplement C), 379-380.
65. Iyaniwura, T. T. (1991). Non-target and environmental hazards of pesticides. *Rev Environ Health*, 9(3), 161-176.
66. Jaga K, Dharmani C. (2003). Sources of exposure to and public health implications of organophosphate pesticides. *Rev Panam Salud Pública* 14:171–85.
67. John L. Adgate, & Sexton, K. (2001). Emerging Issues: Children's Exposure to Pesticides in Residential Settings *Handbook of Pesticide Toxicology* (Second Edition), (Vol. Volume 1, pp. 887-904). Minnesota.
68. Jönsson, J. Å., & Mathiasson, L. (2003). Membrane extraction *Comprehensive Analytical Chemistry* (Vol. 41, pp. 559-575): Elsevier.
69. Joset-Espardellier, F., Astier, C., Evans, E. H., & Carr, N. G. (1978). Cyanobacteria grown under photoautotrophic, photoheterotrophic, and heterotrophic regimes: Sugar metabolism and carbon dioxide fixation. *FEMS Microbiology Letters*, 4(5), 261-264.
70. Kandilian, R., Jesus, B., Legrand, J., Pilon, L., & Pruvost, J. (2017). Light transfer in agar immobilized microalgae cell cultures. *Journal of*

- Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer, 198(Supplement C), 81-92.
71. Keehner, D. M., & Shamim, M. (1999). Environmental Risk Assessment for Prophenofos. 17 Washington: United State Environmental Protection Agency, Washington.
 72. Kenfack, A., Ngoula, F., Dzeufiet, P. D. W., Ngouateu, O. B., Martine, T. M. A., Chombong, J. K., Vemo, N. B. (2015). Persistence of the reproductive toxicity of chlorpiryphos-ethyl in male Wistar rat. Asian Pacific Journal of Reproduction, 4(1), 37-40.
 73. Khalid, A. A. H., Yaakob, Z., Abdullah, S. R. S., & Takriff, M. S. (2018). Growth improvement and metabolic profiling of native and commercial *Chlorella sorokiniana* strains acclimatized in recycled agricultural wastewater. Bioresource Technology, 247(Supplement C), 930-939.
 74. Klekner, V., Kosaric, N. (1992). Degradation of Phenols by Algae. Environmental Technology. 13: 493-501
 75. Kohlhase, M., & Pohl, P. (1988). Saturated and unsaturated sterols of nitrogen-fixing blue-green algae (cyanobacteria). Phytochemistry, 27(6), 1735-1740.
 76. Konieczka, P. (2012). 2.31 - Validation and Regulatory Issues for Sample Preparation A2 - Pawliszyn, Janusz Comprehensive Sampling and Sample Preparation (pp. 699-711). Oxford: Academic Press.
 77. Kot, A., Zabiegała, B., & Namieśnik, J. (2000). Passive sampling for long-term monitoring of organic pollutants in water. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 19(7), 446-459.
 78. Krienitz, L., Huss, V. A. R., & Bock, C. (2015). *Chlorella*: 125 years of the green survivalist. Trends in Plant Science, 20(2), 67-69.
 79. Kumar, V., Bhutani, H., & Singh, S. (2007). ICH guidance in practice: Validated stability-indicating HPLC method for simultaneous determination of ampicillin and cloxacillin in combination drug products. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 43(2), 769-773.

80. Labbé, J. I., Ramos-Suárez, J. L., Hernández-Pérez, A., Baeza, A., & Hansen, F. (2017). Microalgae growth in polluted effluents from the dairy industry for biomass production and phytoremediation. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 5(1), 635-643.
81. LaCourse, M. E., & LaCourse, W. R. (2017). Chapter 17 - General instrumentation in HPLC* A2 - Fanali, Salvatore. In P. R. Haddad, C. F. Poole, & M.-L. Riekkola (Eds.), *Liquid Chromatography (Second Edition)* (pp. 417-429): Elsevier.
82. LaCourse, W. R. (2017). *HPLC Instrumentation Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*: Elsevier.
83. Larsson, P., Järnmark, C., & Södergren, A. (1992). PCBs and chlorinated pesticides in the atmosphere and aquatic organisms of Ross Island, Antarctica. *Marine Pollution Bulletin*, 25(9), 281-287.
84. Liu, J., Zhao, Q., & Zhang, X. (2017). Structure and slow release property of chlorpyrifos/graphene oxide-ZnAl-layered double hydroxide composite. *Applied Clay Science*, 145(Supplement C), 44-52.
85. Lopes, A.R., Danko, A.S., Manaia, C.M., Nunes, O.C., (2012). Molinate biodegradation in soils: natural attenuation versus bioaugmentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* [http://dx. doi.org/10.1007/s00253-012-4096-y](http://dx.doi.org/10.1007/s00253-012-4096-y).
86. Loreto C. y Morales E. (2003a). Productividad de la cianobacteria *Anabaena* pcc 7120 en cultivos semicontinuos. *Bol. Centro Invest. Biol.*, abr., vol.37, no.1, p.21-34. ISSN 0375-538X.
87. Loreto C., Rosales N., Bermúdez J. y Morales E. (2003b). Producción de pigmentos y proteínas de la cianobacteria *Anabaena* pcc 7120 en relación a la concentración de nitrógeno e irradiancia. *Guyana Bot.* vol.60, no.2, p.83-89. ISSN 0717-6643.
88. Lu, C., Kedan, G., Fisker-Andersen, J., Kissel, J. C., & Fenske, R. A. (2004). Multipathway organophosphorus pesticide exposures of preschool children living in agricultural and nonagricultural communities. *Environmental Research*, 96(3), 283-289.

