

Universidad de Costa Rica
Facultad de Ciencias
Escuela de Biología

Tesis presentada para optar al grado de Licenciatura en Biología con
énfasis en Biotecnología y Biología Molecular.

**“Evaluación de la capacidad de cepas de cianobacterias
(Cyanophyta) en la remoción de agroquímicos utilizados en la
industria piñera de Costa Rica”**

Laura Brenes Guillén

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio
2017

MIEMBROS DEL TRIBUNAL

MSc. Lorena Uribe Lorío
Co-Directora del Trabajo Final de Graduación

MSc. Paola Fuentes Schweizer
Co-Directora del Trabajo Final de Graduación

Dr. Alfonso García Pineres
Lector

Dr. Federico Albertazzi Castro
Lector

Dra. Cindy Fernández García
Miembro del Tribunal

Dr. Germán Vidaurre Fallas
Presidente del Tribunal

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y hermana por apoyarme en mi trayectoria profesional. A Enrique que siempre está ahí brindándome una mano. A mi tía Ale, abuelo y tía por su apoyo brindado durante mis etapas de escuela, colegio y universidad.

A todos los profesores universitarios que de una u otra forma colaboraron con mi formación profesional. Especialmente a la Dr. Margarita Silva quien me dio la oportunidad de trabajar en su laboratorio y compartió conmigo sus conocimientos en microalgas.

A mi profesora tutora MSc.Lorena Uribe por creer en mi trabajo y darme la oportunidad de apoyarla en sus proyectos, además de enseñarme a ser fuerte y valiente ante las adversidades. Al Dr. Alfonso García por acompañarme y asesorarme en las mediciones de citometría de flujo. A MSc. Paola Fuentes por sus valiosos comentarios y apoyo en el análisis de datos. Al Dr. Federico Albertazzi por sus recomendaciones durante la elaboración del anteproyecto.

Quiero agradecer al Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM), Centro de Investigación en Electroquímica y Energía Química (CELEQ), Centro de Investigación en Contaminación Ambiental (CICA) y Facultad de Medicina de la Universidad de Costa Rica (UCR). por facilitarme el equipo, recursos y uso de las instalaciones para el desarrollo de esta tesis. Finalmente, agradecer a la Oficina de Becas de la Universidad de Costa Rica que me apoyo económicamente durante toda mi carrera.

DEDICATORIA

A toda mi familia humana y perruna

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	1
DEDICATORIA	4
ÍNDICE GENERAL.....	5
ÍNDICE DE FIGURAS.....	6
ÍNDICE CUADROS	9
INTRODUCCIÓN.....	10
JUSTIFICACIÓN	32
OBJETIVOS	33
Objetivo general.....	33
Objetivos Específicos.....	33
MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
Cepas de cianobacterias	34
Preparación de la biomasa de cada cepa	34
Preparación de los herbicidas	35
Análisis de adsorción y análisis residual del contenido del pesticida en la solución.....	38
Cinética y modelos de isothermas de los datos de adsorción.....	39
Análisis de viabilidad celular	39
Análisis estadístico.....	41
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
Isoterma de adsorción del herbicida Diuron®con las cianobacterias <i>Leptolyngbya</i> y <i>Nostoc</i>	42
Isoterma de adsorción del Paraquat®y Bromacil®con las cianobacterias <i>Leptolyngbya</i> y <i>Nostoc</i>	43
Análisis de viabilidad celular mediante citometría flujo utilizando fluoresceína y clorofila	47
Cinética de Adsorción de la cepa <i>Leptolyngbya</i> expuesta al herbicida Paraquat®.....	58
Fluorescencia ultravioleta.....	60
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	66

REFERENCIAS	68
-------------------	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Balanza Comercial de Agroquímicos. Costa Rica..	10
Figura 2. Células cianobacteriana, membrana celular y compartimentos.....	19
Figura 3. Representación esquemática del complejo de proteínas involucrado en la fotosíntesis de cianobacterias.	21
Figura 4. Tipos de clorofila presentes en cianobacterias	21
Figura 6. Representación proceso de absorción y adsorción en células cianobacteriana.....	25
Figura 7. Diagrama funcionamiento básico de la citometría de flujo. Se señalan las etapas de entrada de fluidos o células, la sección óptica, la electrónica y la selección de células y desechos.	28
Figura 8. Intensidad Normalizada en relación con la longitud de onda (nm) de los fluorocromos Isotiocianato de fluoresceína, Ficoeritrina, Proteína Clorofila Perifina y alofococianina. A. Espectro de absorción. B. Espectro de emisión.....	30
Figura 9. Diagrama de disociación del diacetato de fluoresceína por enzimas esterases.	31
Figura 10. Fotografía microscopio de luz.A.Cepa 7M M04 <i>Leptolyngbya</i> sp 2. B. Fotografía microscopio de luz Cepa M03 <i>Nostoc</i> sp	34
Figura 11. A. Escalamiento de biomasa en Erlenmeyer. B. Secado de biomasa a 45°C durante 24 h.....	35
Figura 12. A. Macerado de la muestra antes de ser filtrada para citometría. B. Sistema de filtración con tamiz de menos de 40 µm.	40

