



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

**TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE INGENIERO AGROPECUARIO**

**TEMA: “USO DE MICROALGAS ENDÉMICAS DEL ECUADOR
(*Chlorella* sp. Biotipo 3) EN LA BIOACUMULACIÓN DE
INSECTICIDAS A NIVEL DE LABORATORIO”**

AUTOR: TIPAN LEMA, MIGUEL ALFONSO

DIRECTOR: ORTIZ TIRADO, JUAN CRISTÓBAL

SANGOLQUÍ

2017



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, "*USO DE MICROALGAS ENDÉMICAS DEL ECUADOR (Chlorella sp. Biotipo 3) EN LA BIOACUMULACIÓN DE INSECTICIDAS A NIVEL DE LABORATORIO*", realizado por el señor **MIGUEL ALFONSO TIPÁN LEMA**, ha sido revisado en su totalidad y analizado por el software anti-plagio, el mismo cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, por lo tanto me permito acreditarlo y autorizar al señor **MIGUEL ALFONSO TIPÁN LEMA** para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 07 de Agosto del 2017

Dr. JUAN CRISTÓBAL ORTIZ TIRADO

DIRECTOR



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, **MIGUEL ALFONSO TIPÁN LEMA**, con cédula de identidad N° 171946428-9, declaro que este trabajo de titulación "**USO DE MICROALGAS ENDÉMICAS DEL ECUADOR (Chlorella sp. Biotipo 3) EN LA BIOACUMULACIÓN DE INSECTICIDAS A NIVEL DE LABORATORIO**" ha sido desarrollado considerando los métodos de investigación existentes, así como también se ha respetado el derecho intelectual de terceros considerándose en las citas bibliográficas.

Consecuentemente declaro que este trabajo es de mi autoría, en virtud de ello me declaro responsable del contenido, veracidad y alcance de la investigación mencionada.

Sangolquí, 07 de Agosto del 2017

MIGUEL ALFONSO TIPÁN LEMA

171946428-9



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

AUTORIZACIÓN

Yo, **MIGUEL ALFONSO TIPÁN LEMA**, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, publicar en la biblioteca virtual de la institución, el presente trabajo de titulación, “**USO DE MICROALGAS ENDÉMICAS DEL ECUADOR (*Chlorella sp. Biotipo 3*) EN LA BIOACUMULACIÓN DE INSECTICIDAS A NIVEL DE LABORATORIO**”, cuyo contenido, ideas, y criterios son de mi autoría y responsabilidad.

Sangolquí, 07 de Agosto del 2017

MIGUEL ALFONSO TIPÁN LEMA

171946428-9

DEDICATORIA

A Dios.

A mi familia.

A mi Margarita.

AGRADECIMIENTO

A Dios por su bondad en el transcurso de mi carrera, por brindarme la fortaleza en los momentos difíciles.

A mis padres que estuvieron presentes en todo momento, a Roberto, Fredy y Mariela por su apoyo moral, espiritual y material, y a mis sobrinos por ser mi inspiración.

Agradezco a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE por la acogida en sus instalaciones, por la oportunidad de crecer como persona y formarme como profesional, de manera muy especial mi reconocimiento a cada uno de los docentes de la Carrera de Ingeniería Agropecuaria IASA 1, por sus conocimientos impartidos durante toda mi carrera universitaria.

Mi agradecimiento especial a mi maestro y tutor Dr. Juan Ortiz Tirado por su paciencia y constante colaboración en la realización de la presente investigación, compartiendo sus amplios conocimientos y experiencia.

A la Ing. Daysi Muñoz, por sus consejos oportunos y su ayuda desinteresada.

A la Dra. Blanquita Naranjo, al Lcdo. Marco Taco por haberme facilitado sus instalaciones y los recursos requeridos para el desarrollo experimental de la tesis.

A Margarita, por su amor, entereza y el apoyo incondicional.

A mis amigos por todos los momentos inolvidables en la etapa universitaria.

Miguel Tipán L.

ÍNDICE DE CONTENIDO

CARÁTULA

CERTIFICACIÓN	ii
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD	iii
AUTORIZACIÓN	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTO	vi
ÍNDICE DE CONTENIDO	vii
ÍNDICE DE TABLAS	xi
INDICE DE FIGURAS	xii
RESUMEN	xiv
ABSTRACT	xv

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN	1
1.1 Justificación.....	2
1.2 El Problema.....	3
1.2.1 Los Efectos.....	3
1.2.2 Las Causas.....	3
1.3 Objetivos.....	3
1.3.1 Objetivo general.....	3
1.3.2 Objetivos específicos.....	3
1.4 Hipótesis.....	4

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1 Generalidades sobre los pesticidas.....	5
2.2 Uso de pesticidas en el Ecuador.....	5
2.3 Clasificación de los pesticidas.....	6
2.4 Carbamatos.....	7
2.4.1 Modo de acción.....	7
2.4.2 Persistencia.....	8

2.5	Organofosforados	8
2.5.1	Toxicidad.....	9
2.5.2	Persistencia.....	9
2.6	Microalgas	9
2.6.1	<i>Chlorella</i> sp.....	10
2.7	Bioacumulación.....	10
2.8	Parámetros para el Cultivo de microalgas.....	11
2.8.1	Medio de cultivo.....	12
2.9	Reacción enzimática de óxido reducción	13
CAPÍTULO III		
METODOLOGÍA		
3.1	Ubicación del lugar de investigación	14
3.1.1	Ubicación ecológica	14
3.2	Materiales	15
3.2.1	Biológicos.....	15
3.2.2	Insumos de laboratorio	15
3.2.3	Equipos.....	15
3.2.4	Reactivos	16
3.3	Métodos.....	16
3.3.1	Primera fase.....	18
3.3.1.1	Purificación de <i>Chlorella</i> sp. Biotipo 3.....	18
3.3.1.2	Masificación de la microalga	18
3.3.1.3	Producción de la microalga	18
3.3.1.4	Cosecha de la biomasa de <i>Chlorella</i> sp. Biotipo 3.....	19
3.3.1.4.1	Análisis proximal de la biomasa de <i>Chlorella</i> sp. Biotipo 3.....	20
3.3.1.4.2	Proteína.....	20
3.3.1.4.3	Grasas.....	21
3.3.1.4.4	Cenizas.....	22
3.3.1.4.5	Capacidad antioxidante	23
3.3.1.4.6	Determinación de compuestos fenólicos totales	24

3.3.1.4.7	Determinación de clorofila α , β y carotenos	24
3.3.1.4.8	Bioensayo de toxicidad de <i>Chlorella</i> sp. Biotipo 3 en <i>artemia salina</i>	25
3.3.1.4.9	Bioensayo de letalidad de pesticida sobre <i>Chlorella</i> sp. Biotipo 3	26
3.3.2	Segunda Fase.....	27
3.3.2.1	Medición de parámetros físicos.....	27
3.3.2.2	Medición de parámetros Químicos	28
3.3.2.3	Demanda Química de Oxígeno (DQO).....	28
3.3.2.4	Demanda Biológica de Oxígeno (DBO ₅).....	29
3.3.2.5	Determinación de residuos de pesticida	30
3.3.3	Diseño experimental.....	32
3.3.3.1	Factores	32
3.3.3.2	Tratamientos a comparar	33
3.3.3.3	Tipo de diseño	33
3.3.3.4	Características de las Unidades Experimentales	33
3.3.3.5	Croquis del diseño.....	33
3.3.4	Variables del estudio	34
3.3.4.1	Variables físicas	34
3.3.4.2	Variables Químicas	34
3.3.4.3	Determinación de residuos de pesticidas	34
3.3.5	Análisis estadístico.....	34
3.3.5.1	Transformación de datos	34
3.3.5.2	Modelo matemático.....	34
3.3.5.3	Esquema de análisis de varianza	35
3.3.5.4	Análisis funcional.....	35
CAPÍTULO IV		
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		36
4.1	Resultados	36
4.1.1	Características morfológicas	36
4.1.2	Producción de biomasa.....	37
4.1.2.1	Análisis proximal de <i>Chlorella</i> sp. Biotipo 3.....	38

4.1.2.2	Capacidad antioxidante	38
4.1.2.3	Compuestos fenólicos totales	38
4.1.2.4	Determinación de clorofila α , β caroteno	39
4.1.2.5	Bioensayo toxicidad de <i>Chlorella</i> sp. Biotipo 3 en <i>artemia salina</i>	39
4.1.3	Crecimiento microalgal bajo diferentes concentraciones de pesticidas	40
4.1.4	Parámetros físicos	42
4.1.4.1	pH.....	42
4.1.4.2	Crecimiento Celular	44
4.1.5	Parámetros Químicos	45
4.1.5.1	DQO	45
4.1.5.2	DBO ₅	47
4.1.5.3	DBO ₅ / DQO	48
4.1.6	Análisis de pesticida residual mediante óxido-reducción.	50
4.2	Discusión.....	51
4.2.1	Producción de biomasa.....	51
4.2.2	Análisis proximal	51
4.2.3	Compuestos fenólicos totales (CFT) y capacidad antioxidante (CA)	52
4.2.4	Clorofila total	52
4.2.5	pH 52	
4.2.6	Crecimiento celular	53
4.2.7	DBO ₅ /DQO	54
4.2.8	Análisis de pesticida residual mediante acción de óxido-reducción	55
CAPÍTULO V		
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		
5.1	Conclusiones	56
5.2	Recomendaciones.....	57
5.3	Bibliografía.....	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Límites permisibles para aguas de consumo humano y uso doméstico.....	6
Tabla 2	Clasificación de los plaguicidas por toxicidad expresada en DL50.....	7
Tabla 3	Composición Química de Nitrofoska Foliar expresada en g/Kg.	12
Tabla 4	Volumen para la determinación de la DBO ₅	30
Tabla 5	Factor controlable	32
Tabla 6	Descripción de tratamientos.....	33
Tabla 7	Análisis de varianza para el diseño experimental del estudio.....	35
Tabla 8	Promedio y desviación estándar del crecimiento celular de <i>Chlorella</i> sp.	37
Tabla 9	Promedio y desviación estándar del contenido nutricional de <i>Chlorella</i> sp. .	38
Tabla 10	Promedio y desviación estándar de la capacidad antioxidante	38
Tabla 11	Promedio y desviación estándar de compuestos fenólicos totales.....	39
Tabla 12	Promedio y desviación estándar de clorofila α , β y caroteno.	39
Tabla 13	Clasificación de la toxicidad según la comunidad científica CYTED.....	40
Tabla 14	Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III).....	42
Tabla 15	Medias ajustadas \pm E.E del pH general para cada tratamiento	43
Tabla 16	Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III).....	44
Tabla 17	Medias ajustadas \pm E.E para el crecimiento celular general.....	44
Tabla 18	Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III).....	46
Tabla 19	Medias ajustadas \pm E.E. de la (DQO) para la interacción P*D	46
Tabla 20	Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III).....	47
Tabla 21	Medias ajustadas \pm E.E. de la (DBO ₅) para la interacción P*D	47
Tabla 22	Medias ajustadas \pm E.E. de la relación (DBO ₅ /DQO).....	49
Tabla 23	Medias \pm E.E. del análisis de pesticidas mediante óxido-reducción	50

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Estructura básica del ácido carbámico.....	7
Figura 2 Modo de acción de Methomyl	8
Figura 3 Estructura química del organofosforado.....	8
Figura 4 Usos y aplicaciones del cultivo de microalgas	10
Figura 5 Mecanismo de defensa de material biológico vivo.....	11
Figura 6 Acción enzimática de óxido reducción del Kit de Pantalla OP/C	13
Figura 7 Hacienda el Prado IASA-I Laboratorio de Acuicultura	14
Figura 8 Esquema de la metodología del proyecto de investigación	17
Figura 9 Proceso de producción de la biomasa de <i>Chlorella</i> sp.	19
Figura 10 Cosecha de la <i>Chlorella</i> sp. B3.....	20
Figura 11 Determinación de proteína total por el método de Kjeldahl.....	21
Figura 12 Determinación del porcentaje de grasas mediante el método Soxhlet	22
Figura 13 Determinación del porcentaje de ceniza	22
Figura 14 Determinación de la capacidad antioxidante de <i>Chlorella</i> sp. B3.....	23
Figura 15 Determinación de compuestos fenólicos totales.....	24
Figura 16 Bioensayo de letalidad biomasa de <i>Chlorella</i> sp. B3 en <i>Artemia salina</i>	26
Figura 17 Bioensayo de letalidad de pesticidas	26
Figura 18 Instalación del ensayo; pesticidas-biomasa de microalga	27
Figura 19 Medición de parámetros físicos	27
Figura 20 Ensayo de la DQO	28
Figura 21 Curva de calibración para DQO	29
Figura 22 Ensayo de la DBO ₅	30
Figura 23 Esquema del protocolo de óxido-reducción, aplicado en el estudio.....	31
Figura 24 Curva de calibración para análisis de óxido reducción	31
Figura 25 Test enzimático de óxido-reducción	32
Figura 26 Croquis del diseño experimental de la investigación	33
Figura 27 Cepa pura de <i>Chlorella</i> sp. Biotipo 3	36
Figura 28 Vista del diámetro de <i>Chlorella</i> sp. B3 mediante microscopia electrónica...36	
Figura 29 Crecimiento y Absorbancia de <i>Chlorella</i> sp. B3 (680nm)	37

Figura 30 Supervivencia de nauplios de <i>Artemia salina</i>	40
Figura 31 Metodología de tipo antibiograma disco – placa.....	41
Figura 32 Crecimiento de <i>chlorella</i> sp., Biotipo 3 (F=32,29; p=0,05)	42
Figura 33 pH durante los 21 días de evaluación (F=32,85; p<0,0001).....	43
Figura 34 Crecimiento celular durante 21 días (F=26,16; p <0,001)	45
Figura 35 Comportamiento de la DQO, al inicio y al final del ensayo.....	47
Figura 36 Comportamiento de la DBO ₅ , al inicio y al final del ensayo.....	48
Figura 37 Gráfico de cuartiles para la relación DBO ₅ /DQO.....	49
Figura 38 Gráfico de medias para la concentración de pesticidas	50

RESUMEN

El desconocimiento de tecnologías no convencionales para el tratamiento de aguas residuales originadas por el uso excesivo de agentes biocidas procedentes de la actividad agropecuaria en nuestro país, hace necesario el desarrollo de alternativas eficientes y de fácil implementación que contribuyan a la remediación de los efluentes contaminados. La presente investigación evaluó el efecto de bioacumulación de pesticidas por parte de *Chlorella* sp. Biotipo 3, a nivel de laboratorio. El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Acuicultura de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE; se analizaron muestras que contuvieron 100 ml de microalga ($3,5 \times 10^6$ células/ml) y 250 ml de agua contaminada con (0, 500, 700 y 900 ppm) de chlorpyrifos y methomyl respectivamente. En la primera etapa, se analizó la biomasa pura de la microalga, obteniendo valores de: proteína (45,3%); grasas (9,5 %); humedad (79%), cenizas (28,53%), capacidad antioxidante de 31,59 %, concentración de compuestos fenólicos totales 96.7 ppm, clorofila total 16,2 mg/g, caroteno (2,9 mg/g) y su toxicidad fue relativamente inocuo (DL50 1500 μ g/ml). En la segunda fase se determinó, crecimiento celular y pH, detectándose diferencias significativas entre tratamientos ($<0,0001$), mientras que la relación DBO5/ DQO para todos los tratamientos fue 0,8; con la prueba enzimática de óxido reducción se comprobó la disminución del contenido de pesticida con mayor eficiencia de remoción en concentraciones de 500 y 700 ppm de methomyl. Con estos resultados, se concluye que el uso de microalgas andinas en procesos de biorremediación es eficaz y viable.

PALABRAS CLAVE

- **BIOCIDAS**
- **BIOACUMULACIÓN**
- **ÓXIDO – REDUCCIÓN**
- **MICROALGAS ANDINAS**
- *Chlorella* sp.

ABSTRACT

The lack of knowledge about unconventional technologies for the treatment of wastewater caused by the excessive use of biocidal agents from agricultural activity in our country makes it necessary to develop efficient and easy to implement alternatives that contribute to the remediation of contaminated effluents. The present investigation evaluated the effect of bioaccumulation of pesticides by *Chlorella* sp. Biotype 3, at the laboratory level. The study was carried out in the Laboratory of Aquaculture of the University of the Armed Forces - ESPE; Samples containing 100 ml of microalga (3.5×10^6 cells / ml) and 250 ml of water contaminated with (0, 500, 700 and 900 ppm) of chlorpyrifos and methomyl respectively were analyzed. In the first stage, the pure biomass of the microalga was analyzed, obtaining values of: protein (45.3%); Fats (9.5%); , Antioxidant capacity of 31.59%, total phenolic compounds concentration 96.7 ppm, total chlorophyll 16.2 mg / g, carotene (2.9 mg / g) and Toxicity was relatively innocuous (LD50 1500 μ g / ml). In the second phase cell growth and pH were determined, significant differences between treatments were detected (<0.0001), while the BOD5 / COD ratio for all treatments was 0.8; With the enzymatic oxidation reduction test the reduction of pesticide content was verified with higher removal efficiency at concentrations of 500 and 700 ppm of methomyl. With these results, it is concluded that the use of Andean microalgae in bioremediation processes is efficient and viable.

KEYWORDS

- **BIOCIDES**
- **BIOACUMULATION**
- **OXIDATION – REDUCTION**
- **ANDEAN MICROALGAES**
- *Chlorella* sp.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Las aguas residuales en gran parte del territorio ecuatoriano se caracterizan por sus elevados contenidos de fosfatos y nitratos procedentes de fertilizantes, así como de una amplia gama de plaguicidas, pesticidas y agentes biocidas en general (Guzmán, 2011).

Durante los últimos años, ha incrementado notablemente el uso de pesticidas en monocultivos de Costa y Oriente, y en menor medida en flores, frutas y hortalizas de la Sierra (Da Ros, 1995). Sin embargo su utilización no se realiza con las debidas precauciones, de hecho el (INEC, 2013), especifica que solo un 11% de la población agrícola conoce el uso adecuado de la aplicación de plaguicidas en sus cultivos.

La (FAO, 2015) menciona que la localización, la especificidad del tipo de contaminante, la variabilidad espacial y temporal de la contaminación son factores que dificultan el tratamiento del agua. Entre las técnicas comúnmente utilizadas se encuentran los procesos mecánicos, físicos, químicos y biológicos que no siempre resultan ser económicos y eficientes (Párraga & Espinel, 2010).

Existen alternativas enfocadas a la remediación ambiental de tipo agrícola, entre ellas se destacan técnicas convencionales como la utilización de reactores foto catalíticos, tratamiento clásico de floculación-decantación y filtración del agua, bombeo y tratamiento físico, filtración a través de carbón activo, tratamientos de ozono, tratamientos con cloro y dióxido de cloro (Fernández, 2010).

Rojas (2015), menciona que para un adecuado tratamiento de aguas se debe conocer la especificidad del contaminante y utilizar técnicas de destrucción de moléculas y retención física. Sin embargo, al tratarse de miles de productos y subproductos que entran en el agua todos los días, la evaluación de sus efectos sobre los ecosistemas acuáticos y la biodiversidad acuática es compleja, costosa y difícil de evaluar por la limitación de la información disponible (Calles, 2017).

Para fomentar el proceso de conocimiento de nuevas tecnologías ambientales, la remediación de aguas contaminadas con insecticidas en base a microalgas (*Chlorella sp* biotipo 3), se presenta como una alternativa de reciente exploración ya que hoy en día productos comerciales como; Bio-Alga SORB, Bio-Fix y AMT.BIOCLAIM elaborados

en base a microalgas son utilizados por su eficiencia para la bioacumulación debido a su afinidad con algunos compuestos bioquímicos que conforman la pared celular de las microalgas (Ardila, 2012).