89. M. Biziuk, A. Przyjazny, J. Czerwiński, M. Wiergowski, J. Chromatogr., A 754 (1996) 103.
90. Maqbool, Z., Hussain, S., Imran, M., Mahmood, F., Shahzad, T., Ahmed, Z., Azeem, F., Muzammil, S., (2016). Perspectives of using fungi as bioresource for bioremediation of pesticides in the environment: a critical review. Environ. Sci. Pollut. Res. 23, 16,904–16,925.
91. Martínez, M. E., Sánchez, S., Jiménez, J. M., El Yousfi, F., & Muñoz, L. (2000). Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. Bioresource Technology, 73(3), 263-272.
92. Masiá, A., Vázquez, K., Campo, J., & Picó, Y. (2015). Assessment of two extraction methods to determine pesticides in soils, sediments and sludges. Application to the Túrria River Basin. Journal of Chromatography A, 1378(Supplement C), 19-31.
93. Matamoros, V., & Rodríguez, Y. (2016). Batch vs continuous-feeding operational mode for the removal of pesticides from agricultural run-off by microalgae systems: A laboratory scale study. Journal of Hazardous Materials, 309(Supplement C), 126-132.
94. Matamoros, V., Puigagut, J., García, J., & Bayona, J. M. (2007). Behavior of selected priority organic pollutants in horizontal subsurface flow constructed wetlands: A preliminary screening. Chemosphere, 69(9), 1374-1380.
95. Megharaj, M., Madhavi, D. R., Sreenivasulu, C., Umamaheswari, A. & Venkateswarlu, K. (1994). Biodegradation of methyl parathion by soil isolates of microalgae and cyanobacteria.
96. Megharaj, M., Pearson, H. W., & Venkateswarlu, K. (1991). Toxicity of p-aminophenol and p-nitrophenol to *Chlorella vulgaris* and two species of *Nostoc* isolated from soil. Pesticide Biochemistry and Physiology, 40(3), 266-273.

97. Mehta, S.K., Gaur, J.P. (2005). Use of Algae for Removing Heavy Metal Ions From Wastewater: Progress and Prospects. *Critical Reviews in Biotechnology*. 25:113-152.
98. Mitton, F. M., Gonzalez, M., Monserrat, J. M., & Miglioranza, K. S. B. (2018). DDTs-induced antioxidant responses in plants and their influence on phytoremediation process. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 147(Supplement C), 151-156.
99. Mohd-Sahib, A.-A., Lim, J.-W., Lam, M.-K., Uemura, Y., Isa, M. H., Ho, C.-D. Rosli, S.-S. (2017). Lipid for biodiesel production from attached growth *Chlorella vulgaris* biomass cultivating in fluidized bed bioreactor packed with polyurethane foam material. *Bioresource Technology*, 239(Supplement C), 127-136.
100. Moisander P. H., McClinton E. y Paerl H. (2002). Salinity effects on growth, photosynthetic parameters, and nitrogenase activity in estuarine planktonic cyanobacteria. *Microbial Ecology*, 43:432-442
101. Monisha Miriam, L. R., Edwin Raj, R., Kings, A. J., & Adhi Visvanathan, M. (2017). Identification and characterization of a novel biodiesel producing halophilic *Aphanothece halophytica* and its growth and lipid optimization in various media. *Energy Conversion and Management*, 141(Supplement C), 93-100.
102. Montaña, M. (2005). Estudio de la aplicación de *Azolla Anabaena* como bioabono en el cultivo de arroz en el Litoral ecuatoriano. *Revista tecnológica ESPOL*. Vol 18, N°1. Pp 147 – 151.
103. Moore, M. T., Rodgers Jr, J. H., Cooper, C. M., & Smith Jr, S. (2000). Constructed wetlands for mitigation of atrazine-associated agricultural runoff. *Environmental Pollution*, 110(3), 393-399.
104. Moore, M.T., Cooper, C.M., Smith Jr, S., Cullum, R.F., Knight, S.S., Locke, M.A., Bennett, E.R., (2007). Diazinon mitigation in constructed wetlands: influence of vegetation. *Water Air Soil Pollut.* 184, 313–321.