Figura 13. Resultados del tratamiento control en el análisis de citometría que se utilizó como medición estándar	41
Figura 14. Evaluación previa del efecto de los herbicidas Paraquat® y Diuron® en placas de cultivo plásticas.....	42
Figura 15. Isotherma de adsorción del Paraquat® de las dos cepas y su ajuste al modelo de Langmuir A. Cepa <i>Leptolyngbya</i> . B. Cepa <i>Nostoc</i>	44
Figura 17. Porcentaje de células vivas según la concentración del herbicida Paraquat®.....	49
Figura 18. Porcentaje de células vivas según la concentración del herbicida Bromacil®.	53
Figura 19. Resultados Análisis de Citometría de la cepa <i>Leptolyngbya</i> expuesta a diferentes concentraciones del herbicida Diuron®	57
Figura 20. Variación de la concentración de Paraquat® en función del tiempo luego de la exposición a la cepa <i>Leptolyngbya</i> y su ajuste al modelo experimental.....	59
Figura 21. Variación de la concentración remanente del herbicida Paraquat® en relación al tiempo.	59
Figura 22. Imágenes de microscopio de luz y ultravioleta de la cepa <i>Nostoc</i> después de estar en contacto durante 96 horas con el herbicida Paraquat®.	61
Figura 23. . Imágenes de microscopio de luz y ultravioleta de la cepa <i>Leptolyngbya</i> después de estar en contacto durante 96 horas con el herbicida Paraquat®.	61
Figura 24. Imágenes de microscopio de luz y ultravioleta de la cepa <i>Nostoc</i> después de estar en contacto durante 96 horas con el herbicida Bromacil®.....	62
Figura 25. Imágenes de microscopio de luz y ultravioleta de la cepa <i>Leptolyngbya</i> después de estar en contacto durante 96 horas con el herbicida Bromacil®.....	63

Figura 26. Imágenes de microscopio de luz y ultravioleta de la cepa *Nostoc* después de estar en contacto durante 96 horas con el herbicida Diuron®. 64

Figura 27. Imágenes de microscopio de luz y ultravioleta de la cepa *Leptolyngbya* después de estar en contacto durante 96 horas con el herbicida Diuron..... 64

ÍNDICE CUADROS

Cuadro 1. Principales agroquímicos utilizados en el cultivo de piña en Costa Rica.	12
Cuadro 3. Métodos convencionales para el tratamiento de aguas con agroquímicos	16
Cuadro 4. Clasificación taxonómica de cianobacterias según Rippka <i>et al.</i> (1979).	18
Cuadro 5. Estudios sobre capacidad de remoción de agroquímicos en diferentes microalgas (algas verdes y cianobacterias).....	24
Cuadro 6. Principales características y propiedades de los herbicidas Paraquat®, Bromacil® y Diuron®.	36
Cuadro 7. Parámetros, coeficientes de determinación y ajuste de los modelos Langmuir a las isotermas de adsorción de las dos cepas de cianobacterias.....	46
Cuadro 8. Porcentaje de células vivas de la cepa <i>Leptolyngbya</i> , desviación estándar según los indicadores fluoresceína y clorofila en relación a la concentración del herbicida Paraquat®.....	50
Cuadro 9. Porcentaje de células vivas de la cepa <i>Nostoc</i> , desviación estándar según los indicadores fluoresceína y clorofila en relación a la concentración del herbicida Paraquat®.....	54
Cuadro 10. Porcentaje de células vivas de la cepa <i>Leptolyngbya</i> , desviación estándar según los indicadores fluoresceína y clorofila en relación a la concentración del herbicida Bromacil®.	54
Cuadro 11. Porcentaje de células vivas de la cepa <i>Nostoc</i> , desviación estándar según los indicadores fluoresceína y clorofila en relación a la concentración del herbicida Bromacil®.	55

INTRODUCCIÓN

Costa Rica es uno de los principales importadores de agroquímicos (Figura 1), en el año 2016 se importaron un total de 9620 distintos tipos de fertilizantes, plaguicidas, herbicidas y abonos (PROCOMER, 2016). En 2016, esta entidad reportó el uso de 11,4 kg/ha, por debajo de lo utilizado en China 17 kg/ha, y mucho mayor que el utilizado en Estados Unidos, 2,5 kg/ha.