Con el uso de (*Chlorella* sp. Biotipo 3), se obtuvieron resultados a nivel de laboratorio, en cuanto a remediación ambiental, que llevados a una aplicación en campo, pueden contribuir de manera sustentable a la reducción de contaminantes de origen agrícola sobre cuerpos de agua, a partir de procesos bioquímicos.

Este estudio, presenta un enfoque innovador con relevancia social y ambiental, misma que puede ser fácilmente aplicada mediante la difusión de resultados con transferencia tecnológica de conocimiento. Bajo esta consideración, se desarrolló la presente investigación encaminada a la bio-remediación del agua, mediante la utilización de microalgas del alto andino.

1.1 Justificación

La contaminación de los cuerpos de agua a nivel nacional, se ha incrementado en los últimos años, debido al empleo de una amplia gama de agroquímicos, residuos pecuarios, industriales y humanos. Actualmente a nivel nacional, no existen suficientes estudios donde se utilicen alternativas no convencionales eficientes y a bajo costo que contribuyan a mejorar los procesos de remediación de aguas contaminadas y que garantice la sostenibilidad del medio ambiente y seguridad alimentaria (MAGAP, 2011)

Es necesario implementar metodologías que mitiguen la contaminación del agua acordes a la situación del país, por lo que la presente investigación, busca contribuir con una alternativa a nivel experimental, basada en los datos expuestos por: (Moha, Pérez, Ríos, & Ortega, 2015)(Moha, et al. 2015), (Roa, 2012), (Zhao et al. 2010) y (Liu & Sun, 2014), donde demuestran la efectividad del uso de microalgas en el tratamiento de aguas contaminadas con pesticidas.

Bajo este contexto, el tratamiento *in situ* de remediación de aguas contaminadas con pesticidas por medio de microalgas andinas *Chlorella* sp. Biotipo 3, se presenta como una alternativa innovadora que permite mejorar la calidad del agua.

1.2 El Problema

El desconocimiento de nuevas tecnologías no convencionales de remediación ambiental, que aporten con resultados eficaces para la remediación de fuentes de agua contaminadas por el uso excesivo de pesticidas empleados en actividades agrícolas.

1.2.1 Los Efectos

Los efectos en los que incurre la problemática de la presente investigación, son: la contaminación del agua en los sectores productivos que amenazan la seguridad alimentaria del país y el uso de técnicas ineficaces y costosas de remediación de aguas.

1.2.2 Las Causas

Las causas que determinan el problema del presente estudio se resumen en el uso irracional de pesticidas químicos para abastecer el volumen de producción agrícola y pecuaria, alteraciones del ecosistema por la rápida solubilidad de agroquímicos en el ambiente y la limitada información sobre la utilización de microalgas como agentes bio-remediadores.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Evaluar el uso de microalgas endémicas del Ecuador (*Chlorella* sp. Biotipo 3), en la bioacumulación de insecticidas (chlorpyrifos y methomyl) a nivel de laboratorio

1.3.2 Objetivos específicos.

Determinar las características morfológicas, bromatológicas y capacidad antioxidante de la microalga andina (*Chlorella* sp. Biotipo 3) como elementos constitutivos.

Evaluar el crecimiento de *Chlorella* sp. Biotipo 3 a diferentes concentraciones de pesticidas *in vitro* e *in vivo*.

Evaluar la bioacumulación temporal de insecticida en *Chlorella* sp. Biotipo 3 y su impacto en parámetros ambientales para la calidad de agua.

1.4 Hipótesis

H1: “El uso de las microalgas endémicas del Ecuador (*Chlorella* sp. Biotipo 3), mejoran la calidad del agua de efluentes agrícolas a través de procesos de bioacumulación de pesticidas: chlorpyrifos y methomyl”.

H0: “El uso de las microalgas endémicas del Ecuador (*Chlorella* sp. Biotipo 3), no mejoran la calidad del agua de efluentes agrícolas a través de procesos de bioacumulación de pesticidas: chlorpyrifos y methomyl”.

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Generalidades sobre los pesticidas

Los pesticidas son definidos como “toda sustancia que se emplea para prevenir, destruir o controlar plagas que afectan el crecimiento de plantas o animales y que ocasionan un daño durante la producción, comercialización de los alimentos, siendo estos: herbicidas, insecticidas, fungicidas, rodenticidas y reguladores del crecimiento vegetal” (OMS/FAO, 2011).

La aplicación de controladores de origen químico reduce pérdidas en campo por efectos de plagas o enfermedades, permitiendo incrementar el rendimiento y la producción de cultivos agrícolas. Sin embargo, es conocido que las plagas desarrollan resistencia, obligando a los agricultores a elevar las concentraciones y frecuencias de aplicación de plaguicidas además de elaborar mezclas de principios activos y demandar la disponibilidad de potentes biocidas sintéticos en el mercado (Plengue & Sierra, 2017).

2.2 Uso de pesticidas en el Ecuador

De acuerdo con lo expuesto por la (FAO, 2015), la tasa de crecimiento poblacional y la demanda de productos agropecuarios ha alcanzado niveles altos en la última década.

INEC (2013), afirma que el Ecuador tiene potencial para producción y exportación de bienes agrícolas, pese a ello, la seguridad alimentaria en zonas rurales y de alta producción se ve afectada por la agresión de plagas y el inadecuado manejo de insumos químicos. El excesivo uso de estos agentes biocidas ha provocado riesgos para la salud humana y el medio ambiente.

Aun cuando los pesticidas hayan sido utilizados correctamente, es probable que la concentración de residuos en los alimentos se incremente debido al uso de agua de riego contaminadas al estar en contacto con alimentos con residuos en concentraciones altas (Ramirez, 2009).

De acuerdo con lo expuesto en el inventario de plaguicidas (ESPOL, 2004), existen cantidades considerables de insecticidas fosforados en 14 grupos de alimentos de origen animal y vegetal, mismos que posiblemente se acumulan en el tejido adiposo de la población. Por ello, el Texto Unificado de Legislación Ambiental Secundaria del

Ministerio de Ambiente (TULAS, 2009), explica que toda descarga a un cuerpo de agua dulce deberá cumplir con los límites máximos permisibles de carbamatos y organofosforados, establecidos en la tabla 1.

Tabla 1
Límites permisibles para aguas de consumo humano y uso doméstico.

Parámetro	Expresado Como	Unidad	Límite Máximo Permissible
Carbamatos totales	Concentración de carbamatos totales	mg/l	0,1
Organofosforados totales	Concentración de organofosforados totales	mg/l	0,1

Fuente: (TULAS, 2009)

Los plaguicidas utilizados en la agricultura llegan a los cursos de aguas subterráneas y superficiales (ríos y lagos) fundamentalmente por arrastre y lixiviación, pudiendo contaminar los reservorios de agua para consumo humano que son alimentados por estos recursos hídricos (Benitez, 2013).

Algunos plaguicidas han sido clasificados como contaminantes orgánicos persistentes debido a que permanecen largos períodos de tiempo en el ambiente y viajan grandes distancias siendo transportados a través de agua y aire, llegando incluso a regiones donde nunca se aplicaron (OPS, 2009).

Por todas estas razones, los plaguicidas se encuentran entre las sustancias químicas más peligrosas a las cuales está expuesto el ser humano y en medio ambiente

2.3 Clasificación de los pesticidas

Teniendo en cuenta la diversidad de plaguicidas existentes, así como sus diferentes orígenes y funciones, la (OMS, 2017) clasifica los plaguicidas de acuerdo a su nivel toxicidad como se describe en la tabla 2.

Tabla 2
Clasificación de los plaguicidas por toxicidad expresada en DL50

Clase	Toxicidad	DL50
Clase IA	Extremadamente peligroso	0-5 mg/Kg
Clase IB	Altamente peligroso	5-50 mg/Kg
Clase II	Moderadamente peligroso	50-500 mg/Kg
Clase III	Ligeramente peligroso	> 500 mg/Kg

Fuente: (OMS, 2017)

2.4 Carbamatos

Dentro de la familia química de los carbamatos se encuentran los ésteres carbamatados, comúnmente empleados como insecticidas (Ramírez & Lascaña, 2001). En la figura 1 se aprecia la estructura básica de esta familia de pesticidas.

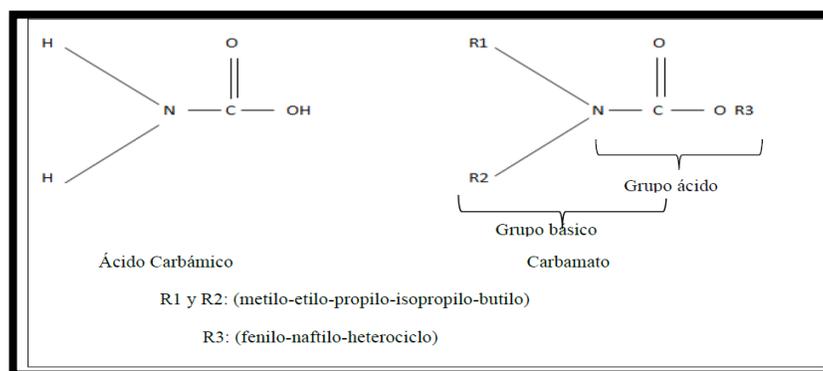


Figura 1 Estructura básica del ácido carbámico

Fuente: (Curillo, 2015)

2.4.1 Modo de acción

Los carbamatos tienen como principal modo de acción la capacidad de inhibir la enzima acetil-colinesterasa en el sistema nervioso. Esta enzima es la responsable de la rápida degradación hidrolítica del neurotransmisor acetilcolina (Ramírez & Lascaña, 2001).

En la figura 2 se muestra el modo de acción de methomyl, el cuál se adhiere a la enzima acetilcolinesterasa, afectando la actividad colinesterasa y alterando de esta manera la función de la acetilcolina en la transmisión los impulsos nerviosos.

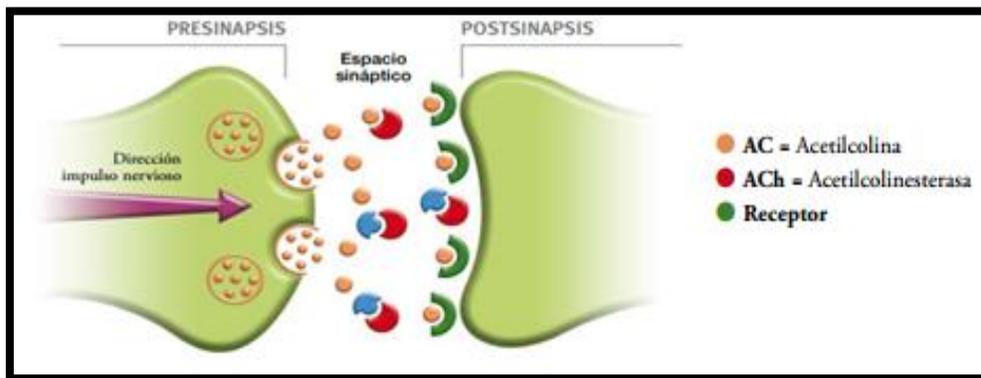


Figura 2 Modo de acción de Methomyl

Fuente: (Dupont, 2017)

2.4.2 Persistencia

Methomyl se ubica en la clasificación IA (extremadamente tóxicos), su tiempo promedio de vida, está influenciado por el pH y la temperatura ambiental. Es así que para aguas superficiales se reportan tiempos de vida medios comprendidos entre 38,1 semanas a pH=7 y $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ (Chapman & Cole, 1982).

2.5 Organofosforados

La familia de los organofosforados representa a los compuestos químicos orgánicos derivados del ácido fosfórico (unión de un ácido y un alcohol) y una variedad de alcoholes usados como plaguicidas artificiales aplicados para controlar las plagas de insectos (Fernández, 2010)

En la figura 3 se muestra la estructura química del organofosforado, donde R1 y R2 representan grupos compuestos por metilo (CH_3) o etilo (C_2H_5) y representa generalmente un grupo aromático.

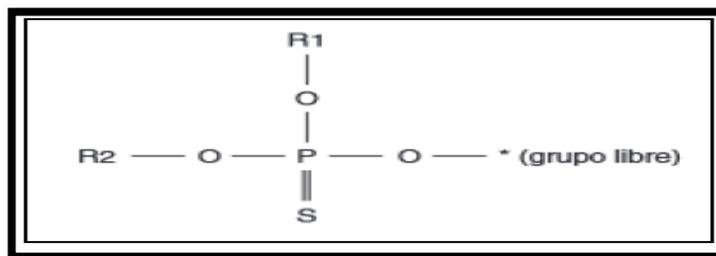


Figura 3 Estructura química del organofosforado

Fuente: (Curillo, 2015)

2.5.1 Toxicidad

Chlorpyrifos es altamente tóxico y presenta una codificación toxicológica clase II (Altamente tóxico), para organismos terrestres y acuáticos es una potente neurotóxina que desencadena inhibición de la colinesterasa fetal, muestra propiedades anti-androgénicas y estrogénicas, reduce los niveles de suero de cortisol y tiroides de la hormona T4 (Watts, 2012).

Se ha detectado bajas concentraciones de chlorpyrifos en la leche materna, moco cervical, cordón umbilical y el meconio de bebés recién nacidos. Exposiciones a comienzos de la niñez pueden llevar a trastornos de comportamiento en la adolescencia y edad adulta, además estudios epidemiológicos en humanos han encontrado desarrollo cognitivo y psicomotor retrasado, y Coeficiente Intelectual (IQ) disminuido por acción de este plaguicida (Watts, 2012).

2.5.2 Persistencia

Se ha reportado una vida media de 223 días bajo condiciones anaeróbicas. Las tasas de degradación de chlorpyrifos están influenciadas por la concentración de macro y micro-organismos, el pH del medio, la humedad, la temperatura, y también por las tasas de formulación y aplicación de agentes que facilitan la degradación de este compuesto (Chai *et al.*, 2008) citado por (Watts, 2012).

2.6 Microalgas

Las microalgas son organismos unicelulares eucariotas fotosintéticos capaces de transformar la energía luminosa en energía química con una eficiencia cuatro veces superior a las plantas, presentan una pared celular conformada por celulosa, pectina y producen polisacáridos y ácidos extracelulares como ácido urónico y ácido algínico (Ardila, 2012).

El criterio de clasificación divide a las algas en: Cyanophyta, Prochlorophyta, Phaeophyta, Chlorophyta, Charophyta, Euglenophyta, Chry-sophyta, Pyrrhophyta, Cryptophyta y Rhodophyta. Las microalgas pueden servir para múltiples propósitos como en alimentación, fertilización, fuentes de energía y bio-remediación de aguas contaminadas (Ardila, 2012).

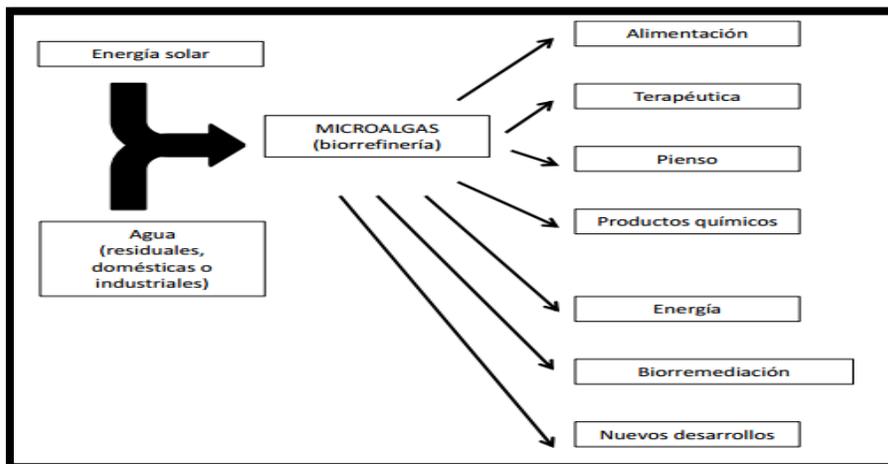


Figura 4 Usos y aplicaciones del cultivo de microalgas

Fuente: (García, 2016)

2.6.1 *Chlorella* sp.

Tradicionalmente, del género *Chlorella* se conocen más de cien especies, sin embargo, diez especies han sido bien establecidas.

Chlorella sp., es una microalga que crece en forma de células simples, su coloración es verduzca y presenta forma redonda o elipsoidal. La pared celular de *Chlorella* sp., es rígida y contiene glucosamina, además, su reproducción es asexual, es decir, sólo por autoesporas (Garofalo, 2011).

Chlorella tiene una alta concentración de clorofila, su capacidad de fotosíntesis es mayor que las plantas superiores y puede dividirse en cuatro células cada 20 horas. Las investigaciones con esta microalga han demostrado que la biomasa puede ser utilizada como alimento funcional para animales, bio-fertilizantes y de remediación ambiental (Infante & Angulo, 2012).

2.7 Bioacumulación

La bioacumulación de compuestos contaminantes en las microalgas depende de su taxonomía, pues la estructura química de la pared celular varía en cada especie debido a la cantidad de grupos funcionales contenidos en proteínas, lípidos y carbohidratos que conforman la pared celular de los mismos, por lo que son considerados como intercambiadores catiónicos y actúan como polielectrolitos (Vanessa, 2007).

La bioacumulación se realiza con biomasa viva mientras que la cantidad del compuesto removido depende del proceso metabólico del crecimiento de la microalga y de la formación de sitios activos selectivos. Este proceso, requiere de: nutrientes, control de pH y temperatura (Haeng Cho *et al.*, 2012).

El proceso de bioacumulación se presenta como métodos de defensa contra la contaminación provocada por sustancias xenobióticas, algunas de ellas implican la producción de moléculas específicas como: glutatión, fitoquelatinas, proteínas de estrés térmico y especies reactivas del oxígeno y enzimas como: superóxido dismutasa, catalasa, ascorbato peroxidasa, Glutatión reductasa y glutatión-S-transferasa, en respuesta ante sustancias que les resultan tóxicas (Bioavan, 2016).

Este tipo de respuestas puede ocurrir de forma superficial o intracelular y se presenta de la siguiente manera: transporte a través de la membrana celular, precipitación, intercambio iónico y acomplejamiento con reacciones de óxido/reducción (figura 5), tomado de (Haeng Cho *et al.*, 2012).

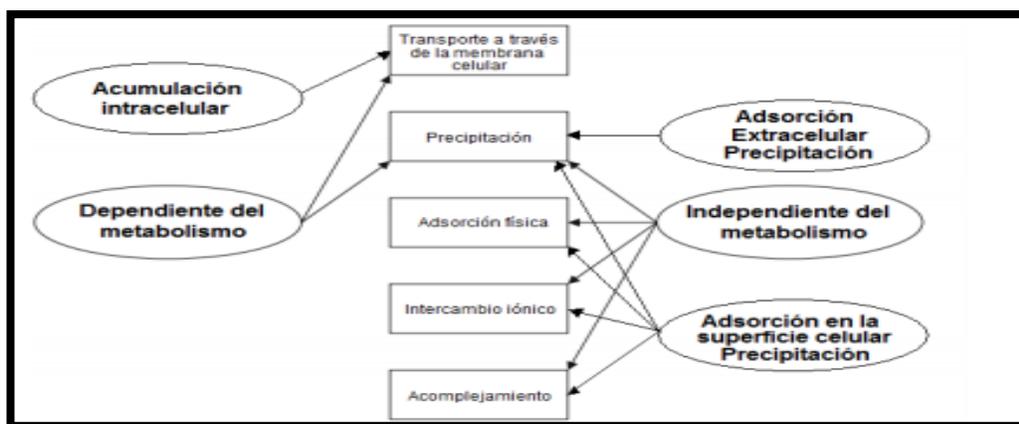


Figura 5 Mecanismo de defensa de material biológico vivo

Fuente: (Haeng Cho *et al.*, 2012)

2.8 Parámetros para el Cultivo de microalgas

Las condiciones para adaptación del cultivo deben semejarse al ambiente natural de la microalga y debe tener los siguientes componentes: medio de cultivo en recipientes adecuados, medios de cultivo con aireación continua para permitir el intercambio de dióxido de carbono entre el medio de cultivo, cantidad y calidad de nutrientes, luz, pH y temperatura (BioAvan, 2015).