105. Morales E., Rodríguez M., García D., Loreto C y Marco E. (2002). Crecimiento, producción de pigmentos y exopolisacáridos de la cianobacteria *Anabaena* sp. PCC 7120 en función del pH y CO₂. *INTERCIENCIA*. vol. 27, no. 7.
106. Mun, L. R., Gons H. J. y Van Lieke L. (1978). Competition of the green alga *Chlorella vulgaris* and the blue-green alga *Oscillatoria*. *Mitt. Int. Ver. Theor. Angew. Limnol.* 21, p. 473-479.
107. Nagao, R., Tomo, T., Noguchi, E., Nakajima, S., Suzuki, T., Okumura, A., Enami, I. (2010). Purification and characterization of a stable oxygen-evolving Photosystem II complex from a marine centric diatom, *Chaetoceros gracilis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1797(2), 160-166.
108. Nagy, Z.M., Gruiz, K., Molnár, M., Fenyvesi, E., (2013). Comparative evaluation of microbial and chemical methods for assessing 4-chlorophenol biodegradation in soil. *Chem. Eng.* 57, 25–35.
109. Nakanishi, K., & Deuchi, K. (2014). Culture of a high-chlorophyll-producing and halotolerant *Chlorella vulgaris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 117(5), 617-619.
110. Namiesnik y J. Namiesnik, Z. Jamro'giewicz (Editors), *Fizykochemiczne metody kontroli zanieczyszczen' s'rodowiska*, WNT, Warszawa, Poland, 1998.
111. Niti, C., Sunita, S., Kamlesh, K., Rakesh, K., (2013). Bioremediation: An emerging technology for remediation of pesticides. *Res. J. Chem. Environ* 17, 88–105.
112. Pabbi, M., Kaur, A., Mittal, S. K., & Jindal, R. (2017). A Surface Expressed Alkaline phosphatase Biosensor modified with Flower shaped ZnO for the Detection of Chlorpyrifos. *Sensors and Actuators B: Chemical*.
113. Panda, S. S., Mohapatra, P. K., & Mohanty, R. C. (1999). Comparative toxicity of two organophosphorus insecticides on membrane integrity of

- Chlorella vulgaris*. I. effect on membrane permeability. *Microbiological Research*, 153(4), 363-368.
114. Paranthaman, R., Sudha, A., & Kumaravel, S. (2012). Determination of pesticide residues in banana by using high performance liquid chromatography and gas chromatographymass spectrometry. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 8(1), 1–6.
 115. Peng, X., Huang, J., Liu, C., Xiang, Z., Zhou, J., Zhong, G., (2012). Biodegradation of bensulphuron-methyl by a novel *Penicillium pinophilum* strain BP-H-02. *J. Hazard. Mater.* 213, 216–221.
 116. Perales-Vela, H. V., Peña-Castro, J. M., & Cañizares-Villanueva, R. O. (2006). Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. *Chemosphere*, 64(1), 1-10.
 117. Pereira, M. M., Mouton, L., Yéprémian, C., Couté, A., Lo, J., Marconcini, J. M. Brayner, R. (2014). Ecotoxicological effects of carbon nanotubes and cellulose nanofibers in *Chlorella vulgaris*. *Journal of Nanobiotechnology*, 12, 15-15.
 118. Pflugmacher, S., Sandermann, H. Jr. (1998). Cytochrome P450 Monooxygenases for Fatty Acids and Xenobiotics in Marine Macroalgae. *Plant Physiology*. 117: 123–128.
 119. Piera, E., Tejedor-Tejedor, M. I., Zorn, M. E., & Anderson, M. A. (2003). Relationship concerning the nature and concentration of Fe(III) species on the surface of TiO₂ particles and photocatalytic activity of the catalyst. *Applied Catalysis B: Environmental*, 46(4), 671-685.
 120. PMRA, P. M. R. A. (2010). Ministerial Agreement for Data Protection under the Pest Control Products Act. Ottawa, Ontario.
 121. Priyadarshani, I., Sahu, D., Rath, B. (2011). Microalgal bioremediation: Current practices and perspectives. *Journal of Biochemical Technology*. 3(3): 299-304.
 122. Qian, Z.-Y., Ma, J., Sun, C.-l., Li, Z.-G., Xian, Q.-M., Gong, T.-T., & Xu, B. (2017). Using stable isotope labeling to study the nitrogen metabolism in

- Anabaena flos-aquae growth and anatoxin biosynthesis. Water research, 127(Supplement C), 223-229.
123. Qiu, Y.-L., & Yu, J. (2003). Azolla — A Model Organism for Plant Genomic Studies. Genomics, Proteomics & Bioinformatics, 1(1), 15-25.
 124. Qu, J., Xu, Y., Ai, G.-M., Liu, Y., & Liu, Z.-P. (2015). Novel Chryseobacterium sp. PYR2 degrades various organochlorine pesticides (OCPs) and achieves enhancing removal and complete degradation of DDT in highly contaminated soil. Journal of Environmental Management, 161(Supplement C), 350-357.
 125. Quattrochi, O. A., Sara; Laba, Raúl. (1992). Introducción a la HPLC Aplicación y Práctica (First ed.). Argentina: Artes Gráficas Farro S.A.
 126. Rai, V., Sharma, N. K., & Rai, A. K. (2006). Growth and cellular ion content of a salt-sensitive symbiotic system Azolla pinnata–Anabaena azollae under NaCl stress. Journal of Plant Physiology, 163(9), 937-944.
 127. Rao KVS, Rachel A, Subrahmanyam M, Boule P. (2003). Immobilization of TiO₂ on pumice stone for the photocatalytic degradation of dyes and dye industry pollutants. Appl Catal B Environ 46:77–85.
 128. Rioboo, C., González, O., Herrero, C., & Cid, A. (2002). Physiological response of freshwater microalga (Chlorella vulgaris) to triazine and phenylurea herbicides. Aquatic Toxicology, 59(3), 225-235.
 129. Rodrigues, M. S., Ferreira, L. S., Carvalho, J. C. M. d., Lodi, A., Finocchio, E., & Converti, A. (2012). Metal biosorption onto dry biomass of Arthrospira (Spirulina) platensis and Chlorella vulgaris: Multi-metal systems. Journal of Hazardous Materials, 217-218(Supplement C), 246-255.
 130. Rout Nutan Prasad, Khandual Sanghamitra, Gutierrez-Mora Antonia, Gallardo-Valdéz Juan, Rodriguez-Garay Benjamin, Ibarra-Montoya J. Luis, & Guillermo, V.-V. (2013). Isolation, Identification and Germplasm Preservation of Different Native Spirulina Species from Western Mexico. American Journal of Plant Sciences, 4, 65-71