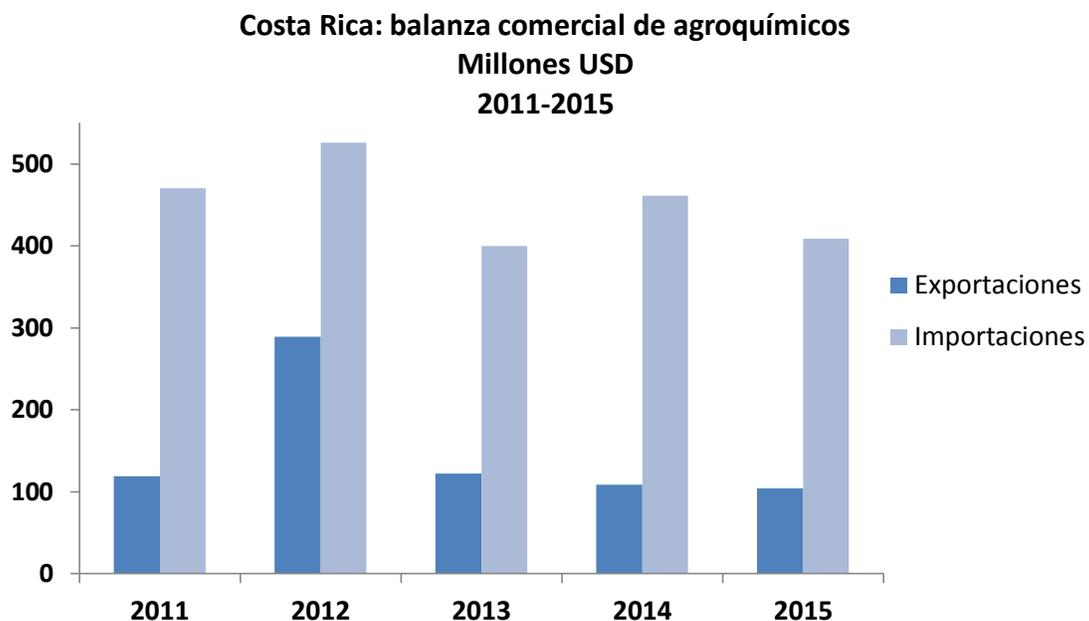


Figura 1. Balanza Comercial de Agroquímicos. Costa Rica. Fuente: Estudios de Mercado. Agroquímicos en Nicaragua. PROCOMER. 2016.

Según la confederación internacional OXFAM (2016), el uso de estas sustancias en nuestro país es sobreutilizado, principalmente en piña y banano, ocasionando problemas en la salud humana y en el ambiente. En 2013, Cabrera señaló que la creciente expansión del monocultivo de piña provoca graves problemas socio-ambientales en diversos cantones del país, como carencias de viabilidad ambiental de los sitios de cultivo, irrespeto de zonas de protección de ríos, nacientes y quebradas así como la contaminación de aguas. No obstante, entidades como el Ministerio de Agricultura y Ganadería y el Ministerio de

Comercio Exterior, aseguran que se cumple con todos los estándares de calidad y que la piña es uno de los productos con menos problemas de residuos (CANAPEP, 2016).

La producción de piña (*Ananas sp*) en Costa Rica se convirtió en un sistema agrícola intensivo desde los años 80, y para el año 2017 se contabilizaron 43 000 ha de plantaciones de este producto, lo que incrementa el área de influencia de este cultivo sobre los cuerpos de agua (INCAE, 2017). La creciente demanda de los mercados estadounidense y europeo, provoca que se deba acelerar e intensificar la producción y por ende cada vez es mayor la aplicación de herbicidas, fungicidas, nematocidas, insecticidas, fertilizantes y compuestos agroquímicos, (Aguirre & Arboleda 2008). En el año 2010 se reportó el uso de cerca de 14 tipos de agroquímicos en este cultivo (Cuadro 1) y se espera que para el año 2017 el uso de los mismos no haya cambiado significativamente.

Cuadro 1. Principales agroquímicos utilizados en el cultivo de piña en Costa Rica.