2.8.1 Medio de cultivo

El medio de cultivo genérico para la producción de la microalga andina *Chlorella* sp., es NITROFOSKA foliar (tabla 3), el mismo que permite un crecimiento exponencial de la cepa cultivada (RAAE, 2016).

Tabla 3
Composición Química de Nitrofoska Foliar expresada en g/Kg.

COMPONENTE	CANTIDAD
Nitrógeno	300 g/Kg
Fósforo	100 g/Kg
Potasio	100 g/Kg
Magnesio	6 g/Kg
Hierro	0,5 g/Kg
Zinc	0,19 g/Kg
Manganeso	0,6 g/Kg
Boro	0,11 g/Kg
Cobre	0,19 g/Kg
Molibdeno	0,01 g/ Kg

Fuente: (Compo, 2011)

En el cultivo microalgal se deben considerar los siguientes requerimientos:

a) Temperatura

La mayoría de la especies de microalgas toleran temperaturas entre 16 y 27°C, aunque esto puede variar de acuerdo a la composición del medio de cultivo o la especie cultivada. Un valor intermedio de 18-20°C es frecuentemente empleado. Temperaturas por debajo de los 16°C pueden retardar el crecimiento, mientras que aquellas por arriba de los 35°C son letales para cierto número de especies (Camacho & Campos, 2009).

b) Luz

La generación de nueva biomasa es proporcionada por la energía que proviene de la luz, por tanto ésta, es considerada como el motor de crecimiento. Como en el proceso fotosintético de las plantas superiores, la luz es la fuente de energía que promueve las mismas reacciones en las algas. Por lo general se recomienda un fotoperíodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad (Camacho & Campos, 2009).

c) pH

El rango del pH para la mayoría de microalgas cultivadas es 7 y 9, siendo el rango óptimo 8.2-8.7. Para mantener un pH aceptable es necesario airear el medio de cultivo (Camacho & Campos, 2009).

d) Aireación

La aireación es necesaria para prevenir la sedimentación de microalgas, asegurando que todas las células de la población se encuentren expuestas a la luz y nutrientes y el intercambio de gases entre el medio de cultivo y aire (Camacho & Campos, 2009).

2.9 Reacción enzimática de óxido reducción

Como consecuencia del uso extenso de pesticidas en la agricultura, la detección de sus residuos en alimentos y ambiente se ha convertido en un área importante en ciencias analíticas. Los métodos actuales tales como cromatografía de gases, cromatografía líquida de alta performance y la espectrofotometría de masas se han utilizado con éxito para análisis de compuestos contaminantes, presentándose así una demanda creciente de tecnologías eficientes y económicas que cuantifiquen pesticidas o sus residuos en el ambiente y/o alimentos (Heinzen, 2006).

El método de acción del Kit de Pantalla OP/C consiste en un ensayo colorimétrico cualitativo que mediante inhibición y procesos de óxido-reducción de la enzima acetilcolinesterasa (ACh-E) detecta y cuantifica la presencia de organofosforados y carbamatos a 405 o 450 nanómetros (Abraxis, 2017).

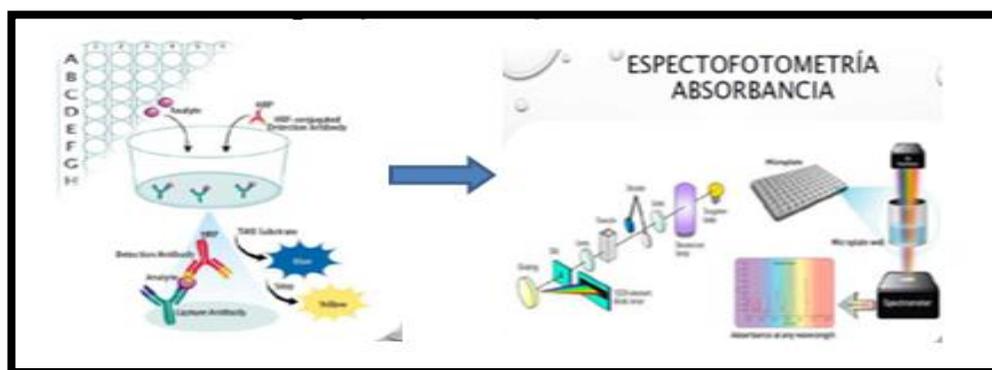


Figura 6 Acción enzimática de óxido reducción del Kit de Pantalla OP/C

Fuente: (Abraxis, 2017)

CAPÍTULO III METODOLOGÍA

3.1 Ubicación del lugar de investigación

El presente estudio se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Acuicultura y Recursos Acuáticos, ubicado en el bloque 6 de la Hacienda El Prado – IASA I perteneciente a la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, parroquia Sangolquí, cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha.



Figura 7 Hacienda el Prado IASA-I Laboratorio de Acuicultura
Fuente: (Google Maps, 2017).

3.1.1 Ubicación ecológica

El laboratorio de Recursos Acuáticos se encuentra a 2748 m.s.n.m. y cuenta con los siguientes datos meteorológicos (Arce, 2017):

- Zona de vida: Bosque húmedo Montano
- Luminosidad: 12 horas luz
- Temperatura media: 13,89 °C
- Precipitación anual: 1285 mm/año
- Humedad relativa: 69,03%

El presente estudio se realizó, bajo condiciones ambientales controladas.

3.2 Materiales

3.2.1 Biológicos

- Cepa de microalga *Chlorella sp.* Biotipo 3, aislada del sistema lacustre del Quilota.
- 5 g de *Artemia salina*.

3.2.2 Insumos de laboratorio

- 10 matraces Erlenmeyer de 1 litro de capacidad.
- 30 recipientes plásticos de 1 litros de capacidad.
- 4 tanques plásticos de 20 litros de capacidad.
- 1 Cámara de Neubauer.
- 90 cajas Petri de plástico.
- 100 tubos falcon de 50 ml.
- 30 Tubos de ensayo termo-resistentes
- Gradillas
- Puntas de pipeta de 1000 μ l
- Puntas de pipeta de 200 μ l
- Puntas de pipeta de 50 μ l
- Tubos eppendorf de 1ml

3.2.3 Equipos

- Espectrofotómetro UV (GENESYS™ 10S)
- Espectrofotómetro Termo spectronic genesys 20
- Lector de ELISA (μ Quant MQX200)
- Incubador – agitador (Stat Fax – 2200)
- Vórtex (Genie 2)
- Microcentrífuga (MICROMAX RF)
- Balanza electrónica (M – 220D)
- Microscopio óptico OLYMPUS.
- Centrífuga MX 8624.

- Equipo de medición de autodiagnóstico de DBO OxiTop® IS
- Termorreactor de laboratorio CR 2200
- Incubadora de laboratorio.
- pH-metro HANNA.
- 6 motores doble salida para acuario.
- Equipo Kjendahl para determinación de proteína
- Equipo Soxhlet para determinación de grasa
- Estufa Ecocell
- Mufla para determinación de cenizas
- Cámara de extracción de gases
- Refrigerador
- Computador
- Cámara digital

3.2.4 Reactivos

- Kits de análisis enzimático ELISA OP/C Abraxis
- Fertilizante foliar Nitrofoska.
- Agar agar
- Reactivos para DQO (Dicromato de potasio, ácido sulfúrico, sulfato de mercurio, sulfato de plata)
- Hidróxido de sodio para DBO₅
- Dimetil Sulfoxido (DMSO)
- Agua ultra pura
- Metanol 99%

3.3 Métodos

La investigación se realizó en dos fases como se observa en la figura 8:

- La primera fase contempló; la purificación, masificación, y cosecha de biomasa microalgal, para realizar los análisis de contenido nutricional y toxicológico de *Chlorella* sp. Biotipo 3. Además se incluye el bioensayo de letalidad de pesticidas sobre la biomasa de *Chlorella* sp.

- La segunda fase evaluó la capacidad de crecimiento microalgal, pH, parámetros químicos como; DQO, DBO₅, DBO₅ / DQO y el contenido residual de los pesticidas (Chlorpyrifos y Methomyl) mediante el Kit de Pantalla OP/C.

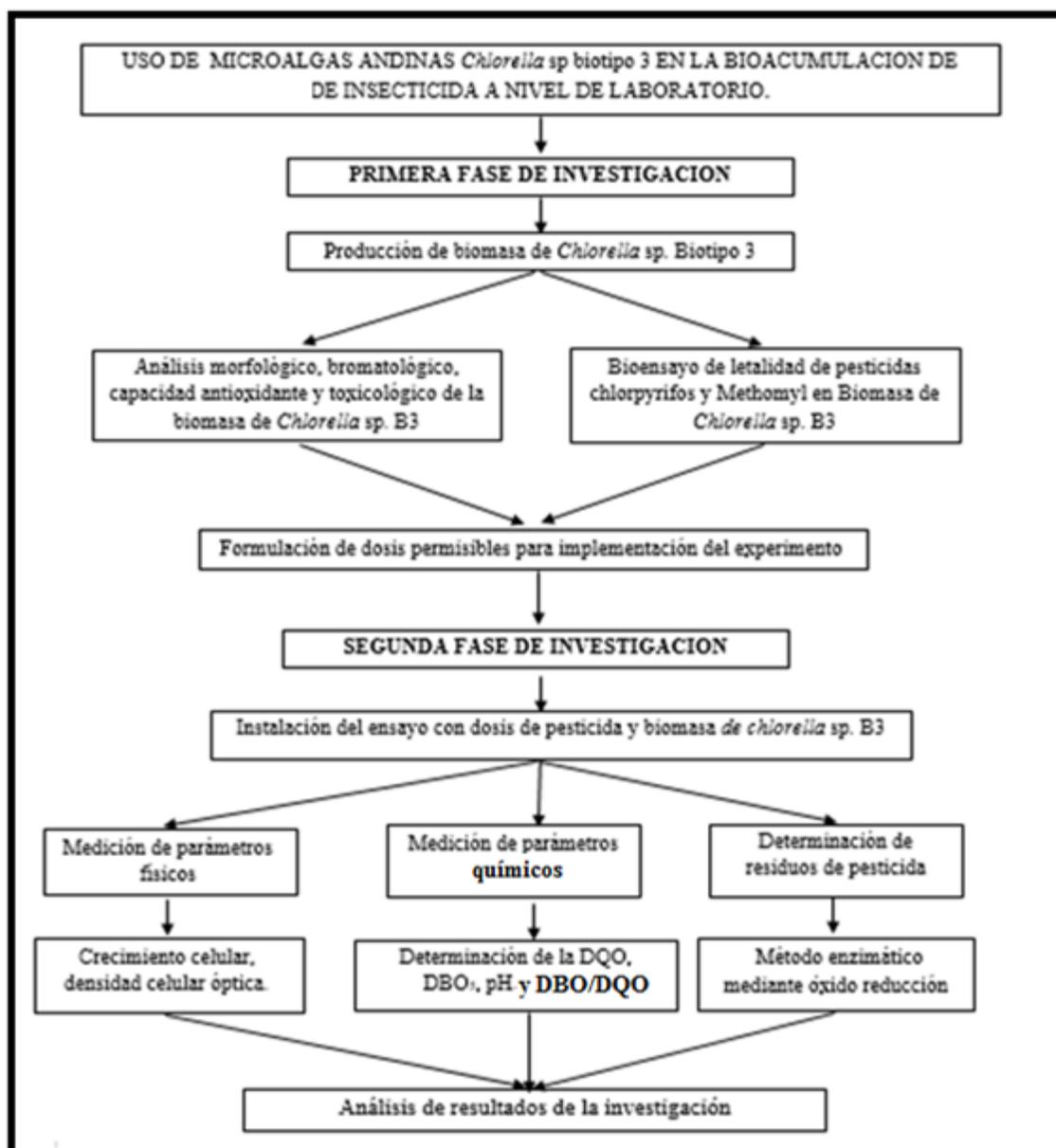


Figura 8 Esquema de la metodología del proyecto de investigación

3.3.1 Primera fase

3.3.1.1 Purificación de *Chlorella* sp. Biotipo 3

La purificación de la cepa se realizó bajo condiciones de cámara de flujo laminar y se utilizó cajas petri con medio Agar+Agar (1500 mg/l) + fertilizante foliar Nitrofoska (570 mg/l) previamente autoclavados. Se procedió a la siembra con un asa de platino y se selló con parafilm. Las cajas petri se mantuvieron a temperatura ambiente $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, con irradiación ($78.8 \mu\text{mol quanta m}^2/\text{s}$). Transcurridos 3 días se procedió a la valoración microscópica hasta obtener la pureza de la cepa.

3.3.1.2 Masificación de la microalga

Para iniciar con el proceso de masificación se utilizó la cámara de flujo laminar donde se tomó con asa de platino muestras de la cepa *Chlorella* sp. Biotipo 3 previamente purificada y se colocó en tubos de ensayo que contenían 10ml con agua destilada y fertilizante foliar Nitrofoska (570mg/l). Los tubos fueron cubiertos con tapones de gasas estériles para permitir el intercambio gaseoso y fueron expuestos a iluminación artificial con irradiación ($78.8 \mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$) y 12/12 de horas de fotoperiodo.

3.3.1.3 Producción de la microalga

Para la producción de la microalga se procedió a depositar el contenido de los tubos de ensayo en matraces Erlenmeyer autoclavados con 200 ml de medio nutritivo en las condiciones antes señaladas. Se implementó aireación permanente mediante un motor de 2W y se mantuvo a temperatura ambiente $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, cada 3 días fueron adicionados con 200 ml de medio de cultivo nuevo para enriquecer con nutrientes a las cepas hasta alcanzar a los quince días, en un litro de medio de cultivo. Cuando se llegó a este volumen se procedió cada 3 días a realizar el seguimiento mediante espectrofotometría UV utilizando como blanco el medio nutritivo y calibrando el equipo a una longitud de onda de 680 nm. Mediante cámara de Neubauer y microscopio óptico se realizó el conteo celular utilizando la siguiente formula:

$$\text{DC Inóculo} = N \times 10^4 \times \text{FD}$$

Donde:

- DC Inoculo: Densidad celular del inóculo (células/mL)
- N: Promedio de células presentes. De acuerdo al número de cuadrantes contados en la cámara de Neubauer.
- 10^4 : Factor de conversión de 0.1 μ L a 1 mL.
- FD: Factor de dilución

Cuando el cultivo microalgal alcanzó la concentración de 2 millones de células/ml se procedió a depositar su contenido en tanques estériles de plástico de 20 litros de capacidad, cada tanque fue expuesto a las mismas condiciones de nutrición, aireación e iluminación. Cada 3 días se añadió medio nutritivo a los tanques que contenían la microalga; para determinar el volumen de inóculo de microalga y medio nutritivo, se empleó la formula universal $C1V1=C2V2$.

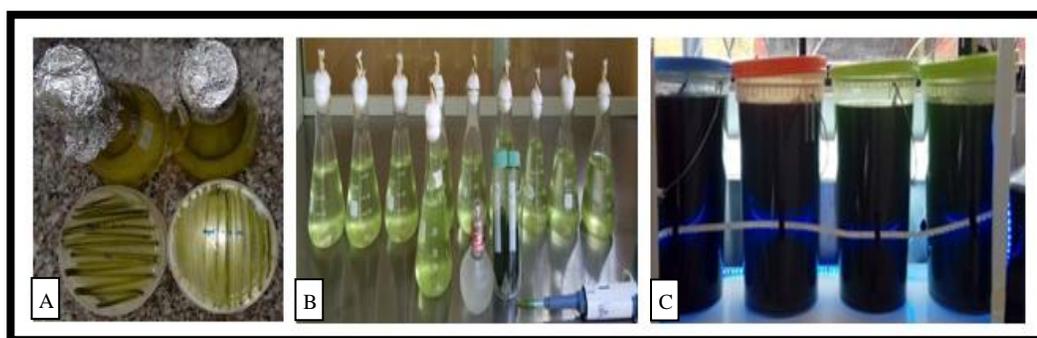


Figura 9 Proceso de producción de la biomasa de *Chlorella* sp. (A) purificación; (B) masificación; (C) obtención de biomasa

3.3.1.4 Cosecha de la biomasa de *Chlorella* sp. Biotipo 3

Cuando el cultivo de *Chlorella* sp., mantenido en los tanques de masificación de 20 litros de capacidad, alcanzó la densidad celular de (23 millones de células/ml), se procedió a cosechar la biomasa microalga, para lo cual se recolectó el contenido de los tanques en botellones estériles que fueron mantenidos en refrigeración a 4°C y oscuridad durante 3 días para permitir la sedimentación y preservación.

El sedimento se recolectó en tubos falcon de 50 ml, se centrifugó a 2500 rpm durante 5 minutos y el residuo se secó en una estufa a 35°C durante 48 horas. La

biomasa seca fue almacenada en recipientes de vidrio hermético y almacenado en refrigeración a 4 ° C.

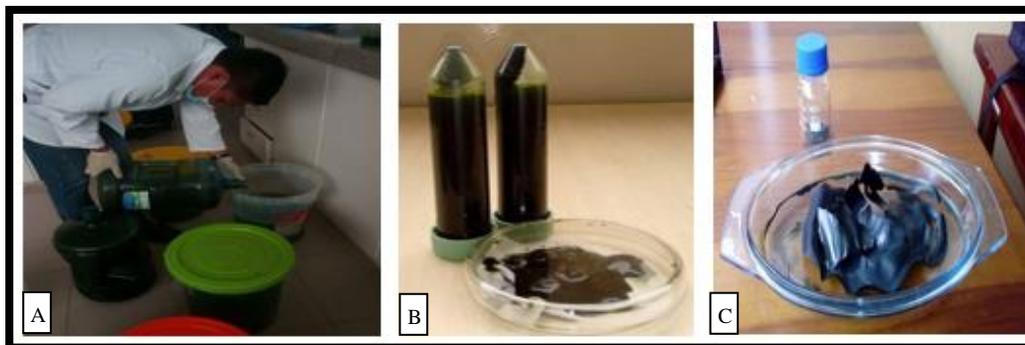


Figura 10 Cosecha de la *Chlorella* sp. B3
(A) sedimentación; (B) centrifugación; (C) secado

3.3.1.4.1 Análisis proximal de la biomasa de *Chlorella* sp. Biotipo 3

Se realizaron las siguientes pruebas bromatológicas; Kjeldahl para la determinación del contenido protéico, Soxhlet para precisar el contenido de grasas y técnicas de secado y calcinación para obtener el porcentaje total de humedad y cenizas respectivamente. Los protocolos de cada ensayo se realizaron en base al manual de métodos de análisis para la determinación nutricional de alimentos (Camba, 1982).

Cabe recalcar que los resultados de cada prueba fueron contrastados con un control comercial de leche en polvo.