131. Runes, H. B., Jenkins, J. J., Moore, J. A., Bottomley, P. J., & Wilson, B. D. (2003). Treatment of atrazine in nursery irrigation runoff by a constructed wetland. *Water research*, 37(3), 539-550.
132. Sadeghizadeh, A., Farhad dad, F., Moghaddasi, L., & Rahimi, R. (2017). CO₂ capture from air by *Chlorella vulgaris* microalgae in an airlift photobioreactor. *Bioresource Technology*, 243(Supplement C), 441-447.
133. Salunkhe, V.P., Sawant, I.S., Banerjee, K., Wadkar, P.N., Sawant, S.D., (2015). Enhanced dissipation of triazole and multiclass pesticide residues on grapes after foliar application of grapevine-associated bacillus species. *J. Agric. Food Chem.* 63, 10736–10746.
134. Sánchez – Varo (1995): “Biotecnología de las microalgas”. Universidad de California, Estados Unidos.
135. Schocken, M.J., Mao, J., Schabacker, D.J. (1997). Microbial Transformations of the Fungicide Cyprodinil (CGA-219417). *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 45: 3647–3651.
136. Shabir, G. A. (2004). Determination of combined p-hydroxy benzoic acid preservatives in a liquid pharmaceutical formulation by HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 34(1), 207-213.
137. Shen, J. Y., Liao, J. Z., Guo, L. L., & Su, R. F. (2017). Effects of monosulfuron-ester on metabolic processes of nitrogen-fixing cyanobacteria *Anabaena flos-aquae* and *Anabaena azotica*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(3), 544-550.
138. Sherrard, R. M., Berr, J. S., Murray-Gulde, C. L., Rodgers, J. H., & Shah, Y. T. (2004). Feasibility of constructed wetlands for removing chlorothalonil and chlorpyrifos from aqueous mixtures. *Environmental Pollution*, 127(3), 385-394.
139. Silambarasan, S., Abraham, J., (2013). Ecofriendly method for bioremediation of chlorpyrifos from agricultural soil by novel fungus *Aspergillus terreus* JAS1. *Water Air Soil Pollut.* 224, 1369.

140. Silva, Í. S., Santos, E. d. C. d., Menezes, C. R. d., Faria, A. F. d., Franciscón, E., Grossman, M., & Durrant, L. R. (2009). Bioremediation of a polyaromatic hydrocarbon contaminated soil by native soil microbiota and bioaugmentation with isolated microbial consortia. *Bioresource Technology*, 100(20), 4669-4675.
141. Singh, A.K., Cameotra, S.S., (2014). Influence of microbial and synthetic surfactant on the biodegradation of atrazine. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 2088–2097.
142. Singh, N. K., Raghubanshi, A. S., Upadhyay, A. K., & Rai, U. N. (2016). Arsenic and other heavy metal accumulation in plants and algae growing naturally in contaminated area of West Bengal, India. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 130(Supplement C), 224-233.
143. Singh, N. K., Raghubanshi, A. S., Upadhyay, A. K., & Rai, U. N. (2016). Arsenic and other heavy metal accumulation in plants and algae growing naturally in contaminated area of West Bengal, India. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 130(Supplement C), 224-233.
144. Singh, R. P., & Singh, P. K. (1989). Effect of Nitrogen Fertilizers on Nitrogen Fixation and Heterocyst Frequency of Cyanobacterium *Anabaena azollae* in 7 Species of *Azolla*. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*, 185(5), 429-433.
145. Sournia, A. (1974). Circadian periodicities in natural populations of marine phytoplankton. *Advances in Marine Biology* 12:325-389.
146. Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandel, M., & Cohen-Bazire, G. (1971). Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriological Reviews*, 35(2), 171-205.
147. Storck, V., Karpouzias, D. G., & Martin-Laurent, F. (2017). Towards a better pesticide policy for the European Union. *Science of The Total Environment*, 575(Supplement C), 1027-1033.
148. Subashchandrabose, S. R., Ramakrishnan, B., Megharaj, M., Venkateswarlu, K., & Naidu, R. (2013). Mixotrophic cyanobacteria and