Tipo	Nombre en el mercado	Mecanismo de Acción
Insecticidas	Diazinón Etoprofos Carbaril	Inhibición de enzima colinesterasa
Herbicidas	Ametrina	Bloquea el transporte de electrones
	Bromacil	Inhibición del fotosistema II
	Diuron	Inhibición del fotosistema II
	Paraquat	Inhibición del fotosistema I
Regulador de crecimiento	Etefón	Alteraciones en procesos fisiológicos y bioquímicos
Fungicidas	Mancozeb	Inhibición y desnaturalización enzimática.
	Aceites agrícolas	
	Tridemorf Conazoles	Inhibición de la síntesis de ergosterol Interrumpe la función de la membrana
	Clorotalonil	Inhibición síntesis de ATP
Fungicidas pos-cosecha	Triadimefon	Inhibición de la biosíntesis de esterol en las membranas

Fuente: Modificado de Importación y Uso de Plaguicidas en Costa Rica: período 2006-2012. Informe Área Diagnóstico, Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas. 2012.

Las malas prácticas de cultivo provocan que ciertos residuos se incorporen al flujo hidráulico de muchos cuerpos de agua y por escorrentía a lagos y ríos, dependiendo del grado de pendiente y el uso de agroquímicos (Ruepert *et al.* 2005). El Cuadro 2 resume los diferentes agroquímicos encontrados en cuerpos de agua según publicaciones científicas y reportes en medios de comunicación en los últimos años. Como se puede observar se ha detectado la presencia de agroquímicos en ríos, cuencas, acueductos y humedales.

Cuadro 2. Agroquímicos encontrados en cuerpos de agua de los principales cantones productores de piña en Costa Rica.

Cantón	Localidad	Compuestos encontrados	Referencia
Escurrimiento al Mar Caribe (Agua superficial y sedimentos en ríos)	Limón	bromacil, diuron, clorpirifós, endosulfan, α -clordano, HCH, y fenbuconazol	REPCar, 2011 (CICA-CIMAR)
Siquirres (Fuentes de agua y ríos)	El Cairo, Milano y Luisiana de Siquirres Cuenca Río Madre de Dios, Laguna Madre de	bromacil, diuron y otros plaguicidas ametrina, carbofuran, clorotalonil, diazinon, diurón, epoxiconazole,	Informe del Estado de La Nación, 2013. Periódico La Nación 2008. Castillo <i>et al.</i> 2011

	Dios, Limón	etoprofos	
San Carlos (Fuentes de agua)	Acueducto de Veracruz Pital	agroquímicos bromacil	Instituto de Acueductos y Alcantarillados (AyA). La Nación (2016)
Guatuso (Río)	Río Barbudero	plaguicidas	Semanario Universidad (2009)
Pococí (Ríos, fuentes de agua)	Llano Bonito, Sector Nueve, Santa Rosa de La Rita, Aguas Frías de Roxana, La Curia, San Luis de Jiménez y Parismina	varios plaguicidas, entre ellos los herbicidas ametrina y bromacil, el fungicida propiconazole y el insecticida diazinon	Periódico La Prensa Libre (2013) Laboratorio de Análisis de Residuos de Plaguicidas de la Universidad Nacional (UNA)
Guácimo (Ríos)	Cuenca del Río Jiménez	carbaril, diazinón, etoprofós, Bromacil, ametrina, hexazinona, diurón, triadimefón y clorotalonil	Echeverría <i>et al.</i> 2012
Los Chiles	Humedal de Caño	ametrina, bromacil,	Fournier <i>et al.</i>

(Ríos y Humedales)	Negro Río Frío y la Muerte	diuron, diazinón, etoprofos	2017
Buenos Aires Perez Zeledón	Humedal Terraba-Sierpe	bromacil y ametrina	Semanario Universidad CICA, 2014

Además de sus efectos en el ser humano, Echeverría y colaboradores (2012) señalan que la presencia de agroquímicos provenientes de piñeras afectan a las comunidades de peces e insectos acuáticos. Otros estudios demuestran efectos negativos de los agroquímicos como inhibición de crecimiento y peroxidación lipídica en microalgas, bacterias, protozoos y crustáceos (Ma *et al.* 2002) (Tsui & Chu. 2003). Esto revela la necesidad urgente de implementar o desarrollar tecnologías limpias, con el propósito de asegurar la calidad de la descarga de los procesos agrícolas a los cuerpos de agua (Torzillo *et al.* 2012).

Se han desarrollado diversos métodos para eliminar los agroquímicos de los ambientes acuáticos (Cuadro 3), los cuales utilizan procesos térmicos, químicos, físicos y biológicos. Una alternativa innovadora, es la incorporación de microorganismos como cianobacterias a sistemas de tratamiento, que al ser pequeños, con altas tasas de reproducción y con una gran relación entre la superficie y el volumen celular ofrecen ventajas sobre otras técnicas de remoción de compuestos contaminantes tanto orgánicos como inorgánicos (Zinicovscaia & Cepoi 2016). Estas características les confieren ciertas ventajas en la capacidad de remover agroquímicos, como los que se utilizan en la industria piñera.