3.3.1.4.2 Proteína

Para obtener el porcentaje de proteína se utilizó el método Kjeldahl el cuál constó de 3 fases:

- Digestión: Se pesó 3g de muestra envuelta en papel parafina y se colocó en el balón Kjeldahl de 800 ml con 25 ml de H₂SO₄ para luego ser transportadas al digestor Kjeldahl por el transcurso de 2 horas en posición inclinada a 300°C. Después de este periodo de tiempo la solución se torna de color verde claro, lo cuál indica que la fase de digestión culminó, se debe apagar el equipo y dejar enfriar por 30 min
- Destilación: se añadió 250 ml de agua destilada al balón Kjeldahl, luego de 10 minutos se adicionan 100ml de NaOH al 40%. Simultáneamente en un

Erlenmeyer se preparó la solución indicadora con 50 ml de ácido bórico al 4% más 4ml de colorante. Se mezcló y se colocó en el equipo Kjeldahl las soluciones indicadoras y diluciones iniciales para que inicie el proceso de destilación. Este proceso concluye al obtener 250 ml de solución en el Erlenmeyer.

- Titulación: se tituló el contenido del matraz Erlenmeyer con la solución 0,1 N de ácido clorhídrico hasta que se observa un cambio de color claro a violeta, y se registró el volumen del titulante. Para finalizar el proceso se utilizó la siguiente fórmula para obtener el porcentaje de nitrógeno.

$$\% \text{Nitrógeno} = \frac{0,014 (V1 - V0)N}{M} 100$$

Donde:

V1: Volumen de ácido clorhídrico utilizado en la titulación.

V2: Volumen de ácido clorhídrico utilizado en la titulación del blanco.

N: Normalidad del ácido clorhídrico.

M: muestra en gramos.

Una vez calculado en porcentaje de nitrógeno se multiplicó por 6,38 para obtener el contenido de Proteína.

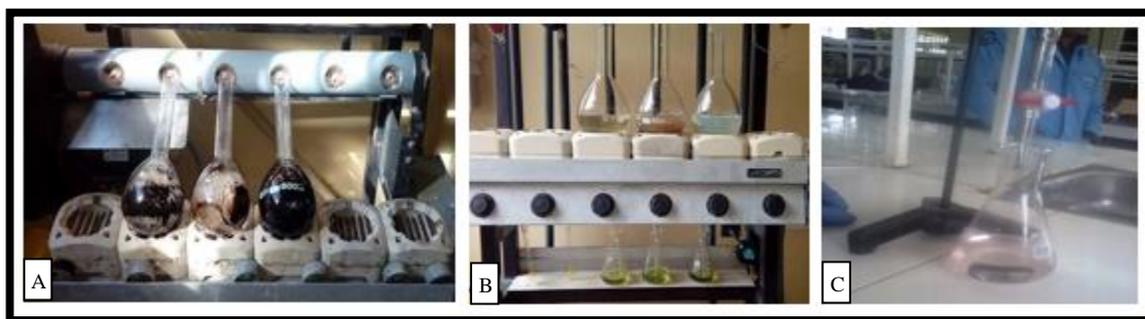


Figura 11 Determinación de proteína total por el método de Kjeldahl (A) digestión; (B) destilación; (C) titulación

3.3.1.4.3 Grasas

Para determinar el porcentaje de grasa se utilizó el método Soxhlet. Se tomó el peso inicial del balón de 400 ml vacío más 5 esferas de vidrio. A parte se pesó 3g de muestra, se instaló el equipo de destilación como se indica en la figura 12 agregando 120 ml de

metanol 99% y se calentó a 250°C hasta producir el sifón por cuarta ocasión. Luego se acopló un condensador para destilar el contenido del balón de destilación y recuperar el solvente, una vez finalizada la extracción del solvente se deja el balón de vidrio por 24 horas en la estufa a 80°C después de este período de tiempo se procedió a tomar la diferencia de pesos final e inicial para obtener el porcentaje de la muestra.



Figura 12 Determinación del porcentaje de grasas mediante el método Soxhlet (A) Destilación;(B) Extracción del solvente; (C) obtención del porcentaje de grasa

3.3.1.4.4 Cenizas

Para conocer el porcentaje de ceniza se tomó el peso inicial de cápsulas de porcelana, más 3 gramos de muestra y se las calentó para eliminar el exceso de humedad dentro de la cámara de extracción de gases durante 45 minutos (figura 13). Luego se colocó la muestra en una mufla durante 4 horas a 600°C. Finalmente mediante diferencia de peso final e inicial se encontró el porcentaje de ceniza de la microalga.

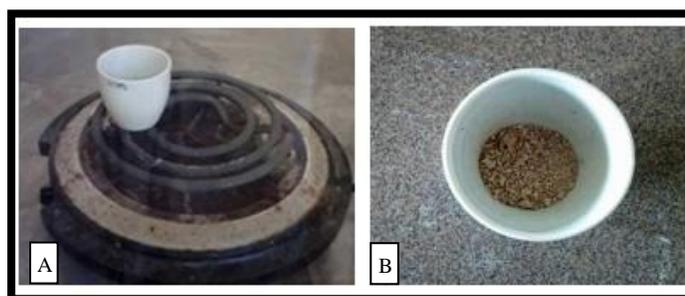
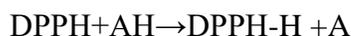


Figura 13 Determinación del porcentaje de ceniza (A)Secado; (B) Calcinación

3.3.1.4.5 Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante se determinó mediante el método DPPH establecido por Blois (1958), quien explica que DPPH es un radical libre y que al reaccionar con la microalga (AH), reduce el reactivo como se explica en la siguiente ecuación.



La metodología utilizada en la presente investigación se encuentra detallada en la figura 14. Para hallar el porcentaje de la capacidad antioxidante se realizó una curva de calibración a partir de las diluciones: (0.1; 0.3; 0.5; 0.7; 0.9 y 1 ppm) de DPPH y espectrofotometría a 517nm.

La curva de calibración para cuantificar la capacidad antioxidante viene dada por la siguiente ecuación:

$$Y = 10,75903X - 1,765342E - 02$$

Donde x representa la concentración de la capacidad antioxidante, determinada a su vez mediante la siguiente fórmula

$$\%CA = \frac{100 - (\text{Abs muestra} - \text{Abs blanco})}{\text{Abs blanco}} \cdot 100$$

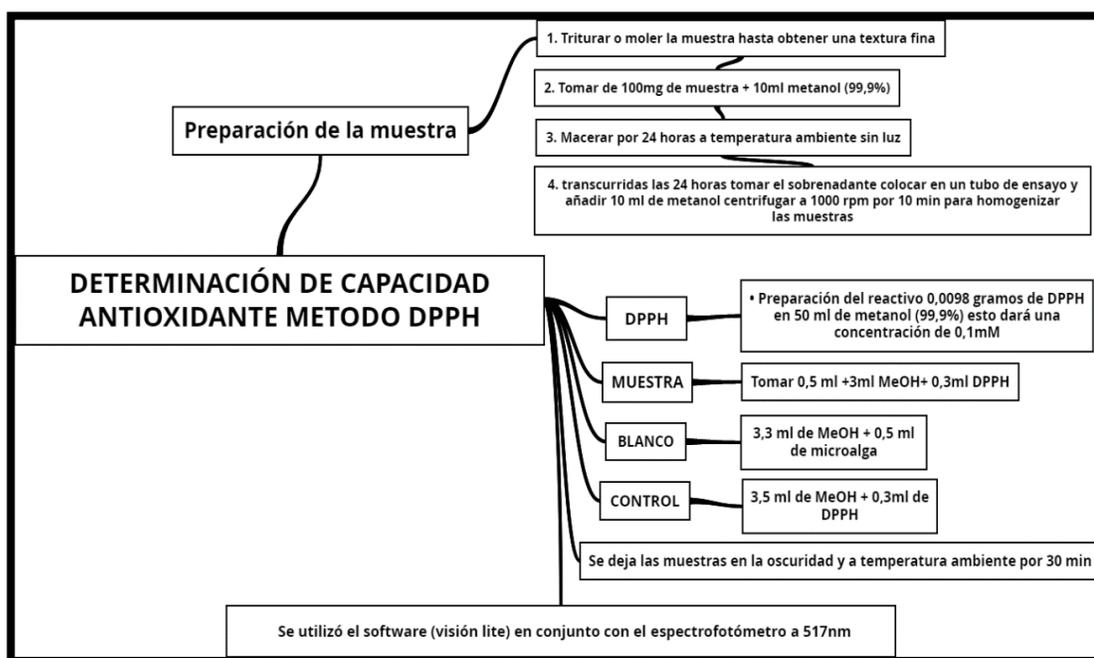


Figura 14 Determinación de la capacidad antioxidante de *Chlorella* sp. B3

3.3.1.4.6 Determinación de compuestos fenólicos totales

Se utilizó el método foto-colorimétrico de Folin–Ciocalteu el cual se encuentra detallado en la (figura 15); para lo que se empleó una curva de calibración obtenida a partir de las diluciones (100, 300, 500, 700, 900 y 1000 ppm) con reactivo de Folin y espectrofotometría a 760nm.

La curva de calibración para determinar los compuestos fenólicos totales de la microalga viene dada por la ecuación:

$$Y = 1,280151E - 03X - 4,786227E - 02$$

Donde x representa la concentración de la compuestos fenólicos totales

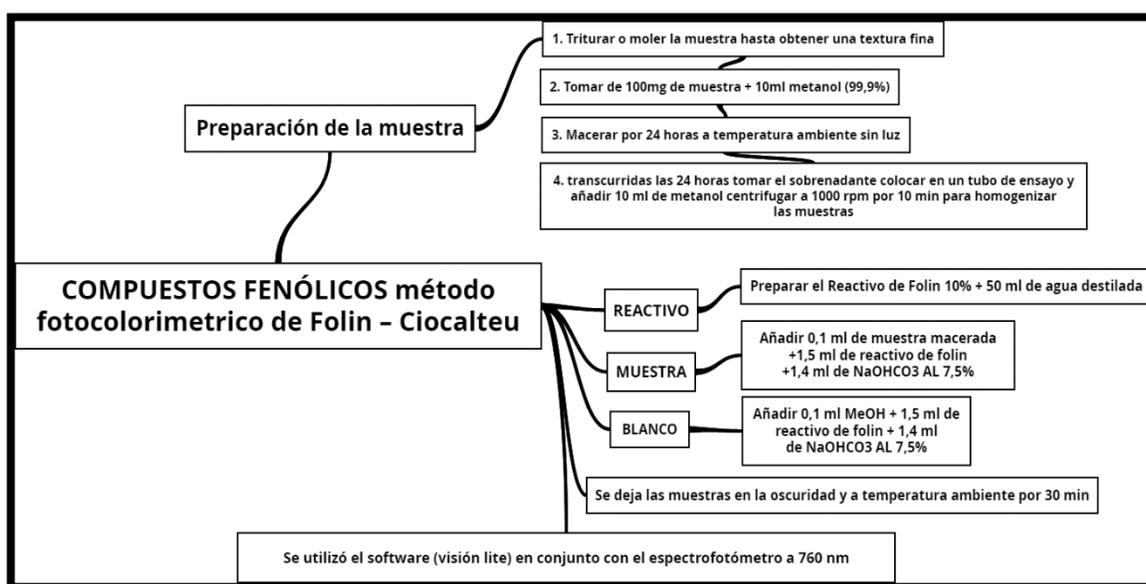


Figura 15 Determinación de compuestos fenólicos totales

3.3.1.4.7 Determinación de clorofila α , β y carotenos

Para la determinación de los siguientes metabolitos se preparó la muestra de la siguiente manera:

- Triturar o moler la muestra hasta obtener una textura fina
- Tomar de 10 mg de muestra + 10ml metanol (99,9%)
- Macerar por 24 horas a temperatura ambiente sin luz
- 24 horas después tomar el sobrenadante colocar en un tubo de ensayo

- Añadir 10 ml de metanol centrifugar a 1000 rpm por 10 min para homogenizar las muestras.

A continuación se tomó mediciones con el espectrofotómetro a longitudes de onda de 480, 652 y 665nm, Una vez verificado que estas absorbancias se ubicaron dentro del rango aceptable, para su medición se cuantifico clorofila α , β mediante la ecuación propuesta por (Marker, 1980) y caroteno a través de la ecuación propuesta por (Strickland & Parson, 1972).

Clorofila α (mg/g)

$$\frac{13,14 * A_{665} * \text{Vol Extracto}}{\text{Volumen de la Muestra}}$$

Clorofila β (mg/g)

$$= 39,04 * A_{652} - 15,28 * A_{665}$$

Caroteno (mg/g)

$$\frac{A_{480} * 4 * \text{Vol Extracto}}{\text{Volumen de la Muestra}}$$

3.3.1.4.8 Bioensayo de toxicidad de *Chlorella* sp. Biotipo 3 en *artemia salina*

Para determinar los niveles de toxicidad de la biomasa de *Chlorella* sp., en la supervivencia de *Artemia salina* se procedió de la siguiente manera:

- Se inició con el proceso de eclosión de nauplios de artemia, para lo cuál se hidrataron 1 g de cistos en 1 litro de agua durante 40 minutos. Se colocaron en un matraz Erlenmeyer 500 ml de agua purificada en la que se disolvieron 12,5 g de sal en grano. Se instaló un sistema de aireación permanente, iluminación artificial y calentamiento a 25°C (Sánchez & Neira, 2005).
- El segundo paso consistió en la preparación de una solución madre disolviendo 60 mg de biomasa de *Chlorella* sp. en 15 μ l de dimetil sulfóxido DMSO (por tratarse de una muestra apolar) y 6 ml de agua destilada. A partir de esta solución madre se prepararon por triplicado diluciones de 0, 1, 10, 100, 250, 500, 1000, 2000 ppm, transfiriendo 0, 0.5, 5, 50, 125, 250, 500 y 1000 μ l respectivamente a tubos de ensayo, que contenían 10 nauplios de artemia de 48 horas post-eclosión y 5 ml de agua de mar (Huamán, et al., 2003)

- Después de 24 horas utilizando un estéreo microscopio se contó el número de nauplios sobrevivientes por cada dilución y se determinó el porcentaje de mortalidad a través de la siguiente fórmula:

$$\% \text{mortalidad} = (\# \text{ nauplios muertos} / \# \text{ nauplios iniciales}) * 100.$$



Figura 16 Bioensayo de letalidad biomasa de *Chlorella* sp. B3 en *Artemia salina* (A) Preparación de nauplios; (B) preparación de DMSO; (C) verificación de la supervivencia

3.3.1.4.9 Bioensayo de letalidad de pesticida sobre *Chlorella* sp. Biotipo 3

Se trabajó mediante la técnica antibiograma disco-placa basado en la metodología de Bauer-Kirb y citada por (Bernal & Guzman, 1984). Se utilizó cajas Petri esterilizadas y en la superficie de agar con medio nutritivo Nitrofoska se inoculó la microalga y se colocaron discos de papel secante impregnados con los pesticidas (chlorpyrifos y methomyl) en concentraciones de (400, 600, 800, 1000, 1200 y 1400ppm). Transcurridas las 96 horas se procedió a valorar la difusión radial de los pesticidas sobre la microalgas (figura 17).

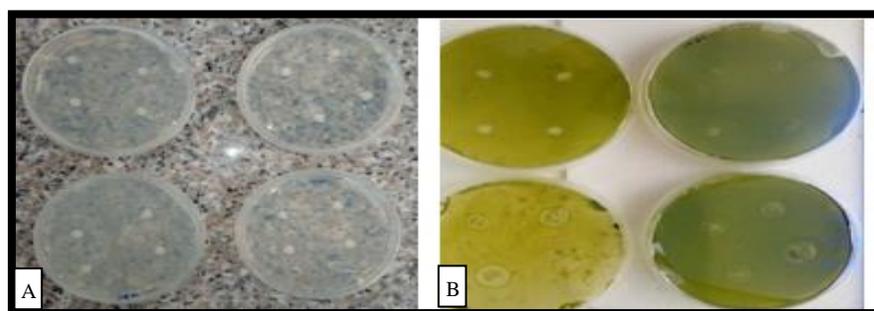


Figura 17 Bioensayo de letalidad de pesticidas (A) Preparación de cajas Petri; (B) crecimiento microalgal

3.3.2 Segunda Fase

Una vez conocida la toxicidad de la microalga y dosis permisibles de pesticidas en la biomasa microalgal se procedió a instalar el experimento. Para ello, se distribuyeron 6 aireadores y una lámpara led de 1,20 m y 400 lumens, en 24 botellas de vidrio de 600 ml de capacidad, cabe recalcar que las botellas fueron previamente esterilizadas y etiquetadas con los respectivos tratamientos (figura 18).

En las botellas se colocaron 250 ml de agua filtrada + pesticidas en dosis de 500, 700 y 900 ppm, respectivamente; posterior a ello, se añadió 100 ml de microalgas en concentración de 3 millones de células/ml. La evaluación de parámetros físicos, químicos y concentración residual de pesticida se llevó a cabo cada 3 días.



Figura 18 Instalación del ensayo; pesticidas-biomasa de microalga

3.3.2.1 Medición de parámetros físicos

El crecimiento celular se cuantificó mediante cámara de Neubauer y la densidad óptica fue determinada con espectrofotometría a 680 nm; mientras que el pH se analizó con el equipo Tester Medidor.

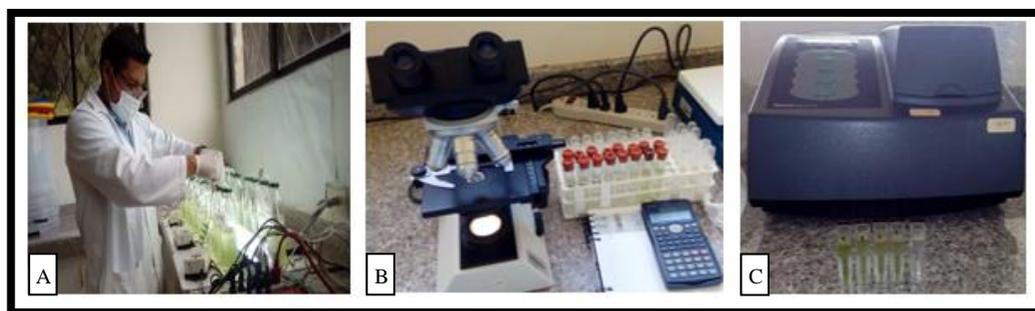


Figura 19 Medición de parámetros físicos

(A) Selección de muestras; (B) conteo celular; (C) densidad óptica

3.3.2.2 Medición de parámetros Químicos

Se determinó la Demanda Química de Oxígeno (DQO) mediante la metodología de dicromato de potasio y la Demanda Biológica de Oxígeno al quinto día, acuerdo al DQO teórico obtenido, para lo cuál se procedió de la siguiente manera:

3.3.2.3 Demanda Química de Oxígeno (DQO)

Para el análisis de la Demanda Química de Oxígeno: (DQO) se utilizó el método de Dicromato de Potasio establecido por (De la Torre, 2009), el cuál mide el material orgánico susceptible de ser oxidado y transformado en dióxido de carbono y agua por una sustancia química.

Para la determinación de la DQO se elaboraron 2 soluciones:

Solución digestora A:

- 5,108g de $K_2Cr_2O_7$
- 250ml de agua destilada
- 83,5ml H_2SO_4
- 16,65g $HgSO_4$

Solución ácida de oxidación B:

- 3g Ag_2SO_4
- 200ml H_2SO_4

En tubos de ensayo resistentes al calor (para el termo reactor) se colocaron:

- 3ml de la solución A, 3ml de la muestra previamente centrifugada a 1000 rpm durante 10 minutos y de 3ml de solución B

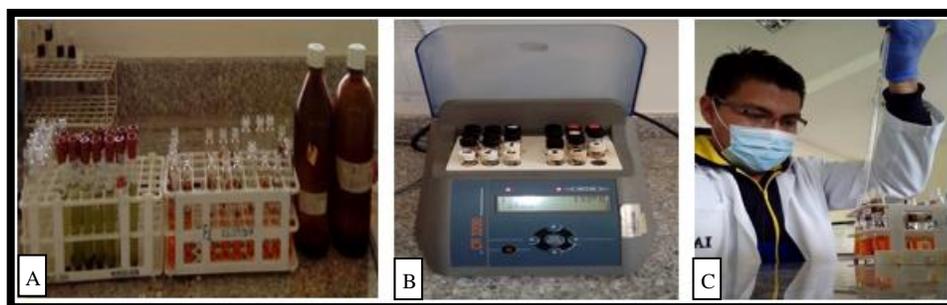


Figura 20 Ensayo de la DQO
 (A) Preparación de las muestras; (B) muestras en el termo reactor; (C) medición mediante espectrofotometría

Una vez preparadas las soluciones, se colocaron las muestras en tubos de vidrio resistentes al calor y se ubicaron dentro del termo reactor durante 2 horas a 150°C. Transcurrido el tiempo, se dejó enfriar y se realizó la medición de las muestras por triplicado más un blanco con agua destilada en el espectrofotómetro a 600 nm.