- microalgae as distinctive biological agents for organic pollutant degradation. *Environment International*, 51(Supplement C), 59-72.
149. Subramanian, G., Sekar, S., & Sampooram, S. (1994). Biodegradation and utilization of organophosphorus pesticides by cyanobacteria. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 33(2), 129-143.
 150. Suresh Kumar, K., Dahms, H.-U., Won, E.-J., Lee, J.-S., & Shin, K.-H. (2015). Microalgae – A promising tool for heavy metal remediation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 113(Supplement C), 329-352.
 151. T. Cairns, J. Sherma (Editors), *Emerging Strategies for Pesticide Analysis*, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 1992.
 152. Tahboub, Y. R., Zaater, M. F., & Al-Talla, Z. A. (2005). Determination of the limits of identification and quantitation of selected organochlorine and organophosphorous pesticide residues in surface water by full-scan gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1098(1), 150-155.
 153. Tam, N. F. Y., Chong, A. M. Y., & Wong, Y. S. (2002). Removal of tributyltin (TBT) by live and dead microalgal cells. *Marine Pollution Bulletin*, 45(1), 362-371.
 154. Tandon, P., & Jin, Q. (2017). Microalgae culture enhancement through key microbial approaches. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 80(Supplement C), 1089-1099.
 155. Tang, D., Han, W., Li, P., Miao, X., & Zhong, J. (2011). CO₂ biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO₂ levels. *Bioresource Technology*, 102(3), 3071-3076.
 156. Testai, E., Buratti, F. M., & Di Consiglio, E. (2010). Chapter 70 - Chlorpyrifos A2 - Krieger, Robert Hayes' *Handbook of Pesticide Toxicology* (Third Edition) (pp. 1505-1526). New York: Academic Press.
 157. Thies, F., Backhaus, T., Bossmann, B and Grimme, H. (1996). Xentibiotic Transformation in Unicellular Green Algae – Involvement of Cytochrome

- P450 in the Activation and Selectivity of the Pyridazinone Pro-Herbicide Metflurazon. *Plant Physiology* 112:361-370.
158. Tsang, C.K., Lau, P.S., Tam, N.F.Y, Wong, Y.S. (1999). Biodegradation capacity of tributyltin by two *Chlorella* species. *Environmental Pollution* 105: 289-297.
 159. UE, U. E. (1991). Directiva 91/414/CEE del Consejo, relativa a la comercialización de productos fitosanitarios.
 160. United States Environmental Protection Agency (EPA), Standardized Analytical Methods for Environmental Restoration Following Homeland Security Events, Revision 5.0, EPA, Cincinnati, OH, USA, 2009.
 161. Villaverde, J., Posada-Baquero, R., Rubio-Bellido, M., Laiz, L., Saiz-Jimenez, C., SanchezTrujillo, M.A., Morillo, E., (2012). Enhanced mineralization of diuron using a cyclodextrin-based bioremediation technology. *J. Agric. Food Chem.* 60, 9941–9947.
 162. Vymazal, J., & Březinová, T. (2016). Accumulation of heavy metals in aboveground biomass of *Phragmites australis* in horizontal flow constructed wetlands for wastewater treatment: A review. *Chemical Engineering Journal*, 290(Supplement C), 232-242.
 163. Warshawsky, D., Keenan, T. H., Reilman, R., Cody, T. E., & Radike, M. J. (1990). Conjugation of benzo[a]pyrene metabolites by freshwater green alga *Selenastrum capricornutum*. *Chemico-Biological Interactions*, 74(1), 93-105.
 164. Wehr, J. D., & Sheath, R. G. (2015). Chapter 2 - Habitats of Freshwater Algae *Freshwater Algae of North America* (Second Edition) (pp. 13-74). Boston: Academic Press.
 165. Xu, X.-J., Lai, G.-L., Chi, C.-Q., Zhao, J.-Y., Yan, Y.-C., Nie, Y., & Wu, X.-L. (2018). Purification of eutrophic water containing chlorpyrifos by aquatic plants and its effects on planktonic bacteria. *Chemosphere*, 193(Supplement C), 178-188.

166. Ye, M., Sun, M., Hu, F., Kengara, F.O., Jiang, X., Luo, Y., Yang, X., 2014a. Remediation of organochlorine pesticides (OCPs) contaminated sites successive methyl- β - cyclodextrin (MCD) and sunflower oil enhanced soil washing - *Portulaca oleracea* L. cultivation. *Chemosphere* 105, 119–125.
167. Ye, M., Sun, M., Liu, Z., Ni, N., Chen, Y., Gu, C. Jiang, X. (2014). Evaluation of enhanced soil washing process and phytoremediation with maize oil, carboxymethyl- β -cyclodextrin, and vetiver grass for the recovery of organochlorine pesticides and heavy metals from a pesticide factory site. *Journal of Environmental Management*, 141(Supplement C), 161-168.
168. Zeiler, K.G., Heacox, D.A., Toon, S.T., Kadam, K.L., Brown, L.M. (1995) The use of microalgae for assimilation and utilization of carbon dioxide from fossil fuel-fired power plant flue gas. *Energy Convers. Mgmt* Vol.36, No. 6-9, pp 707-712.
169. Zhang, Y., Li, X., Liu, H., Zhang, Y., Zhao, F., & Yu, Q. (2013). Study on universal cleaning solution in removing blended pesticide residues in Chinese cabbage. *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, 5(8), 202–207.