Cuadro 3. Métodos convencionales para el tratamiento de aguas con agroquímicos

Método	Descripción	Ventajas	Desventajas	Referencia
Térmico	Combustión controlada	No subproductos tóxicos	Altos costos Complejo No útil para algunos agroquímicos	Hattab & Ghaly. 2012.
Químico	Oxidación Reducción Agentes catalíticos e hidrolíticos Coagulación y Floculación Fotoquímico	Rápido	Formación de subproductos	Molina <i>et al.</i> 2014. Misra <i>et al.</i> 2013. Redi & Kim. 2015.
Físico	Absorción compuestos inorgánicos Nanopartículas	In situ	Formación de subproductos	Hattab & Ghaly. 2012. Sarlak <i>et al.</i> 2014.
Biológico	Degradación	In situ	Formación de subproductos	Maqbool <i>et al.</i> 2016

Las cianobacterias tienen un gran potencial para ser utilizadas en sistemas de biorremediación. En la actualidad existen cerca de 4500 especies identificadas dentro del filo Cyanobacteria (Guiry & Guiry 2017). Se han propuesto diversas

clasificaciones ya que la clasificación taxonómica de las cianobacterias es confusa y se necesita más investigación para lograr un consenso.

Dentro de las clasificaciones más aceptadas se encuentra la de Rippka y colaboradores (1979) (Cuadro 4). Esta clasificación plantea cinco grupos diferenciados por estructuras, formas y tipo de división celular, lo que hace más sencillo su identificación a nivel de microscopio. Se han propuesto otras clasificaciones como la de Komarek (2006) donde se toman en cuenta aspectos moleculares, pigmentos, características morfológicas, bioquímicas, ultraestructurales y ecofisiológicas, lo que se denomina análisis polifásico (Komarek, 2006), y otras como la de Ruggiero y colaboradores (2015), en donde se presenta una clasificación concenso tomando en cuenta más de 1,6 millones de especies, en donde se incluye la clasificación taxonómica de las cianobacterias.

Cuadro 4. Clasificación taxonómica de cianobacterias según Rippka *et al.* (1979).

Subgrupo	Estructura	Particularidades	Algunos géneros
Chroococcales	Unicelular o formación de colonias. Forma esférica, cilíndrica u ovalada	Fisión binaria o gemación. La división ocurre en uno, dos o tres planos.	<i>Synechococcus</i> <i>Gloeotheca</i> <i>Gloeobacter</i> <i>Gloeocapsa</i> <i>Synechocystis</i>
Pleurocapsales		Fisión binaria y múltiple. Formación de pseudofilamentos . Algunas veces presencia de baeocitos	<i>Dermocarpa</i> <i>Nostoc</i> <i>Dermocarpella</i> <i>Chroococcidiopsis</i>
Oscillatoriales	Filamentosas , forman tricomas. Formación de hormogonios	El tricoma posee solo células vegetativas y la división ocurre en un solo plano	<i>Spirulina</i> <i>Oscillatoria</i> Grupo A- LPP <i>Pseudoanabaena</i> Grupo B- LPP
Nostocales		Presencia de acinetos y heterocistes. Ramificación falsa en algunos de los géneros	<i>Nostoc</i> <i>Anabaena</i> <i>Nodularia</i> <i>Calothrix</i> <i>Scytonema</i>
Stigonematales		Presencia de acinetos y heterocistes	<i>Chlorogeopsis</i> <i>Fischerella</i> <i>Mastigocladus</i>

Al igual que las bacterias gram negativas, las cianobacterias tienen una pared celular con una capa de peptidoglicanos delgada, de composición y el entrecruzamiento variable. (Lee, 2008). Algunas poseen una cubierta o cápsula de polímeros extracelulares (EPS) compuesta de mucilago y pequeñas cantidades de celulosa (Lee, 2008). Además, poseen dos membranas, una externa que forma la pared celular y es rica en mureína, y una capa interna que conforma la membrana plasmática, la cual separa el citoplasma del periplasma (Fig.2).