Para determinar los valores de DQO se realizó una curva de calibración a partir de las diluciones: (100, 200, 300, 400, 500 y 600 ppm) de F-talato y mediante espectrofotometría se cuantifico a 600 nm.

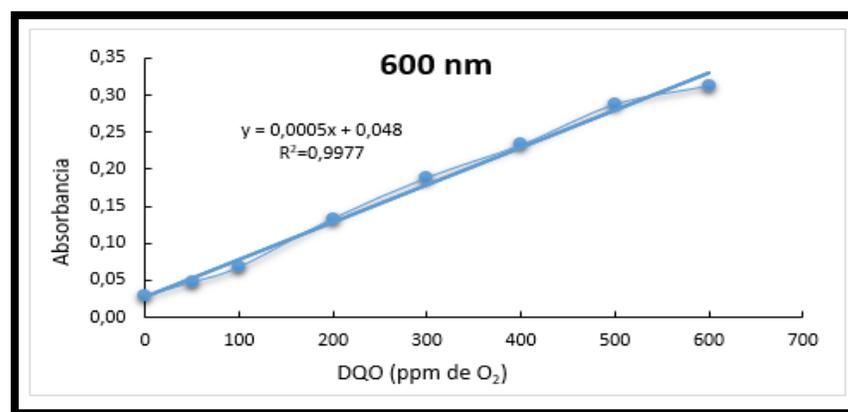


Figura 21 Curva de calibración para DQO

Con el remplazo de los valores obtenidos de la curva de calibración, en la siguiente fórmula se determinó el valor final de DQO

$$DQO = \frac{A - 0,048}{0,0005}$$

Donde, A es el valor obtenido en el espectrofotómetro a 600 nm, y el resultado obtenido se expresa en ppm de oxígeno diatómico por litro (mg de O₂/l).

Nota: La fórmula no es fija, cada vez que se preparan nuevos reactivos es necesario reajustar la curva de calibración, para lo cual se utiliza una solución estándar con una DQO de 10.000 ppm O₂. Esta solución es realizada con 1,7g de F-talato mono potásico y 200ml de agua destilada.

3.3.2.4 Demanda Biológica de Oxígeno (DBO₅)

Para obtener la DBO₅ es necesario conocer inicialmente la DQO, a partir de este dato se debe calcular la DBO teórica. Una vez obtenido este valor se determinó la cantidad de muestra a utilizar según la tabla 4.

Tabla 4
Volumen para la determinación de la DBO₅

Rango de DBO teórica (mg O ₂ /L).	ml de muestra	Factor
0-40	432	1
0-80	365	2
0-200	250	5
0-400	164	10
0-800	97	20
0-2000	43,5	50

Fuente: (De la Torre, 2009)

Se procedió a colocar la cantidad indicada de muestra en las botellas ámbar del equipo Oxitop, más 2 pastillas de hidróxido de sodio en el capuchón y el imán de agitación en el interior de la botella. Se enceran los cabezales y transcurridos los 5 días se observaron los resultados en ppm de oxígeno.



Figura 22 Ensayo de la DBO₅

3.3.2.5 Determinación de residuos de pesticida

La cuantificación residual de pesticida (chlorpyrifos y methomyl) fue obtenida mediante el análisis enzimático por medio de un proceso de óxido reducción, para lo que se empleó el protocolo establecido por el proveedor OP/Carbamate - Abraxis Kits descrito en la figura 23.

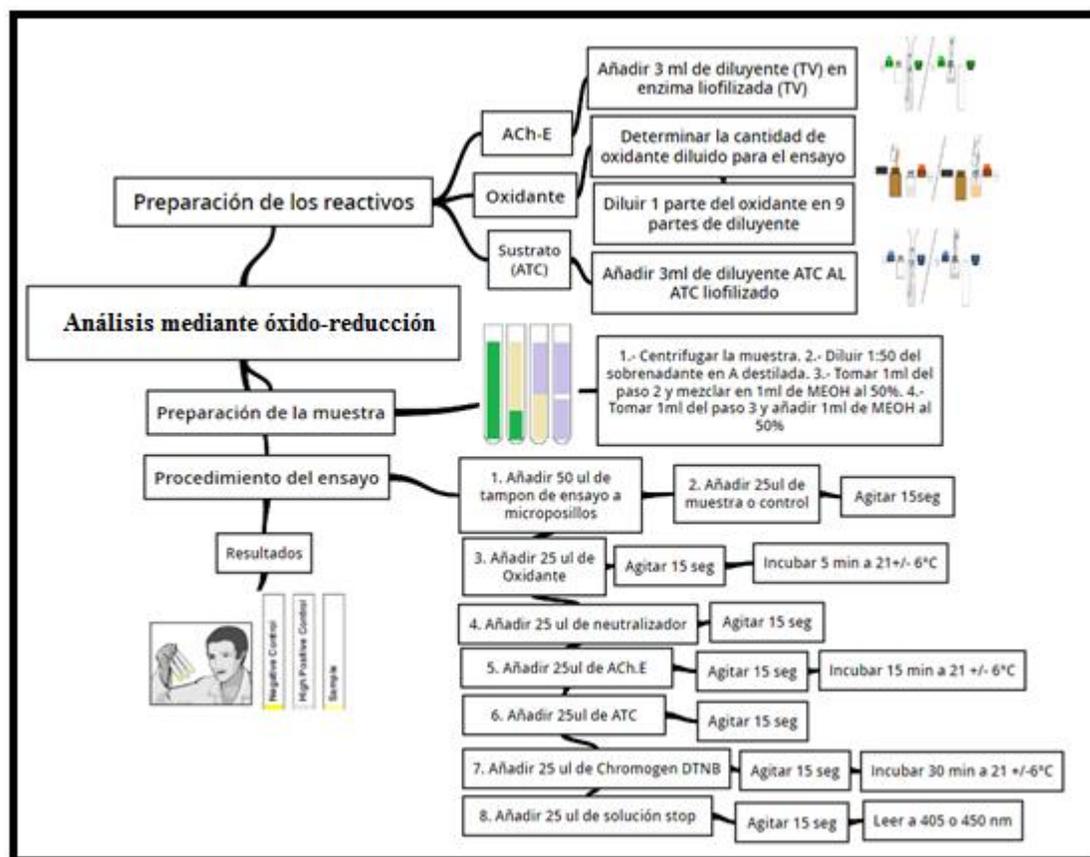


Figura 23 Esquema del protocolo de óxido-reducción, aplicado en el estudio

Para determinar los valores residuales de (chlorpyrifos y methomyl) se realizó una curva de calibración a partir de las diluciones: 5, 2, 0.5 y 0.1 ppm de diazinon (control positivo (Insecticida organofosforado) en MeOH al 50%.

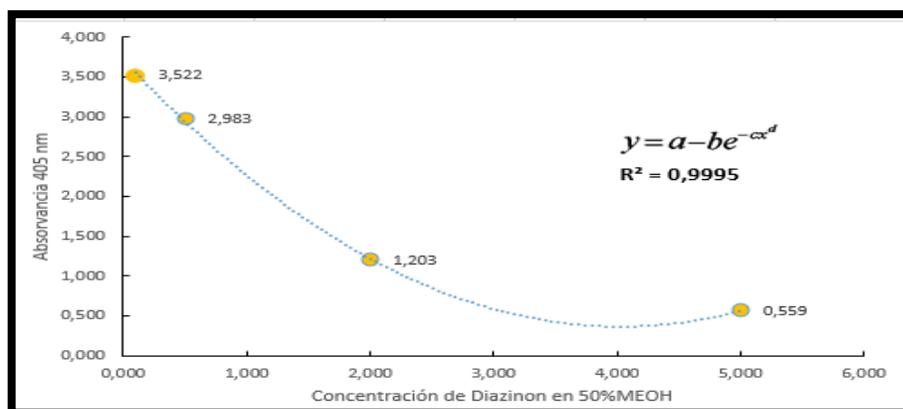


Figura 24 Curva de calibración para análisis de óxido reducción

Con el remplazo de los valores obtenidos de la curva de calibración, en la siguiente fórmula se cuantificó el contenido residual de los pesticidas.

$$y = a - be^{-\alpha x^d}$$

En donde **X** es el valor obtenido en el espectrofotómetro a 405 nm, y el resultado obtenido se expresa en ppb del pesticida (Chlorpyrifos y Methomyl).

Nota: La fórmula no es fija, cada vez que se preparan nuevos reactivos es necesario reajustar la curva de calibración.



Figura 25 Test enzimático de óxido-reducción

3.3.3 Diseño experimental.

3.3.3.1 Factores

El factor a analizar fue el tipo de pesticidas (chlorpyrifos y methomyl), cada uno en cuatro concentraciones (Tabla 5).

Tabla 5
Factor de la investigación y sus niveles

Código	Pesticida	Concentración	
		Código	ppm
P1	Chlorpyrifos	D0	0
		D1	500
		D2	700
		D3	900
P2	Methomyl	D0	0
		D1	500
		D2	700
		D3	900

3.3.3.2 Tratamientos a comparar

Para el desarrollo de la presente investigación, se emplearon 6 tratamientos: un control para cada pesticida; los pesticidas empleados y sus dosis se pueden observar en la tabla 6.

Tabla 6
Descripción de tratamientos

Tratamiento	Código	Concentración
T0	P1D0	0 ppm
T1	P1D1	500 ppm
T2	P1D2	700 ppm
T3	P1D3	900 ppm
T4	P2D0	0 ppm
T5	P2D1	500 ppm
T6	P2D2	700 ppm
T7	P2D3	900 ppm

3.3.3.3 Tipo de diseño

Se aplicó un diseño completamente al azar (DCA) 2x4 con 3 repeticiones.

3.3.3.4 Características de las Unidades Experimentales

Se emplearon 24 botellas de vidrio cuya capacidad fue de 600 ml, estas contuvieron 100 ml de microalga en concentración de 3×10^6 células/ml y 250 ml del pesticida diluido en agua filtrada.

3.3.3.5 Croquis del diseño

El croquis experimental, se realizó en base a la distribución aleatoria de las unidades experimentales, figura 26.

T0	T2	T3	T3
T1	T4	T5	T6
T4	T6	T1	T7
T1	T0	T5	T7
T5	T6	T4	T2
T7	T0	T2	T3

Figura 26 Croquis del diseño experimental de la investigación

3.3.4 Variables del estudio

Las variables fueron clasificadas en 3 grupos de acuerdo a su método de determinación y la frecuencia de medición; a continuación se describen las variables dentro de cada grupo:

3.3.4.1 Variables físicas

El pH y crecimiento celular fue determinado mediante el medidor multi-parámetros (Hanna) y cámara de Neubauer, estas variables se evaluaron cada 3 días por el transcurso de 21 días.

3.3.4.2 Variables Químicas

Para analizar la calidad del agua se determinó La DQO, DBO₅ y la relación DQO/DBO₅, las mismas que fueron evaluadas en la primera y tercera semana.

3.3.4.3 Determinación de residuos de pesticidas

Esta variable se determinó a los 14 días. Debido a que el experimento se reinstaló por segunda vez para encontrar similitud en los valores obtenidos los primeros 14 días.

3.3.5 Análisis estadístico

Para el análisis de los datos obtenidos en la investigación se empleó el software informático Statgraphics Centurion XV, en el que se realizó un análisis de covarianza utilizando modelos lineales generales mixtos.

3.3.5.1 Transformación de datos

Los datos de crecimiento celular no cumplieron con supuestos de normalidad y homocedasticidad y fueron transformados para poder ser analizados.

3.3.5.2 Modelo matemático

El modelo matemático se define por:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

Donde:

μ = media poblacional

T_i = efecto del i-ésimo tratamiento

e_{ij} = error experimental

3.3.5.3 Esquema de análisis de varianza

Tabla 7

Análisis de varianza para el diseño experimental del estudio

Fuentes de variación	Grados de libertad	
Tratamientos	t-1	6
Error experimental	(n-1)-(t-1)	17
Total	n-1	23

3.3.5.4 Análisis funcional

La prueba de significación empleada para el análisis de medias de las variables por tratamiento en el presente estudio fue LSD de Fisher (mínima diferencia significativa) con un nivel de significancia del 0,05%.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resultados

4.1.1 Características morfológicas

Esta microalga presenta conformación esférica, pared celular ligeramente rugosa, coloración verde y un diámetro promedio de 2 μm , características morfológicas que la definieron como una microalga del género *Chlorella* (Figuras 27 y 28).



Figura 27 Cepa pura de *Chlorella* sp. Biotipo 3

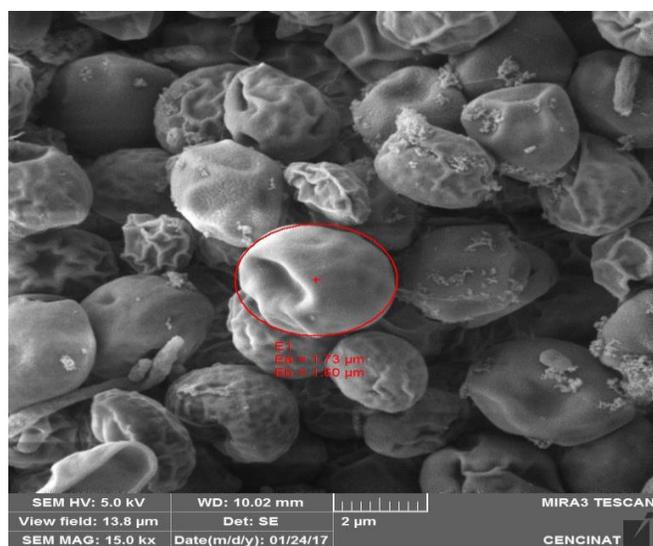


Figura 28 Vista del diámetro de *Chlorella* sp. B3 mediante microscopia electrónica

Fuente: (Ortíz, 2017)

4.1.2 Producción de biomasa

Al día 27 la biomasa de microalga cosechada, alcanzó una densidad celular promedio de 23 millones de células/ml, equivalente a la lectura de 1,080 por espectrofotometría UV, como se presenta en las figuras 29.

Tabla 8

Promedio y desviación estándar del crecimiento celular y la absorbancia de la biomasa *Chlorella* sp. B3

Días	Crecimiento celular	Absorbancia
	Media y D.E.	Media \pm D.E.
0	$0,10 \times 10^6 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$
3	$1,32 \times 10^6 \pm 0,34$	$0,05 \pm 0,01$
6	$2,13 \times 10^6 \pm 0,53$	$0,06 \pm 0,02$
9	$3,07 \times 10^6 \pm 0,96$	$0,11 \pm 0,05$
12	$4,88 \times 10^6 \pm 0,69$	$0,16 \pm 0,04$
15	$7,44 \times 10^6 \pm 0,95$	$0,28 \pm 0,07$
18	$11,34 \times 10^6 \pm 1,22$	$0,6 \pm 0,06$
21	$14,87 \times 10^6 \pm 1,31$	$0,73 \pm 0,06$
24	$18,59 \times 10^6 \pm 1,08$	$0,89 \pm 0,08$
27	$23,08 \times 10^6 \pm 1,65$	$1,08 \pm 0,08$

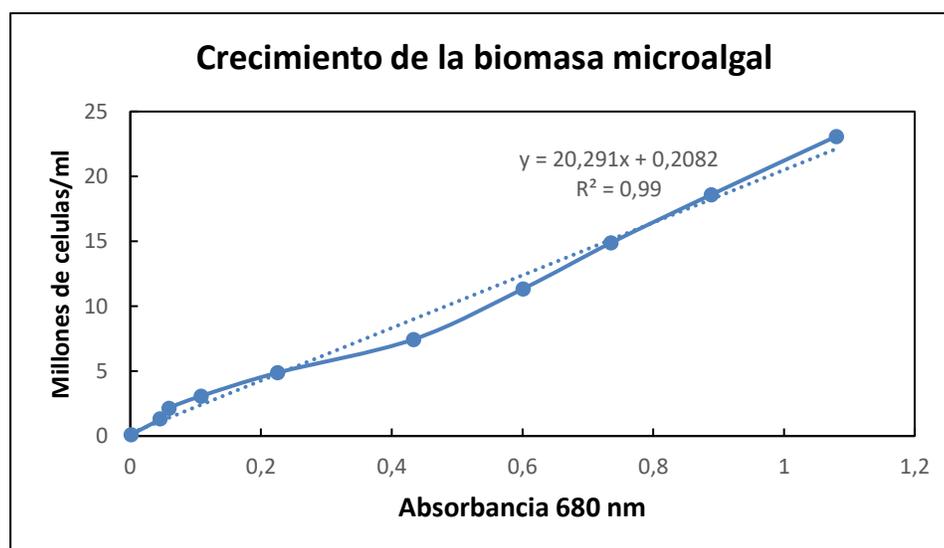


Figura 29 Crecimiento y Absorbancia de *Chlorella* sp. B3 (680nm)

4.1.2.1 Análisis proximal de *Chlorella* sp. Biotipo 3

Con la aplicación de la prueba de Kjeldahl, se determinó un contenido protéico promedio del 45,3%; a través del método de Soxhlet se encontró un porcentaje lipídico de 9,62% y por técnicas de secado y calcinación se obtuvo 28,53% de cenizas.

Estos resultados, contrastados con la composición de leche en polvo comercial se detallan en la tabla 9

Tabla 9
Promedio y desviación estándar del análisis del contenido nutricional de la microalga andina *Chlorella* sp. B3

ANÁLISIS	<i>Chlorella</i> sp. B3 (%)	Leche en polvo control (%)	Leche en polvo /100g (%)
Proteína	45,3 - 1,07	19,3	15-17
Grasas	9,62- 0,15	25,01	24-28
Cenizas	28,53- 0,67	4,19	4-6

4.1.2.2 Capacidad antioxidante

En base al método DPPH se calculó la capacidad antioxidante para la microalga *Chlorella* sp., Biotipo 3 obteniendo en promedio 31,59% por gramo de muestra seca.

Tabla 10
Promedio y desviación estándar de la capacidad antioxidante de *Chlorella* sp. B3

Muestra	Absorbancia	% CA con Abs
<i>Chlorella</i> sp. -B3	0,534	31,57
<i>Chlorella</i> sp. -B3	0,535	31,42
<i>Chlorella</i> sp. -B3	0,527	31,63
<i>Chlorella</i> sp. -B3	0,517	31,72
	Promedio	31,59
	Desv. Est.	0,13

4.1.2.3 Compuestos fenólicos totales

En base al método colorimétrico se determinó la capacidad antioxidante para la microalga *Chlorella* sp., Biotipo 3., obteniendo en promedio 96,67% por gramo de muestra seca.