ANEXO 1



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTÍN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA
HERBARIUM AREQVIPENSE (HUSA)



CONSTANCIA N° 46-2017-HUSA

El Director del *Herbarium Arequipense* (HUSA) de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.

HACE CONSTAR:

Que la muestra preservada de agua presentada por la Bachiller: Mónica Meylín Yugra Condori, perteneciente a la Escuela de Posgrado de la Universidad Católica de Santa María de Arequipa; para la ejecución de su trabajo, fueron depositada en el Laboratorio de Botánica, procedente del Laboratorio de Biología Marina para la determinación en el Herbarium Arequipense (HUSA) y corresponde a la especie y clasificación.

Division:	Chlorophyta
Clase:	Chlorophyceae
Orden:	Chlorococcales
Familia:	Oocystaceae
Género:	Chlorella
Especie:	<i>Chlorella vulgaris</i> (M.W. Beyerinck 1890)

Se expide la presente a solicitud del interesado para los fines que se estimen convenientes.

Arequipa, 11 de setiembre del 2017




Bgo. Leonardo Manfio Herrera
DIRECTOR
Herbarium Arequipense (HUSA)

Avenida Daniel Alcides Carrión s/n cercado
 Teléfono: (054) 237755 / 984248674
 Apartado Postal: 0028
 AREQUIPA-PERÚ



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTÍN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA
HERBARIUM AREQVIPENSE (HUSA)



CONSTANCIA N° 47-2017-HUSA

El Director del *Herbarium Arequipense* (HUSA) de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.

HACE CONSTAR:

Que la muestra preservada de agua presentada por la Bachiller: Mónica Meylín Yugra Condori, perteneciente a la Escuela de Posgrado de la Universidad Católica de Santa María de Arequipa; para la ejecución de su trabajo, fueron depositada en el Laboratorio de Botánica, procedente del Laboratorio de Biología Marina para la determinación en el *Herbarium Arequipense* (HUSA) y corresponde a la especie y clasificación.

Division: Cyanophyta
Clase: Cyanophyceae
Orden: Nostocaceae
Género: *Anabaena*
Especie: *Anabaena azollae* (Strasburger 1884)

Se expide la presente a solicitud del interesado para los fines que se estimen convenientes.

Arequipa, 11 de setiembre del 2017


Bigo: Leonardo Manríquez Herrera
DIRECTOR
Herbarium Arequipense (HUSA)

Avenida Daniel Alcides Carrión s/n cercado
Teléfono: (054) 237755 / 984248674
Apartado Postal: 0028
AREQUIPA-PERÚ