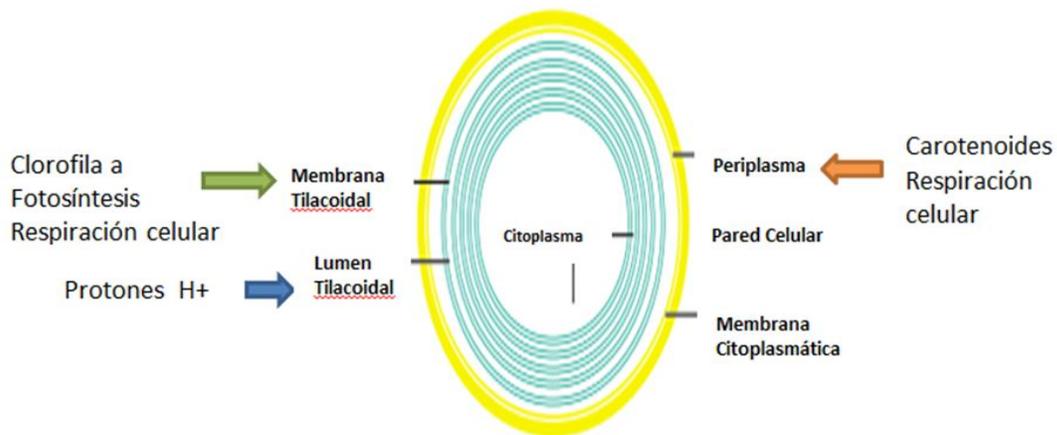


Figura 2. Célula cianobacteriana, membrana celular y compartimentos. Fuente: Modificado de Photosynthesis and Respiration in Cyanobacteria. 2001.

Las cianobacterias, además tienen la capacidad de secretar polisacáridos, que les proveen protección contra otros organismos, luz, desecación, también les proporciona la capacidad de agregación para formar biotapetes y de movilización en superficies sólidas (Lee, 2008). El proceso de excreción de polisacáridos como mecanismo de protección, adhesión y estructura también ha sido reportado en bacterias (Whitfield, 2006; Parkar *et al.* 2017). Esto les ha permitido a ambos grupos a adaptarse exitosamente a diferentes tipos de ambientes.

La principal diferencia entre las bacterias y las cianobacterias, es que estas últimas son organismos fotosintéticos. El mecanismo fotosintético en

eucariotas cianobacterias es similar al que utilizan las cianobacterias (Hohmann & Blankenship, 2011), ya que la evidencia indica que los eucariontes fotosintéticos se originaron de la endosimbiosis de microorganismos similares a cianobacterias (Raven & Allen 2003). La endosimbiosis originó el intercambio de material genético entre el hospedero y el huésped, lo cual generó una dependencia evolutiva entre los mismos (Keeling, 2009). Las cianobacterias darían origen a lo que hoy se conoce como el cloroplasto.

La mayoría de los organismos fotosintéticos comparten: el centro de reacción único (CRs); el fotosistema I (PSI); el fotosistema II (PSII) y el mecanismo de transferencia de electrones desde el H₂O hacia una molécula de NADPH⁺ (Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato), cuya forma reducida, NADPH, es usada en la síntesis de carbohidratos (Fig. 3) (Kumar *et al.* 2012). Al igual que las plantas y algas, las cianobacterias contienen pigmentos fotosintéticos como la clorofila a, b, d y f (Airs *et al.* 2014; Behrent *et al.* 2015). Algunos grupos contienen carotenoides y ficobilinas (ficocianina, allopicocianina y ficoeritrina), estos compuestos están organizados en complejo multiproteicos llamados ficobilisomas (Lee, 2008). En la Figura 4 se muestra la estructura de los tipos de clorofila que se pueden encontrar en cianobacterias.

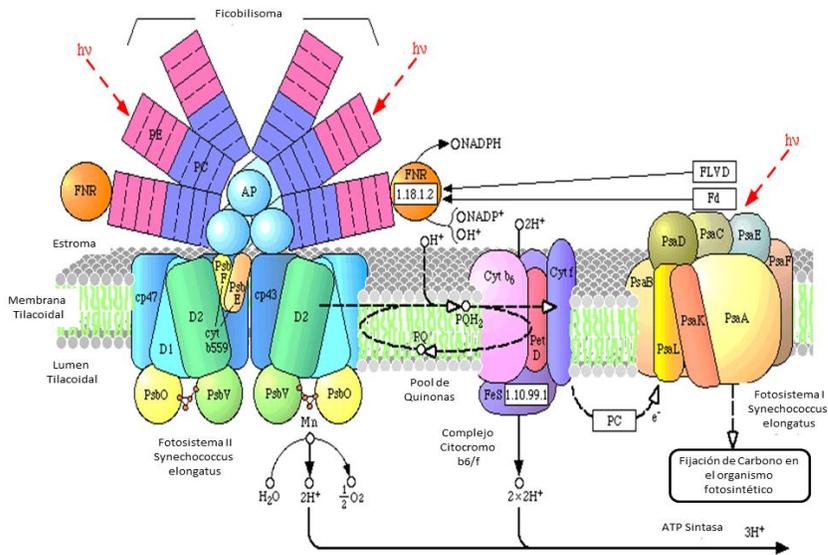
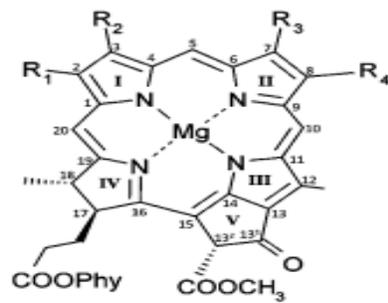


Figura 3. Representación esquemática del complejo de proteínas involucrado en la fotosíntesis de cianobacterias. Fuente: Modificado de The Manganese calcium oxide-cluster of Photosystem II and its assimilation by the Cyanobacteria (2006).