Tabla 11
Promedio y desviación estándar para compuestos
fenólicos de *Chlorella* sp. B3

Muestra	Absorbancia	mg GAE/100g muestra
<i>Chlorella</i> sp. -B3	0,075	96
<i>Chlorella</i> sp. -B3	0,076	97
<i>Chlorella</i> sp. -B3	0,076	97
	Promedio	96,67
	Desv. Est.	0,6

4.1.2.4 Determinación de clorofila α , β caroteno

En base al método espectrofotométrico se determinó la capacidad antioxidante para la microalga *Chlorella* sp., Biotipo 3., obteniendo el promedio y la desviación estándar de clorofila α , β y caroteno obtenidos por triplicado en la muestra de microalga (tabla 12).

Tabla 12
Promedio y desviación estándar de clorofila α , β y caroteno.

Análisis	Promedio (mg/g)	Desv. Est.
Clorofila α	12,124	0,021
Clorofila β	4,076	0,019
Clorofila total	16,2	
Caroteno	2,902	0,013

4.1.2.5 Bioensayo toxicidad de *Chlorella* sp. Biotipo 3 en *artemia salina*.

El bioensayo demostró que *Chlorella* sp., (B3), no presentó toxicidad en la supervivencia de *artemia salina* hasta los 2000 ppm, ya que no se encontró mortalidad significativa sobre los individuos $p > 0,05$; de tal manera que la microalga pertenece a la categoría toxicológica VI relativamente inocuo como lo indican (Sánchez & Neira, 2005) en la tabla 13.

Tabla 13
Clasificación de la toxicidad según la comunidad científica CYTED

Clasificación toxicidad según CYTED			
Categoría	Nivel de toxicidad	DL50	
I	Extremadamente tóxico	1 - 10	µg/ml
II	Altamente tóxico	10 - 100	µg/ml
III	Moderadamente tóxico	100 -500	µg/ml
IV	Ligeramente tóxico	500 - 1000	µg/ml
V	Prácticamente no tóxico	1000 - 1500	µg/ml
VI	Relativamente inocuo	> 1500	µg/ml

Fuente: (Sánchez & Neira, 2005)

En la figura 30 se observan los porcentajes de supervivencia y mortalidad de *Artemia salina* en diferentes concentraciones de biomasa de *Chlorella* sp. (B3)

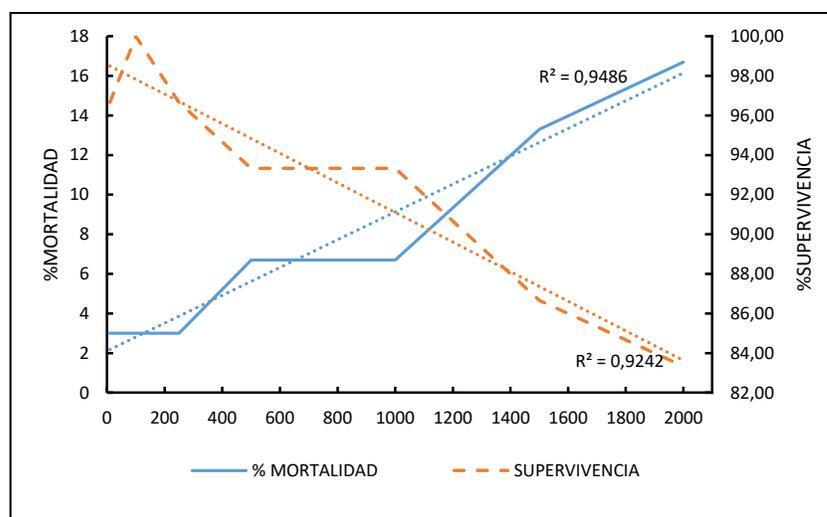


Figura 30 Supervivencia de nauplios de *Artemia salina*

4.1.3 Crecimiento microalgal bajo diferentes concentraciones de pesticidas

Mediante la técnica antibiograma disco-placa (figura 31) se probó 5 dosis: 200, 400, 600, 800, 1000 ppm de los pesticidas chlorpirifos y methomyl cada una aleatorizada y con 3 repeticiones.

A los 7 días, se presentó crecimiento microalgal completo en los discos que contenían dosis 200, 400 y 600 ppm de los pesticidas; mientras que en dosis de 800 y 1000 ppm se evidenció menor crecimiento de la microalga.

Al día 14 la biomasa microalgal cubrió completamente los discos de todas las concentraciones.

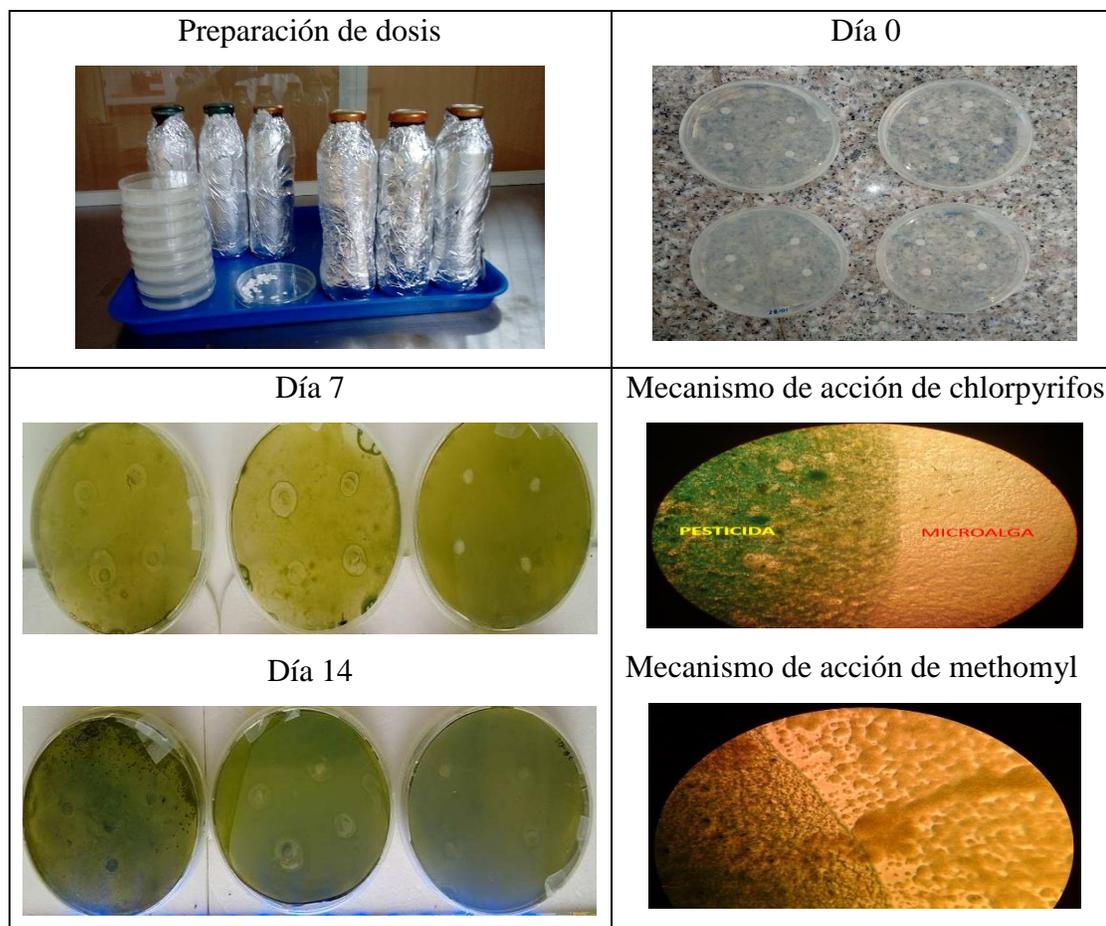


Figura 31 Metodología de tipo antibiograma disco – placa

Los resultados obtenidos con la metodología de antibiograma disco-placa fueron contrastados a modo de ensayo con 3 dosis: 400, 600 y 800 ppm, para cada pesticida. Mediante la prueba de comparación de Tukey al 95%, se determinó que la aplicación de 400 ppm de chlorpyrifos y methomyl sobre el crecimiento microalgal presentó diferencias significativas con respecto crecimiento celular del control ($p < 0,05$) como muestra la figura 32.

Mediante regresión lineal, se encontró que las dosis de 554 y 713 ppm para chlorpyrifos y methomyl respectivamente presentaron un adecuado crecimiento celular para los 21

días de evaluación. Siendo así que el experimento se instaló bajo dosis de 500, 700 y 900 ppm de cada pesticida.

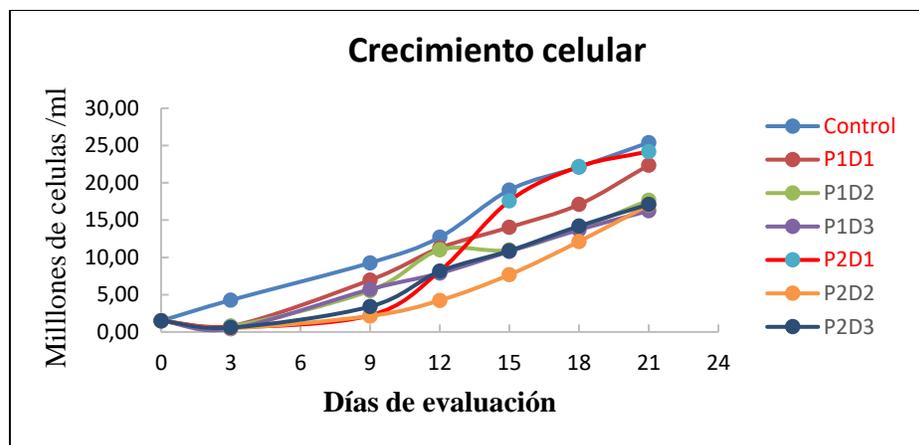


Figura 32 Crecimiento de *chlorella* sp., Biotipo 3 ($F=32,29$; $p=0,05$)

4.1.4 Parámetros físicos

4.1.4.1 pH

El pH fue analizado mediante covarianza, empleando modelos lineales generales mixtos y comparación de medias ajustadas LSD de Fisher con significancia del 95%.

Tabla 14
Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

Fuente	numDF	denDF	F-value	p-value
Pesticida	1	128	6,48	0,012
Dosis	3	128	8,94	0,0001
Días	7	128	56,2	0,0001
Pesticidas*Dosis	3	128	11,49	0,0001
Dosis*Días	21	128	16,96	0,0001
Pesticida*Días	7	128	6,88	0,0001
Pesticida*Dosis*Días	21	128	3,23	<0,0001

El análisis de modelos mixtos encontró interacción triple para el tipo de pesticida, días de evaluación y la dosis con $p<0,0001$ como lo muestra la tabla 14.

Tabla 15
Medias ajustadas \pm E.E del pH general
para cada tratamiento

Tratamiento	Media \pm E.E	
T2	7,22 \pm 0,09	a
T3	7,29 \pm 0,08	a
T5	7,36 \pm 0,07	a
T1	7,55 \pm 0,08	b
T0	7,70 \pm 0,09	bc
T6	7,78 \pm 0,07	c
T7	7,83 \pm 0,09	c
	p	<0,0001
	F	32,85

La tabla 15 muestra las medias ajustadas generales del pH para cada tratamiento, sin embargo el ensayo sobre el potencial hidrógeno constituye una de las principales variables de este estudio, ya que muestra si existe un equilibrio en el medio acuático. Un pH alto promueve la hidrólisis del pesticida reduciendo su efectividad (Chapman & Cole, 1982). Bajo estas consideraciones esta variable se analizó cada 3 días. Este parámetro mantuvo valores de pH entre 7,23 y 8,5 por los 21 días que duró el ensayo.

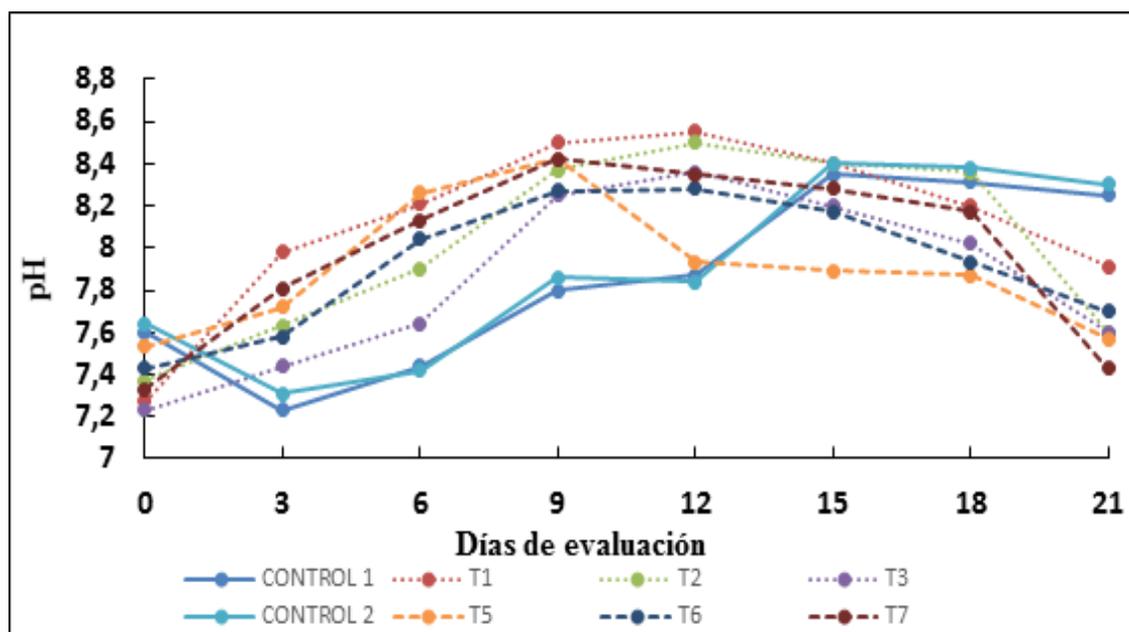


Figura 33 pH durante los 21 días de evaluación (F=32,85; p<0,0001)

Los tratamientos que contenían chlorpyrifos (T1, T2, T3) y methomyl (T5, T6, T7) mostraron incremento de pH hasta el día 12 y 9 respectivamente, posterior a estos días los tratamientos buscan la neutralidad del medio (figura 33).

4.1.4.2 Crecimiento Celular

Los supuestos de homocedasticidad se cumplieron mientras que para determinar la normalidad los datos se transformaron mediante log10. Se utilizó un análisis de covarianza manejando modelos lineales generales mixtos a través de la comparación de medias ajustadas LSD y un nivel de significancia del 95%.

Tabla 16
Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

Fuente	numDF	denDF	F-value	p-value
Pesticida	1	128	784,75	0,0001
Dosis	3	128	5518,72	0,0001
Días	7	128	7931,73	0,0001
Pesticida*Dosis	3	128	253,22	0,0001
Dosis*Días	21	128	150,49	0,0001
Pesticida*Días	7	128	101,21	0,0001
Pesticida*Dosis*Días	21	128	26,1	0,0001

El análisis de modelos mixtos presenta interacción triple para el tipo de pesticida, días de evaluación y la dosis con $p < 0,0001$ como lo muestra la tabla 16.

Tabla 17
Medias ajustadas \pm E.E para el crecimiento celular general

TRATAMIENTO	Media \pm E.E	
T7	7, 10 x10 ⁶ \pm 1,15 x10 ⁶	ab
T6	11,83 x10 ⁶ \pm 1.56 x10 ⁶	ab
T5	8,80 x10 ⁶ \pm 1,33 x10 ⁶	ab
T4	21,08 x10 ⁶ \pm 2,48 x10 ⁶	c
T3	11,15 x10 ⁶ \pm 1,67 x10 ⁶	ab
T2	11,99 x10 ⁶ \pm 1,68 x10 ⁶	ab
T1	12,73 x10 ⁶ \pm 1,69 x10 ⁶	b
T0	21,95 x10 ⁶ \pm 2,60 x10 ⁶	c
	p	0,0001
	F	8,58

La tabla 17 presenta las medias ajustadas generales del crecimiento microalgal para cada tratamiento, los tratamientos control T0 y T4 muestran mayor crecimiento promedio con respecto a los otros tratamientos.

Esta variable es el reflejo de la capacidad de supervivencia de la microalga sobre ambientes hostiles, es así que el crecimiento celular fue medido cada 3 días a lo largo del ensayo. En la figura 34 se puede observar que hasta el día 3 disminuyó la biomasa inicial, debido a un proceso de adaptación. A partir de este período la biomasa sobreviviente empieza a multiplicarse logarítmicamente siendo así que en los tratamientos que contenían chlorpyrifos se evidenció el mayor crecimiento de su biomasa al día 15 con $(21,46 \times 10^6 \text{ cel/ml}$ y 2,407 de absorbancia a 680 nm), por otro lado los tratamientos que contenían methomyl presentaron su máximo crecimiento al día 18 $(21,22 \times 10^6 \text{ cel/ml}$ y 2,347 de absorbancia a 680 nm).

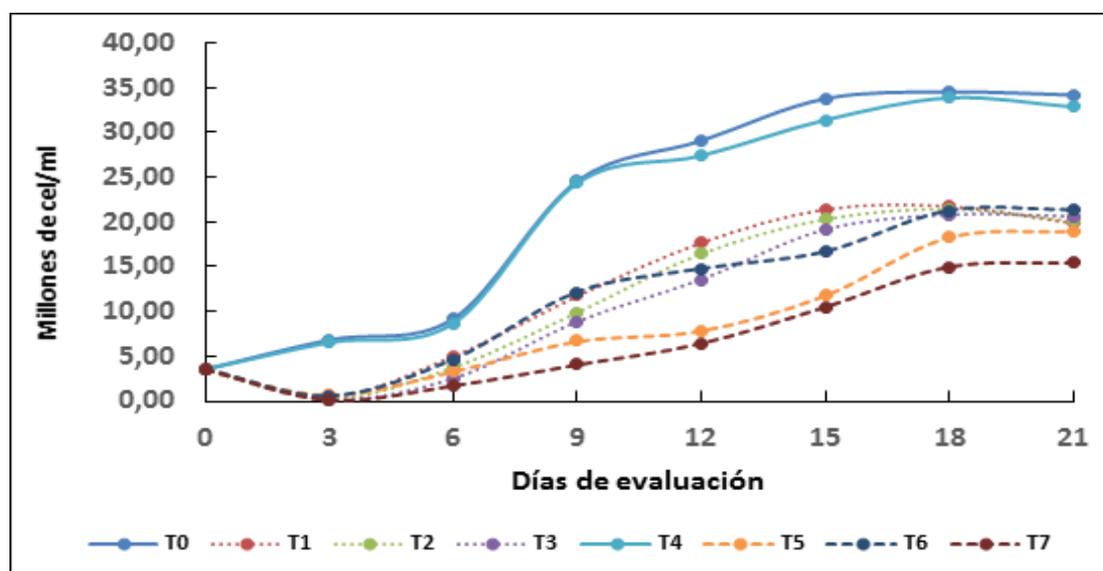


Figura 34 Crecimiento celular durante 21 días ($F=26,16$; $p < 0,001$)

4.1.5 Parámetros Químicos

4.1.5.1 DQO

Los supuestos de (normalidad y homocedasticidad) se cumplieron, Por lo tanto se utilizó un análisis de covarianza utilizando modelos lineales generales mixtos; mediante comparación de medias ajustadas LSD de Fisher y un nivel de significancia del 95%.