ANEXO 2

PANEL FOTOGRÁFICO

I. Inóculos iniciales de *C. vulgaris* y *A. azollae*.



II. Extracción de Clorpirifos con hexano.



III. Extracción de Clorofila con metanol.



ANEXO 3

RECUENTOS Y EVALUACIONES

I. Recuento celular (Microorganismos mL⁻¹)

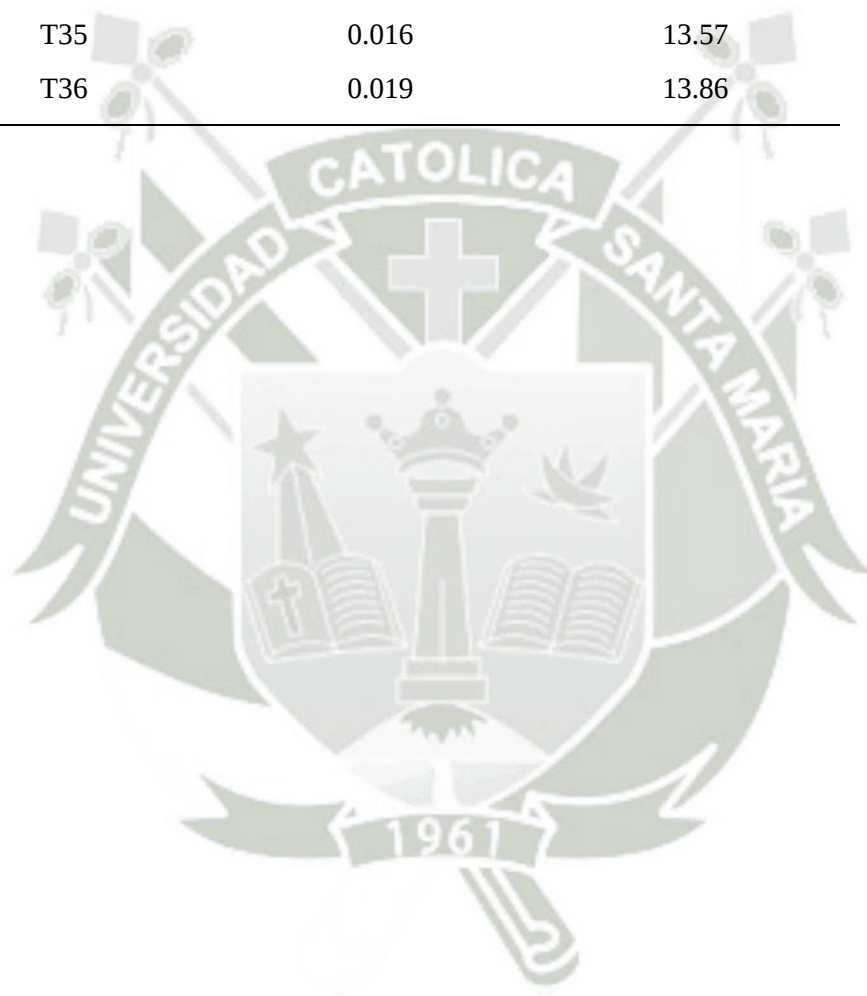
Trat.	Conteo 1			Conteo 2			Conteo3			Conteo4			Conteo5		
	x10 ⁴	$\bar{X}$	D.S.	x10 ⁴	$\bar{X}$	D.S.	x10 ⁴	$\bar{X}$	D.S.	x10 ⁴	$\bar{X}$	D.S.	x10 ⁴	$\bar{X}$	D.S.
1	22.00	22.00	1.00	36.00	37.00	1.73	46.00	46.67	2.08	67.00	67.67	1.15	71.00	71.00	2.00
2	23.00			39.00			45.00			69.00			73.00		
3	21.00			36.00			49.00			67.00			69.00		
4	26.00	26.33	0.58	34.00	36.33	5.86	51.00	46.67	4.51	71.00	65.67	5.03	72.00	69.00	3.00
5	27.00			43.00			47.00			65.00			69.00		
6	26.00			32.00			42.00			61.00			66.00		
7	21.00	22.67	1.53	31.00	37.33	5.69	45.00	47.67	2.52	66.00	66.33	2.52	69.00	69.00	1.00
8	24.00			42.00			50.00			69.00			70.00		
9	23.00			39.00			48.00			64.00			68.00		
10	34.00	33.67	1.53	37.00	38.67	2.08	45.00	47.33	2.52	51.00	53.67	3.06	53.00	55.67	3.06
11	32.00			38.00			47.00			53.00			55.00		
12	35.00			41.00			50.00			57.00			59.00		
13	36.00	34.33	2.08	43.00	40.67	3.21	54.00	51.00	3.00	61.00	57.67	3.51	63.00	60.33	2.52
14	35.00			37.00			48.00			54.00			58.00		
15	32.00			42.00			51.00			58.00			60.00		
16	32.00	31.00	1.00	38.00	39.33	2.31	47.00	49.67	3.06	54.00	56.00	4.36	56.00	57.67	3.79
17	30.00			38.00			49.00			53.00			55.00		
18	31.00			42.00			53.00			61.00			62.00		
19	39.00	43.00	4.00	51.00	53.67	3.79	58.00	62.67	5.69	72.00	76.00	4.58	65.00	67.33	2.52

20	43.00			52.00			61.00			75.00			67.00		
21	47.00			58.00			69.00			81.00			70.00		
22	38.00	41.33	2.89	49.00	49.33	0.58	57.00	60.33	3.06	76.00	76.33	1.53	79.00	79.00	2.00
23	43.00			49.00			61.00			75.00			77.00		
24	43.00			50.00			63.00			78.00			81.00		
25	44.00	44.67	3.06	55.00	55.67	1.15	63.00	66.67	3.21	81.00	80.67	1.53	82.00	82.67	0.58
26	42.00			57.00			68.00			79.00			83.00		
27	48.00			55.00			69.00			82.00			83.00		
28	21.00	21.00	2.00	42.00	40.33	3.79	51.00	58.33	7.51	71.00	76.00	4.36	74.00	78.33	3.79
29	19.00			36.00			58.00			78.00			80.00		
30	23.00			43.00			66.00			79.00			81.00		
31	27.00	30.33	4.16	45.00	47.33	7.77	68.00	65.33	5.51	79.00	83.33	5.13	81.00	82.67	1.53
32	29.00			41.00			59.00			82.00			84.00		
33	35.00			56.00			69.00			89.00			83.00		
34	38.00	39.33	1.53	59.00	57.33	5.69	72.00	72.33	6.51	91.00	91.67	6.03	95.00	95.67	5.03
35	39.00			51.00			79.00			98.00			101.00		
36	41.00			62.00			66.00			86.00			91.00		

II. Productividad de Biomasa y Concentración de Clorofila

Tratamiento	Productividad de biomasa (g L ⁻¹ d ⁻¹)	Clorofila (mg L ⁻¹)
T1	0.003	2.05
T2	0.003	1.93
T3	0.003	2.01
T4	0.009	1.81
T5	0.007	1.80
T6	0.007	1.81
T7	0.009	3.13
T8	0.004	3.24
T9	0.005	3.23
T10	0.020	2.44
T11	0.008	2.51
T12	0.020	2.54
T13	0.044	26.71
T14	0.028	26.53
T15	0.051	26.59
T16	0.036	29.48
T17	0.031	34.16
T18	0.037	32.13
T19	0.043	28.20
T20	0.033	27.73
T21	0.048	29.19
T22	0.048	21.60
T23	0.041	21.77
T24	0.040	22.04
T25	0.023	13.16
T26	0.025	13.08
T27	0.023	13.69

T28	0.015	16.53
T29	0.024	16.62
T30	0.022	16.29
T31	0.020	12.07
T32	0.019	12.32
T33	0.027	12.13
T34	0.007	13.25
T35	0.016	13.57
T36	0.019	13.86