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Chlorophyll a	CH ₃	CH=CH ₂	CH ₃	CH ₂ -CH ₃
Chlorophyll b	CH ₃	CH=CH ₂	CHO	CH ₂ -CH ₃
Chlorophyll d	CH ₃	CHO	CH ₃	CH ₂ -CH ₃
Chlorophyll f	CHO	CH=CH ₂	CH ₃	CH ₂ -CH ₃

Figura 4. Tipos de clorofila presentes en cianobacterias. Fuente: Chlorophylls d and f and their role in primary photosynthetic processes of cyanobacteria. 2016

La fotosíntesis en cianobacterias inicia cuando los ficobilisomas unidos a la superficie de la membrana fotosintética absorben la luz en forma de fotones. Estos sistemas antena están formados por ficobiliproteínas unidas covalentemente por ficobilinas. Las ficobilinas canalizan la energía absorbida hacia el Fotosistema I y II (CRs: proteínas-pigmentos). En la mayoría de las cianobacterias la cantidad de complejos PSII es menor que la de los complejos PSI (relación 3:: 5.8). Las ficobiliproteínas se asocian primero con el fotosistema II (Figura 5a), sin embargo en algunas condiciones pueden asociarse el fotosistema I.

La conversión de energía solar en energía química es el resultado de reacciones en tándem que ocurren en los centros de reacción, la energía se transfiere a las moléculas de clorofila P680 (PSII) y luego al complejo heterodimérico P700 (PSI) en donde inicia el proceso de conversión energético. En ambos fotosistemas se encuentran cofactores redox y sistemas de transferencia de electrones que provienen del agua y son transferidos a NADP+ (Figura 5b)

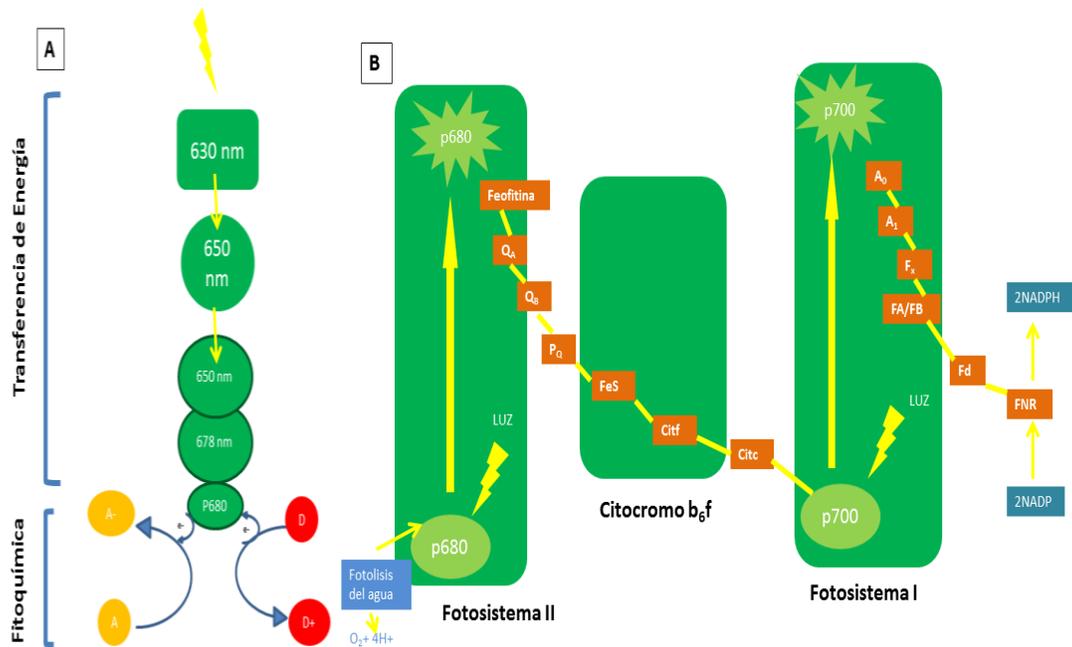


Figura 5. A. Sistema de transferencia de energía de ficobilisomas al fotosistema. B. Esquema Z de la fotosíntesis oxigénica en cianobacterias representando la transferencia de electrones del agua a NADP+. Modificado de Stress Biology in Cyanobacteria. 2013.