Tabla 18
Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

Fuente	numDF	denDF	F-value	p-value
Pesticida	1	7	14,19	0,0001
Dosis	3	7	5128,84	0,0001
Pesticida*Dosis	3	7	512,18	<0,0001
DQO	1	7	0	0,97

Tabla 19
Medias ajustadas \pm E.E. de la (DQO) para la interacción P*D

Pesticida	Dosis	Media \pm E.E.	
P2	700	1464,71 \pm 76,13	a
P1	700	1076,83 \pm 72,87	b
P2	500	1071,31 \pm 9,51	b
P1	500	976,32 \pm 71,49	bc
P2	900	806,69 \pm 76,33	c
P1	900	473,87 \pm 59,68	d
P1	0	319,46 \pm 49,11	e
P2	0	310,62 \pm 53,17	e
	p	<0,0001	
	F	512,18	

En la tabla anterior se muestra la variable que fue medida a los 6 y 21 días del ensayo. La DQO es utilizada para medir la cantidad de materia orgánica susceptible a ser oxidada y transformado en dióxido de carbono y agua por una sustancia química (De la Torre, 2009); bajo estas condiciones en este estudio se obtuvieron diferencias significativas para la interacción pesticidas*dosis ($F=512,18$; $p<0,0001$), encontrando el mayor valor de DQO para el pesticida (P2-Methomyl) con la dosis de 700 ppm (Tabla 19), generado en este caso por el mayor crecimiento microalgal (figura 35). Por el contrario los valores disminuyen en los tratamientos que no contienen pesticidas debido a las condiciones del medio microalgal.

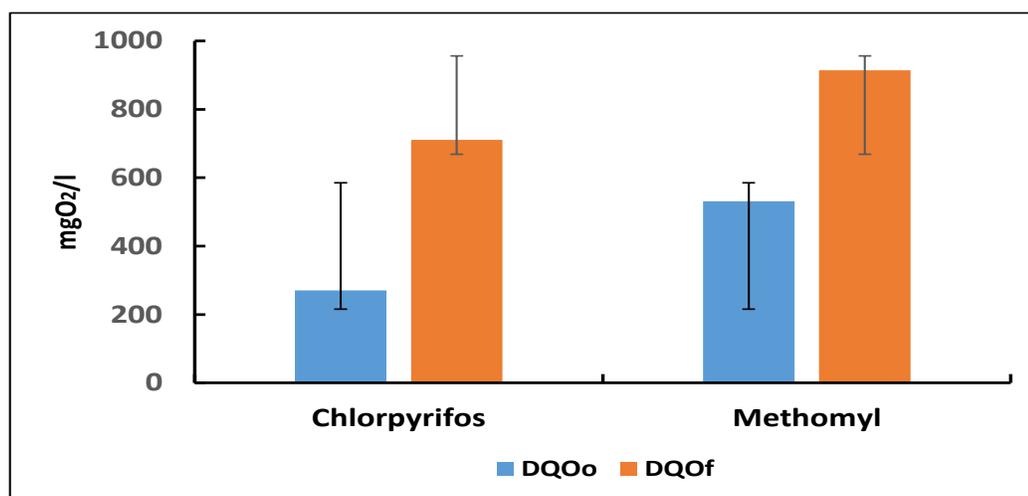


Figura 35 Comportamiento de la DQO, al inicio y al final del ensayo

4.1.5.2 DBO₅

Se utilizó un análisis de covarianza utilizando modelos lineales generales mixtos; mediante comparación de medias ajustadas LSD y un nivel de significancia del 95%.

Tabla 20
Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

Fuente	numDF	denDF	F-value	p-value
Pesticida	1	7	5,4	0,0531
Dosis	3	7	162,5	<0,0001
Pesticida*Dosis	3	7	10,2	<0,0060
DBO ₅	1	7	1,58	0,2486

Tabla 21
Medias ajustadas \pm E.E. de la (DBO₅) para la interacción P*D

Pesticida	Dosis	Medias \pm E.E	
P2	700	999,03 \pm 141,26	a
P2	500	831,73 \pm 61,41	a
P1	700	746,02 \pm 36,84	a
P2	900	681,78 \pm 166,82	ab
P1	500	501,6 \pm 83,32	ab
P1	900	285,36 \pm 73,16	b
P2	0	208,1 \pm 50,28	b
P1	0	206,38 \pm 48,17	b
	p	<0,0060	
	F	10,2	

La tabla 21 muestra el comportamiento de la variable DBO_5 en los 6 y 21 días del ensayo. La DBO_5 mide la cantidad de oxígeno que consumen los microorganismos al proliferar en el agua residual y alimentarse de su materia orgánica (De la Torre, 2009); bajo estas condiciones se obtuvieron diferencias significativas para la interacción pesticidas*dosis ($F=10,2$; $p<0,0060$), encontrando los mayores valores de DBO_5 para los dos pesticidas (P2-Methomyl y P1 Chlorpyrifos) con la dosis de 500 y 700 ppm respectivamente ppm. Por otro lado los valores disminuyen para los tratamientos que no contienen pesticidas incluyendo al pesticida P1 Chlorpyrifos a la dosis de 900ppm. En la figura 36 se observa el comportamiento de la DBO_5 al inicio y al final de la investigación.

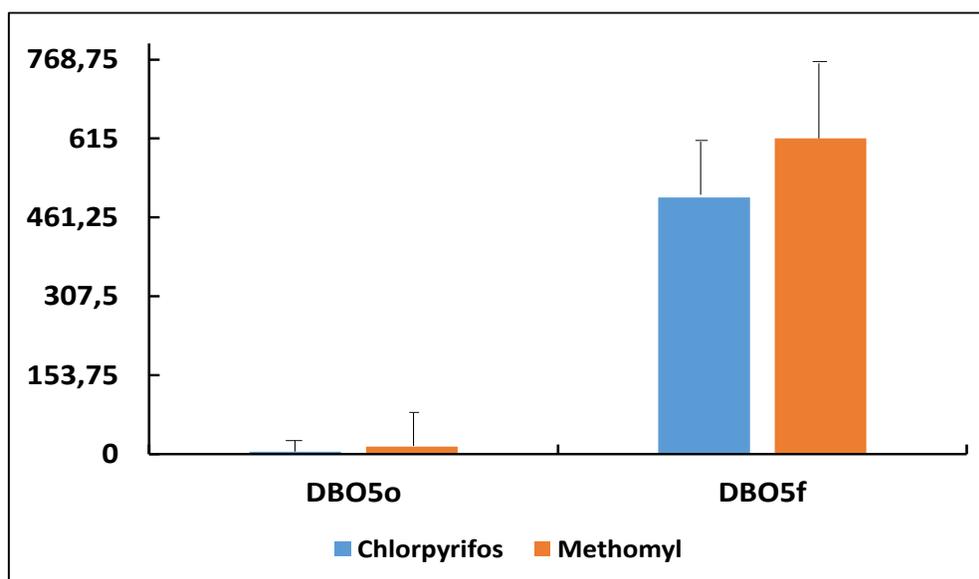


Figura 36 Comportamiento de la DBO_5 , al inicio y al final del ensayo

4.1.5.3 DBO_5 / DQO

Se utilizó el análisis de covarianza a través de modelos lineales generales mixtos; mediante comparación de medias ajustadas LSD de Fisher y un nivel de significancia del 95%.

Tabla 22
Medias ajustadas \pm E.E. de la relación (DBO₅/DQO)

Tratamiento	Promedio \pm E.E (i)	Promedio \pm E.E (f)
T0	0,034 \pm 0,003	0,802 \pm 0,037
T1	0,037 \pm 0,018	0,616 \pm 0,071
T2	0,009 \pm 0,002	0,717 \pm 0,027
T3	0,025 \pm 0,001	0,784 \pm 0,015
T4	0,037 \pm 0,003	0,843 \pm 0,049
T5	0,009 \pm 0,000	0,839 \pm 0,054
T6	0,029 \pm 0,004	0,562 \pm 0,023
T7	0,032 \pm 0,000	0,586 \pm 0,047
P	0,016	0,0007

La DQO y DBO₅ son dos variables estrechamente relacionadas ya que (De la Torre, 2009) menciona que “si la relación DQO/DBO₅ es mayor a 0,5 el agua es fácilmente tratable o de poca contaminación y en el caso de una relación menor a 0,2 se demuestra la presencia de contenidos tóxicos en el agua”. De acuerdo a estas condiciones la relación DQO/DBO₅ al inicio y al final del ensayo se mantuvo dentro de los rangos antes mencionados como lo indica la figura 37.

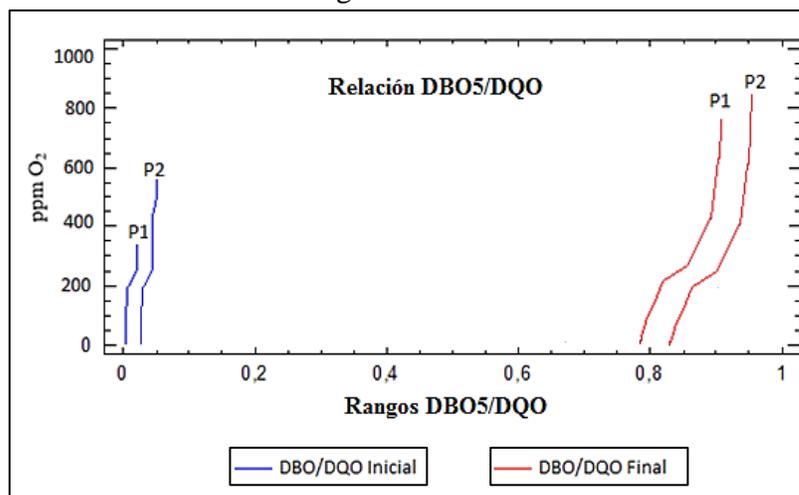


Figura 37 Gráfico de cuartiles para la relación DBO₅/DQO

4.1.6 Análisis de pesticida residual mediante óxido-reducción.

Los supuestos de normalidad y homocedasticidad se cumplieron. Por lo tanto, se utilizó un análisis de varianza (ANOVA). Para determinar el valor de las medias se utilizó una prueba de rangos múltiples TUKEY y un nivel de confianza al 95%.

Tabla 23

Medias \pm E.E. para el análisis residual de pesticidas mediante reacción enzimática de óxido-reducción

Tratamiento	Media \pm E.E	
T5	5,03 \pm 0,21	a
T6	5,29 \pm 0,37	a
T1	8,87 \pm 0,83	b
T7	9,56 \pm 0,78	bc
T2	10,06 \pm 0,25	cd
T3	11,09 \pm 0,73	d
p	0,0001	
F	58,01	

Se evaluó la concentración residual de pesticidas (P2 methomyl y P1 chlorpyrifos) con dosis de 500, 700 y 900 ppm sobre la biomasa microalgal del género *Chlorella* sp. Esta variable fue medida en la fase final del ensayo, encontrando diferencias significativas entre tratamientos ($p=0,0001$). El contenido de pesticida para todos los tratamientos fue drásticamente reducido por la acción de la biomasa de *Chlorella* sp. Biotipo 3. Se encontró la mayor eficiencia de remoción en los tratamientos que contenían el pesticida Methomyl a las dosis de 500 y 700 ppm como lo indica la figura 38.

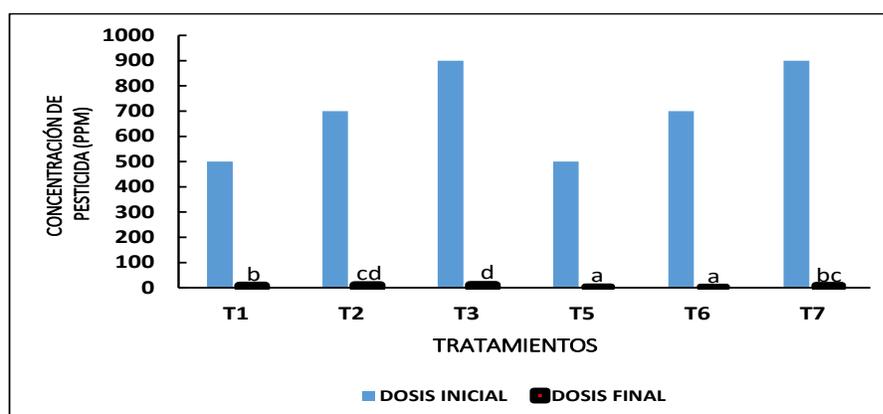


Figura 38 Gráfico de medias para la concentración de pesticidas

4.2 Discusión

El presente proyecto de investigación presenta una reciente alternativa tecnológica que contribuye a mejorar los procesos de bio-remediación del recurso agua, a continuación se describen estudios similares que permiten demostrar la factibilidad de esta propuesta.

4.2.1 Producción de biomasa

Transcurridos 27 días del inicio del ensayo, en el momento de la cosecha, la densidad celular en medio Nitrofoska fue de 23×10^6 células/ml, equivalente a 1,080 por espectrofotometría a 680 nm, algo semejante ocurre con los estudios de (Villafuerte, 2016) quien menciona que las microalgas andinas aisladas del sistema lacustre de Papallacta presentan un crecimiento de 18×10^6 células/ml en el mismo medio a los 19 días y una absorbancia de 0,800. De igual manera (Pachacama, 2016), obtiene en su estudio una densidad celular de $18,5 \times 10^6$ células/ml a los 12 días bajo las mismas condiciones.

4.2.2 Análisis proximal

Los resultados del presente estudio indican que el contenido protéico fue alto, con un porcentaje de 45,3; algo semejante ocurre con (Morris & Quitana, 1999), quienes obtuvieron proteína en un nivel del 50% en la microalga *Chlorella vulgaris*. También (García, 2016), en su estudio menciona que *Spirulina* presentó 39,5% de proteína.

Se determinó que *Chlorella* sp., biotipo 3 contenía 9,62% de grasas totales, del mismo modo (García, 2016) encontró que *Spirulina* y *Chlorococcum* sp, contenían el 9,8 y 20,9% de grasas totales respectivamente. Estos valores en comparación con palma aceitera son bajos ya que (Hernandez, 2010) afirma que el contenido promedio de grasas totales en la almendra se encuentra en el orden del 40%.

El contenido de cenizas de esta microalga se encuentra en un rango alto con 28,52%, comparado con el carbón activado utilizado para tratamiento de aguas industriales que según (Rojas & Gutierrez, 2016) es del 24,6%, por otro lado (Andrade, 2009) en estudios sobre la producción de biomasa de *Scenedesmus* sp, encontró un contenido de cenizas de 23,52%.

4.2.3 Compuestos fenólicos totales (CFT) y capacidad antioxidante (CA)

Tanto el contenido de compuestos fenólicos como la capacidad antioxidantes se encuentran directamente relacionados y la acción que cumplen en plantas superiores es similar en microorganismos acuáticos que realizan fotosíntesis (Valenzuela et al, 2014). No obstante no existen documentos bibliográficos sobre organismos microalgales endémicos del Ecuador enfocados a la remediación de agua, los cuales contrasten la función de estos metabolitos.

Los compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante actúan de manera conjunta ya que al contrarrestar y estabilizar los daños fisiológicos ocasionados por diversos agentes de estrés, producen oxidación de compuestos y atrapan radicales libres.

El contenido de compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante fue de 96,75 mg GAE/100g y 31,59% respectivamente, así mismo (Casal, 2008) en sus estudios realizados respecto a la microalga *Scenedesmus* sp., obtuvo 165 mg GAE/100g de CFT y 77% de capacidad antioxidante, por otro lado (Muños & Copaja, 2010) en sus estudios sobre potencial antioxidante de la miel de abeja, obtienen rangos de 120- 207 mg GAE/100g de CFT y 56,87-67,83 % de CA.

4.2.4 Clorofila total

El contenido de clorofila total en microalga es de 16,2 mg/g siendo similar al estudio presentado por (Cáceres, 2009), quien trabajó con la *Chlorella vulgaris*, obteniendo 16,34 mg/g de clorofila. En comparación a plantas terrestres como la alfalfa (Cortez & Gallardo, 2005) encontraron en promedio 14, 7 mg/g de clorofila total en plantas de alta producción.

4.2.5 pH

El potencial hidrógeno representa una medida de la concentración de los iones hidrógeno (H^+) e iones hidróxido (OH^-) en una solución y es uno de los parámetros que determina el estado y la calidad del agua (Fishel & Ferrell, 2013). Es fundamental conocer el estado del agua cuando se utiliza en sistemas agrícolas ya que pesticidas como chlorpyrifos y methomyl, en presencia de agua alcalina ($pH > 7$) se ven afectados negativamente por una reacción denominada hidrólisis alcalina (ASP, 2013).

Los resultados de este estudio muestran que los tratamientos que contenían chlorpirifos y methomyl incrementaron el pH hasta 8,5 y 8,42, por lo tanto todos los tratamientos presentaron hidrólisis de tipo alcalino, estudios similares realizados por (Chapman & Cole, 1982) mencionan que chlorpirifos a pH 7 tiene una vida media de 4,2 semanas y a pH 8 se reduce a 2,7 semanas. Por otro lado, en la misma línea de estudio se menciona que methomyl a pH 7 la vida media es de 38 semanas y a pH 8 es de 20 semanas. Estos resultados coinciden con (Lizarraras, 2003) el cuál menciona que valores superiores a 9 pueden ocasionar hidrólisis alcalina extremadamente rápida. Chlorpirifos a pH 9 presenta una vida media de 36 horas y methomyl de 8 semanas. La presente investigación en base al tratamiento de aguas con microalgas endémicas del Ecuador muestra incremento en pH y reducción de las concentraciones de pesticida.

4.2.6 Crecimiento celular

La cinética aparente de degradación de los pesticidas se ve afectada por la cantidad de ingrediente activo, condiciones físico químicas del medio y presencia de organismos o sistemas enzimáticos capaces de degradar pesticidas (Castrejon & Sanchez, 2001). Sobre la supervivencia de microalgas en ambientes hostiles (Vilches, 2006), menciona que, la radiación ultravioleta de tipo A no actúan con negatividad sobre la supervivencia de esta, sino al contrario estimula y multiplica por cinco la cantidad normal celular y pueden ser beneficiosos por acumular concentraciones altas de carotenoides, (beta caroteno y la luteína), mismos que actúan como antioxidantes naturales.

El experimento se llevó a cabo bajo las directrices de la (OCDE, 2015), para pruebas de productos químicos sobre microorganismos, la concentración microalgal inicial del ensayo fue de $3,5 \times 10^6$ células/ml, concentración que según (Garcia N. , 1959) y la (OCDE, 2015) es la más adecuada, ya que la biomasa se encuentra en la fase de crecimiento exponencial y el desarrollo es sumamente rápido en un corto período de tiempo.

El crecimiento celular de *chlorella sp.*, biotipo 3 sobre los pesticidas (chlorpirifos y methomyl) tuvo diferencias significativas ($p < 0,05$) a dosis de (500, 700 y 900 ppm). En consecuencia los resultados muestran un máximo crecimiento de la biomasa microalgal

de $(21,4 \times 10^6 \pm 1.66 \times 10^6 \text{ cel/ml})$ a los 18 días. (Moha, Pérez, Ríos, & Ortega, 2015) en su estudio sobre la utilización de la microalga *Nannochloris oculata* para la remoción de lindano, menciona que la concentración del pesticida en el medio disminuye al aumentar la biomasa microalgal.

Es necesario mencionar que nuestro país no cuenta con estudios sobre microalgas endémicas utilizadas en procesos de bio-remediación. No obstante estudios a nivel mundial dan fe de su uso en procesos de remediación sobre diferentes compuestos. (Khalil & Mostafa, 2008), menciona que *Phormidium fragile* presenta un 50,4 % de efectividad en la remoción de 225 ppm del pesticida methomyl a los 7 días. (Mostafa & Helling, 2002), menciona que bajas concentraciones de pentaclorofenol y methyl paratión estimulan el crecimiento microalgal de *Anabaena inaequalis*, además concentraciones de 100 ppm de estos pesticidas solo afectaron un 10,5% de la supervivencia microalgal una vez transcurridas 96 horas.

Por otra parte, estudios realizados por (Anwar et al., 2009), menciona que microorganismos del género *Bacillus* pueden degradar hasta de 300 ppm de chlorpyrifos en 8 días, y microorganismos del género *Aspergillus* y *Alcaligenes*, la misma cantidad en 24 horas.