III. Registro de Concentraciones de Clorpirifos.

Trat.	1				2				3				4				5				6			
	Área	mg L ⁻¹	$\bar{X}$	D.S.	Área	mg L ⁻¹	$\bar{X}$	D.S.	Área	mg L ⁻¹	$\bar{X}$	D.S.	Área	mg L ⁻¹	$\bar{X}$	D.S.	Área	mg L ⁻¹	$\bar{X}$	D.S.	Área	mg L ⁻¹	$\bar{X}$	D.S.
T1	265742	29.66	29.69	0.10	232003	25.95	27.10	1.02	191050	21.44	21.04	0.39	176322	19.82	19.35	0.41	148738	16.78	16.40	0.38	131341	14.87	14.89	0.10
T2	267059	29.80			246114	27.50			187127	21.01			169439	19.06			145289	16.40			132519	15.00		
T3	265355	29.62			249397	27.86			183979	20.66			170374	19.16			141826	16.02			130818	14.81		
T4	133013	15.05	14.97	0.09	109807	12.50	12.86	0.32	91005	10.43	10.53	0.37	84434	9.71	9.92	0.20	72257	8.37	8.35	0.18	51799	6.12	5.98	0.15
T5	132361	14.98			113936	12.95			95621	10.94			87924	10.09			73651	8.52			49073	5.82		
T6	131418	14.88			115459	13.12			89069	10.22			86837	9.97			70386	8.16			50856	6.01		
T7	64183	7.48	7.46	0.01	52193	6.16	6.49	0.30	39955	4.81	4.81	0.01	35839	4.36	4.29	0.14	29746	3.69	3.84	0.13	25523	3.22	3.14	0.28
T8	63973	7.46			57486	6.74			40039	4.82			33692	4.12			31736	3.91			21893	2.83		
T9	63992	7.46			55909	6.57			39826	4.80			36010	4.38			31752	3.91			26719	3.36		
T10	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-
T11	0	-			0	-			0	-			0	-			0	-			0	-		
T12	0	-			0	-			0	-			0	-			0	-			0	-		

T13	261429	29.18	29.71	0.46	227414	25.44	25.31	0.12	174769	19.65	19.87	0.40	159325	17.95	17.99	0.45	126369	14.32	14.20	0.56	107735	12.27	12.17	0.24
T14	268158	29.92			225330	25.21			180966	20.33			163957	18.46			129795	14.70			104284	11.89		
T15	269027	30.02			225963	25.28			174492	19.62			155824	17.56			119737	13.59			108375	12.34		
T16	132547	15.00	15.00	0.00	102015	11.64	11.83	0.16	87343	10.03	9.66	0.33	72812	8.43	8.40	0.18	57547	6.75	6.49	0.27	44935	5.36	4.73	0.56
T17	132568	15.00			104614	11.93			82893	9.54			73971	8.56			55306	6.50			37158	4.50		
T18	132616	15.01			104587	11.92			81689	9.41			70825	8.21			52683	6.21			35463	4.32		
T19	63876	7.44	7.45	0.01	52299	6.17	6.20	0.02	36863	4.47	4.30	0.22	29771	3.69	3.68	0.09	19735	2.59	2.46	0.16	12836	1.83	1.95	0.12
T20	63953	7.45			52519	6.20			33092	4.06			30387	3.76			16960	2.28			14020	1.96		
T21	64070	7.47			52736	6.22			35878	4.36			28726	3.58			18947	2.50			15073	2.07		
T22	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-
T23	0	-			0	-			0	-			0	-			0	-			0	-		
T24	0	-			0	-			0	-			0	-			0	-			0	-		
T25	269802	30.11	30.07	0.04	218732	24.49	24.44	0.18	160840	18.12	17.98	0.15	145283	16.40	16.07	0.31	112942	12.84	13.01	0.17	92753	10.62	10.81	0.18
T26	269374	30.06			216510	24.24			159742	17.99			139786	15.80			114563	13.02			96007	10.98		
T27	269153	30.03			219715	24.59			158128	17.82			141829	16.02			115947	13.17			94634	10.83		

T28	131296	14.86	14.94	0.07	97396	11.13	10.95	0.21	75728	8.75	8.78	0.13	67254	7.82	7.60	0.20	49974	5.92	5.42	0.51	21040	2.73	2.90	0.54
T29	132576	15.00			96118	10.99			75042	8.67			64972	7.57			45825	5.46			28018	3.50		
T30	132110	14.95			93647	10.72			77318	8.92			63588	7.41			40647	4.89			18583	2.46		
T31	63781	7.43	7.48	0.07	46202	5.50	5.37	0.14	33287	4.08	4.10	0.46	26828	3.37	3.22	0.18	12752	1.82	2.05	0.21	8843	1.39	1.41	0.02
T32	63962	7.45			43702	5.22			29433	3.65			25835	3.26			16484	2.23			9252	1.43		
T33	64893	7.56			45043	5.37			37737	4.57			23699	3.02			15396	2.11			9064	1.41		
T34	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-	0	-	-	-
T35	0	-			0	-			0	-			0	-			0	-			0	-		
T36	0	-			0	-			0	-			0	-			0	-			0	-		