4.2.7 DBO₅/DQO

La demanda química de oxígeno (DQO) y la demanda biológica de oxígeno al día 5 (DBO₅) son dos variables estrechamente relacionadas y utilizadas en el diagnóstico para tratamiento de aguas residuales. La relación DBO₅/DQO permite determinar la presencia de compuestos tóxicos. Al final del ensayo presentó una relación promedio de 0,8 es decir aguas sin presencia de elementos tóxicos y fácilmente tratables. Esto demuestra la efectividad de microalgas en la biodegradación de pesticidas y que mencionado por (Arriaga, 2012), quien confirma que una vez ocurrida la biodegradación de contaminantes estas son utilizadas para el incremento de la biomasa.

4.2.8 Análisis de pesticida residual mediante acción de óxido-reducción

Los insecticidas organofosforados y carbamatos poseen características químicas en común y similar modo de operación al inhibir la acción de la enzima acetilcolinesterasa (Heinzen, 2006).

El presente estudio fue evaluado en dos ensayos diferentes consiguiendo valores similares en cada uno de ellos. El análisis determinó que todos los tratamientos fueron drásticamente reducidos, la degradación fue influenciada, no solo por la acción microalgal sino también por el pH del medio, calidad, concentración del pesticida y el efecto foto-catalítico ocasionado por el material experimental es decir luz controlada y botellas de vidrio.

No se encontró evidencia de estudios similares en este tipo de procesos, sin embargo (Curillo, 2015), menciona la efectividad de este tipo de pruebas de óxido – reducción, con respecto a la cuantificación y determinación de pesticidas. Siendo así que estas nuevas metodologías ostentan alta sensibilidad, adecuada interferencia de matriz, estabilidad de ensayo, simplicidad de análisis y costo en relación a métodos convencionales.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- El uso de la microalga *Chlorella* sp. Biotipo 3, demostró un 99,9 % de efectividad en la remoción de los pesticidas chlorpirifos y methomyl, al reducir el contenido de los mismos.
- Al microscopio electrónico (10.000 aumentos), la microalga presentó una disposición de tipo esférica, con diámetro promedio de 2 μm , no presenta flagelos, posee pigmentos verdes fotosintéticos y paredes celulares ligeramente rugosas. Tiene alto contenido nutricional, categoría toxicológica relativamente inocuo, capacidad antioxidante y contenidos fenólicos con alto potencial de bioacumulación y biodegradación.
- El crecimiento celular de *Chlorella* sp. Biotipo 3 a 400 ppm de chlorpirifos y methomyl fue de $24,21 \times 10^6$ y $22,37 \times 10^6$ células/ml a los 27 días; mientras que a 600 ppm se obtuvieron $17,23 \times 10^6$ células/ml tanto para chlorpirifos como para methomyl y a concentraciones de 800 ppm, el crecimiento promedio fue de $16,85 \times 10^6$ células/ml para ambos pesticidas.
- El contenido estacional de pesticida para todos los tratamientos fue drásticamente reducido por la acción de la biomasa de *Chlorella* sp. Biotipo 3., encontrando la mayor eficiencia de remoción con los tratamientos que contenían el pesticida Methomyl a las dosis de 500 y 700 ppm y pH hasta 8,5 y 8,4.
- El mayor crecimiento celular con chlorpirifos y methomyl fue de $21,46 \times 10^6$ células/ml y $21,22 \times 10^6$ células/ml., respectivamente. Además al finalizar en ensayo la relación DBO_5/DQO se encontró sobre 0,8, considerando este tipo de agua de fácil tratamiento.

5.2 Recomendaciones

- Realizar un análisis molecular que permita identificar el genotipo de la microalga.
- Realizar un análisis proximal y toxicológico de la biomasa de microalga al finalizar el ensayo y verificar el comportamiento del mismo.
- Analizar la capacidad antioxidante, compuestos fenólicos y clorofila al finalizar el ensayo para conocer el comportamiento de estos metabolitos bajo la influencia de los pesticidas.
- Se recomienda utilizar la microalga en ensayos ex situ para comprobar la efectividad de la misma.
- Se recomienda comparar los resultados obtenidos mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

5.3 Bibliografía

- Abraxis. (2017). Organophosphate / Carbamate (OP/C) Screen Kits. Obtenido de <https://www.abraxiskits.com/products/pesticides/>
- Andrade, C. (2009). Biomass production of microalga *Scenedesmus sp.* with wastewater from fishery . Obtenido de http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0254-07702009000200005
- Anwar, S., Liaquat, F., Qaiser, M., Zafar, K., & Samina, I. (2009). Biodegradation of chlorpyrifos and its hydrolysis product 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by *Bacillus pumilus* strain C2A1. *Journal of Hazardous Materials*, 400-405.
- Arce, M. (23 de 05 de 2017). Ubicación ecológica Hda el prado IASA 1. (M. Tipán, Entrevistador)
- Ardila, L. (2012). Medición de la capacidad de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus* para la remoción de cromo de aguas de curtiembre. (U. N. Colombia, Ed.) Recuperado el 17 de 10 de 2016, de <http://www.bdigital.unal.edu.co/10276/1/299936.2012.pdf>
- Arriaga, T. (2012). Tratamiento de pesticidas mediante un sistema acoplado de fotocatalisis solar y humedal subsuperficial . Obtenido de <http://bibliotecadigital.univalle.edu.co/xmlui/handle/10893/7629>
- ASP. (2013). El impacto del pH del agua sobre la efectividad de un agroquímico. Santiago, Chile. Obtenido de <http://www.loveland.cl/wp-content/uploads/2015/02/boletin14.pdf>
- Benitez, P. (2013). Contaminación de aguas superficiales por residuos de plaguicidas en Latino América. Departamento de Botánica y Ciencias Básicas, Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales, Universidad, 5-11.
- Bernal, M., & Guzman, M. (1984). Normalización de la técnica KIRBY-BAUER. *Biomedica*, 2-10.
- Bioavan. (2016). Biomarcadores de toxicidad en poblaciones de microalgas . Obtenido de <http://www.bioavan.com/Estudio-de-biomarcadores-de-toxicidad-en-microalgas-marinas-como-herramienta-para-la-deteccion-preco.83.0.html>

- Cáceres, S. (2009). Obtenido de Aislamiento y caracterización de las principales microalgas presentes en el sistema hidropónico del tipo C: <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/117608/Scarlett%20C%C3%A1ceres.pdf?sequence=1>
- Calles, F. (20 de 05 de 2017). El agua en el Ecuador. Obtenido de <http://agua-ecuador.blogspot.com/>
- Camacho, R., & Campos, V. (2009). Cultivo y elaboración de un producto comestible de *Chlorella vulgaris*. 15-17. Mexico DF: Universidad Autonoma de Mexico.
- Camba, N. (1982). Manual de métodos de análisis de productos pesqueros. Boletín científico y técnico, 5, 22-28. Guayaquil, Ecuador.
- Casal, C. (2008). Caracterización de la radiación ultravioleta en la provincia de Huelva e incidencia en la productividad y el valor biotecnológico de cultivos de interés comercial . Obtenido de <http://rabida.uhu.es/dspace/bitstream/handle/10272/2713/b15236572.pdf?sequence=1>
- Castrejon, M., & Sanchez, E. (2001). Caracterización e identificación de consorcios bacterianos capaces de crecer sobre plaguicidas organofosforados . Obtenido de http://web.uaemex.mx/Red_Ambientales/docs/memorias/Extenso/CA/EC/CAC-04.pdf
- Chapman, R., & Cole, C. (1982). Observation on the influence of water and soil pH on the persistence of insecticides . *Environ science and health* , 487-504 .
- Compo. (2011). Hoja Técnica de Seguridad del Material Nitrofoska Foliar 30+10+10. Obtenido de <http://www.eurofert.com.ec/downloads/MSDS%20Nitrofoska%20CRECIMIENTO.pdf>
- Cortez, A., & Gallardo, Y. (2005). Obtención de Concentrados Proteicos a Partir de Alfalfa (*Medicago sativa*). Depto. de Graduados e Investigación de alimentos *IPN*, 2-10.

- Curillo, S. (2015). Análisis de residuos de plaguicidas químicos en alimentos de consumo humano con la metodología de laboratorio ELISA. 20-26. Pichincha, Ecuador.
- Da Ros, G. (1995). La contaminación de aguas en el Ecuador una aproximación económica. En G. Da Ros. Quito: Abyayala.
- De la Torre, E. (2009). Índices de calidad de agua. En Contaminación Hídrica y su Control (págs. 1-22). Quito.
- DISSUPP. (2015). contenido nutricional de leche en polvo . Obtenido de <http://www.dissupp.com/leche-en-polvo>
- Dupont. (2017). Ficha Técnica. Obtenido de http://www.dupont.es/content/dam/assets/industries/agriculture/assets/Boletin_Tecnico_LANNATE.pdf
- ESPOL. (2004). Inventario de plaguicidas COPs en el Ecuador. ESPOL, Ministerio del Ambiente Ecuatoriano. Guayaquil: Global environmental facility.
- FAO. (2015). Conservación de suelos y aguas en América Latina y el Caribe. Recuperado el 20 de 09 de 2016, de <http://www.fao.org/americas/perspectivas/suelo-agua/es/>
- FAO. (2015). Perspectivas a largo plazo. El panorama de la agricultura.
- FAO. (2016). Producción acuícola mundial. Recuperado el 12 de Julio de 2016, de Colecciones estadísticas: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oncorhynchus_mykiss/es
- Fernández, C. (2010). Tratamientos de depuración de aguas residuales contaminadas con pesticidas. *Vector Plus*, 78-87.
- Fishel, F., & Ferrell, J. (2013). Water pH and the Effectiveness of Pesticides. Agronomy Department, Pesticide Information Office, UF/IFAS, 1-3.
- García, N. (1959). Crecimiento parabólico microalgal. Obtenido de <http://fcm.ens.uabc.mx/~matematicas/algebralineal/III%20Dets/aplcadets.htm>
- García, R. (2015). Obtenido de Producción de biomasa de microalgas rica en carbohidratos acoplada a la eliminación fotosintética de CO₂:

- [http://digital.csic.es/bitstream/10261/101928/1/TESIS%20DOCTORAL%20RG C.pdf](http://digital.csic.es/bitstream/10261/101928/1/TESIS%20DOCTORAL%20RG%20C.pdf)
- García, R. (2016). Producción de biomasa de microalgas rica en carbohidratos acoplada a la eliminación fotosintética de CO₂. Obtenido de [http://digital.csic.es/bitstream/10261/101928/1/TESIS%20DOCTORAL%20RG C.pdf](http://digital.csic.es/bitstream/10261/101928/1/TESIS%20DOCTORAL%20RG%20C.pdf)
- Garofalo, R. (2011). Algae and aquatic biomass for a sustainable production of 2nd generation biofuels. *AQUAFUELS*, 99-101.
- Guzmán, V. (2011). Subsecretaría técnica de los recursos hídricos . Calidad de agua en el Ecuador, (pág. 2). ECUADOR.
- Heinzen, H. (2006). Métodos Inmunológicos para la detección de Agroquímicos. 3-7. Facultad de Química-UDELAR.
- Hernandez, C. (2010). Extracción y cuantificación de lípidos presentes en (*Acrocomia aculeata*). Obtenido de http://www.ciiq.org/varios/peru_2005/Trabajos/IV/4/4.4.01.pdf
- Herrera, C. (2015). Residuos de insecticidas organofosforados y fungicidas triazínicos en frutilla producida en la provincia de Pichincha. Obtenido de www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/6429/1/T-UCE-0008-105.pdf
- Huamán, S., Hurtado, H., Kong, V., León, C., León, D., Lister, P., . . . Ibañez, L. (2003). Estudio toxicológico y teratogénico del extracto metanólico de *Cinnamomum zeylanicum*. *Horizonte médico*, 3(1), 69-78.
- INEC. (2013). Obtenido de Módulo ambiental uso de plaguicidas en la agricultura: http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Encuestas_Ambientales/plaguicidas/Plaguicidas-2013/Documento_Tecnico-Uso_de_Plaguicidas_en_la_Agricultura_2013.pdf
- Infante, C., & Angulo, E. (2012). Cultivation of *Chlorella* sp. microalgae in batch culture: cell growth kinetics . *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 159-164.
- Khalil, Z., & Mostafa, Y. (2008). Effect of methomyl and its possible degradation by *Phormidium fragile* . *Journal environmental science*, 289-301.

- Liu, J., & Sun, Z. (2014). Recent Advances in Microalgal Biotechnology. OMICS Group, 2-10.
- Lizarraras, L. (2003). Efecto del pH del agua de aspercion en el aefectividad de insecticidad comerciales. Obtenido de <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/4161/T13858%20LIZARRARAS%20TORNERO,%20LUIS%20ANTONIO%20%20%20TESIS.pdf?sequence=1>
- MAGAP. (2011). Plan nacional de riego y drenaje . Obtenido de <http://rrnn.tungurahua.gob.ec/documentos/ver/518d6325bd92eabc15000002>
- MAGAP. (2016). Estado actual y proyección de la acuicultura continental en el Ecuador. Recuperado el 29 de Julio de 2016, de ACUAESPE: <http://acuacultura.espe.edu.ec/wp-content/uploads/2016/05/1-Estado-y-Proyecci%C3%B3n-de-la-Acuicultura-Ecuatoriana-Alejandro-de-la-Roche.pdf>
- Marker, A. (1980). Obtenido de Photosynthetic pigment determination using ethanol extraction : <http://algalweb.net/Methods/Chlorophyll-ethanol-extraction.pdf>
- MCE. (2015). ECUADOR TIENE UN GRAN POTENCIAL PARA EXPORTAR BIENES AGRÍCOLAS. Obtenido de <http://www.comercioexterior.gob.ec/ecuador-tiene-un-gran-potencial-para-exportar-bienes-agricolas-ministro-francisco-rivadeneira/>
- Moha, J., Pérez, I., Ríos, E., & Ortega, L. (2015). *Nannochloris oculata*: Una alternativa para la biorremediación del lindano. *SETAC*, 3-12.
- Moreno, E., & Aldana, M. (2012). Análisis de piretroides en suelo y agua de zonas agrícolas y urbanas de los valles del Yaqui y Mayo. *Internacional de contaminación ambiental*, 28, 2-5. Recuperado el 17 de 10 de 2016, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992012000400006
- Morris, H., & Quitana, M. (1999). Composición bioquímica y evaluación de la calidad proteica de la biomasa autotrófica de *chlorella vulgaris*. Obtenido de http://www.bvs.sld.cu/revistas/ali/vol13_2_99/ali07299.htm

- Mostafa, F., & Helling, C. (2002). Impact of four pesticides on the growth and metabolic activities of two photosynthetic algae . *Journal of environmental science and health* , 417- 444.
- Muños, O., & Copaja, S. (2010). Contenido de flavonoides y compuestos fenólicos de mieles Chilenas e índice antioxidante . Obtenido de <http://www.scielo.br/pdf/qn/v30n4/a17v30n4>
- OCDE. (2015). Guiderline for the testing of chemicals . Obtenido de <http://www.oecd.org/chemicalsafety/pesticides-biocides/39584884.pdf>
- OMS. (2017). Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Químicas. Obtenido de http://www.who.int/ipcs/assessment/public_health/pesticides/es/
- OMS/FAO. (2011). Comision del CODEX ALIMENTARIUS. Recuperado el 13 de 10 de 2013, de Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias: ftp://ftp.fao.org/codex/Publications/ProcManuals/Manual_20s.pdf
- OPS. (2009). Herramientas de capacitación para el manejo responsable de plaguicidas y sus envases. Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sostenible, 2da . Obtenido de <http://publicaciones.ops.org.ar/publicaciones/saludAmbiental/Plaguicidas.pdf>
- Pachacama, L. (2016). Evaluación de la remoción de contaminantes de un efluente porcino mediante la utilización de microalgas *Chlorella* sp. y *Synechocystis* salina, a nivel de laboratorio . Obtenido de <http://acuacultura.espe.edu.ec/wp-content/uploads/2016/05/19-Microalgas-Tratamiento-Aguas-Residuales-Porc%C3%ADcolas.pdf>
- Párraga, C., & Espinel, R. (2010). Análisis de la actividad agrícola como contaminante del agua, alternativas tecnológicas para la desinfección del agua para consumo humano en comunidades rurales y recursos legislativos para la prevención y su conservación. 1-6.
- Plengue, F., & Sierra, J. (20 de 5 de 2017). Human health risks caused by pesticides. Obtenido de http://tecnociencia.uach.mx/numeros/numeros/v1n3/data/cientifico_sociedad.pdf

- RAAE. (2016). Aporte del macro proyecto: estrategias tecnológicas para la producción de microalgas andinas del Ecuador, aplicado a la biorremediación y nutrición de granjas pecuarias , 3-9. Pinchincha: Ecuador.
- Ramirez, G. (2009). Determinación de pesticidas en vegetales mediante cromatografía de gases espectrometría de masa/masa (GC-MS/MS). Recuperado el 13 de 10 de 2016, de http://jupiter.utm.mx/~tesis_dig/10970.pdf
- Ramírez, J., & Lascaña, M. (2001). Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición. Cuernavaca, México: Dirección de ciencias ambientales. Obtenido de Instituto nacional de salud pública. Dirección de ciencias ambientales.
- Roa, A. L. (2012). Bioremediacion de aguas con fosfatos y nitratos utilizando *Scenedesmus*. *Bistua*, 71-79.
- Rojas, J. (2015). Analisis y Tratamientos de Agua. Recuperado el 2016 de 11 de 07, de http://keniarop.blogspot.com/2015_06_01_archive.html
- Rojas, J., & Gutierrez, E. (2016). Obtaining and Characterization of Activated Carbon Obtained Sludge Treatment Plant Wastewater from a Poultry Industry. Obtenido de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1405774316300312>
- Sánchez, L., & Neira, A. (2005). Bioensayo general de letalidad en *Artemia salina*, a las fracciones del extracto etanólico de *Psidium guajava*. L y *Psidium guineense*. *Sw. Cultura Científica*(3), 40-45.
- Strickland, J., & Parson, T. (1972). A practical handbook of sea water analysis. Obtenido de https://epic.awi.de/39262/1/Strickland-Parsons_1972.pdf
- TULAS. (2009). Límites de descarga a un cuerpo de agua dulce. Ecuador.
- Valenzuela, G., Cravzov, A., & Jimenez, M. (2014). Relación entre actividad antioxidante y contenido de fenoles y flavonoides totales en semillas de *Cucurbita spp*. Obtenido de <http://www.dominguezia.org/volumen/articulos/3012.pdf>
- Vanessa, M. (2007). An Investigation into the Mechanisms of Heavy Metal Binding by selectec Seaweed species. Waterford Institute of Technology.
- Vilches, C. (2006). Efecto de la radiación en microalgas. Obtenido de <http://www.aqua.cl/2006/07/21/estudian-efecto-de-la-radiacion-en-microalgas/>

- Villafuerte, G. (2016). Valoración nutricional de la microalga andina *Chlorella* sp. sobre el crecimiento de alevines de tilapia nilótica, *Oreochromis niloticus*. Obtenido de <http://acuacultura.espe.edu.ec/wp-content/uploads/2016/05/20-Chlorella-en-Dietas-de-Tilapia-Roja-Gabriel-Villafuerte.pdf>
- Watts, M. (2012). Clorpirifos: Un posible COP a nivel global. Pesticide Action Network Norteamérica (PANNA), 2-3.
- Zhao, H. W., Xiang, P. N., Wen, J. Y., & Xin, L. (2010). Physiological Responses of Three Marine. *Environmental Toxicology*, 1-9.