Las investigaciones relacionadas con las características de la membrana y la pared celular, así como de sistemas con la fotosíntesis en cianobacterias han sido de gran interés para estudiar los mecanismos que utilizan en la degradación y acumulación de compuestos contaminantes (Zinicovscaia & Cepoi, 2016). Además de estudiar el efecto de estos compuestos en la fotosíntesis, respiración celular, expresión genética, división celular y producción de enzimas con el fin de conocer la sobrevivencia y la tolerancia a los diferentes compuestos (Ibrahim *et al.* 2014).

Los microorganismos tienen la capacidad de remover sustancias contaminantes del medio, entre ellas compuestos orgánicos como los agroquímicos. El potencial de las cianobacterias en la remoción de estos compuestos ha sido reportado para varias cepas (Cuadro 5), las cuales son capaces de remover y degradar del medio

compuestos tan tóxicos para los ambientes acuáticos como lo son los agroquímicos.

Cuadro 5. Estudios sobre capacidad de remoción de agroquímicos en diferentes microalgas (algas verdes y cianobacterias).

Organismo	Compuesto	Referencia
<i>Microcystis aeruginosa</i>	Diuron Ácido 2,4-diclorofenoxiacético Fenoxone BHC	Swain <i>et al.</i> 1994
<i>Scenedesmus sp.</i> <i>Scenedesmus sp 2</i> <i>Chlamydomonas sp</i> <i>Stichococcus sp</i> <i>Chlorella</i> <i>Nostoc sp 1</i> <i>Nostoc sp 2</i> <i>Nostoc sp 3</i> <i>Nostoc muscorum</i> <i>Anabaena sp</i>	Fenamiphos	Cáceres <i>et al.</i> 2008
<i>Anabaena sp</i> <i>Arthrospira fusiformis</i> <i>Leptolyngbya boryana</i> <i>Microcystis aeruginosa</i> <i>Nostoc punctiforme</i> <i>Spirulina platensis</i>	Herbicida (Glifosato)	Forlani <i>et al.</i> 2008
<i>Oscillatoria sp</i>	Paraquat Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	Kumar <i>et al.</i> 2010

<i>Synechocystis</i> sp. PUPCCC 64	Anilofos	Singh <i>et al.</i> 2011
<i>Westiellopsis</i> <i>prolifera</i> , <i>Nostoc hatei</i> , y <i>Anabaena sphaerica</i>	Carbofuran, Clorpirifos y endosulfan	Jha <i>et al.</i> 2005
<i>Anabaena</i> <i>oryzae</i> , <i>Nostoc</i> <i>muscorum</i> , and <i>Spirulina platensis</i>	Malatión	Ibrahim <i>et al.</i> 2014

Dentro de los mecanismos que utilizan las cianobacterias para remover estas sustancias se encuentra la absorción y la adsorción. La absorción es el proceso mediante el cual se incorporan sustancias dentro de una célula; mientras que adsorción se refiere a la adherencia de alguna sustancia en la superficie celular (Gadd, 2008) (Fig. 6). Ambos son procesos efectivos y generalmente de bajo costo, que puede ser usados para la remoción de contaminantes como agroquímicos y metales pesados.

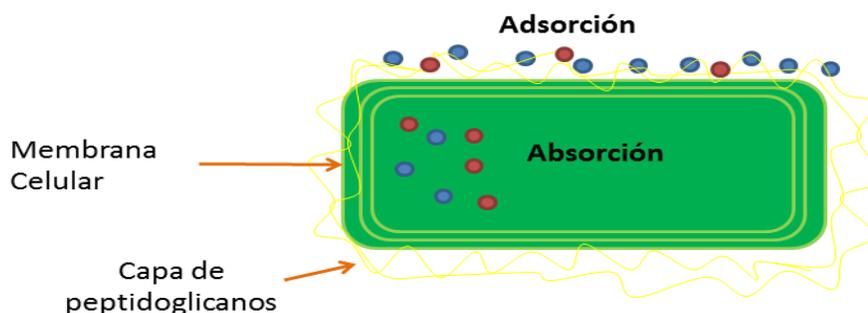


Figura 5. Representación de la localización de las moléculas luego del proceso de absorción y adsorción en células cianobacteriana.

La absorción y la adsorción son procesos que involucran la participación de la membrana y la pared celular. En la biorremediación de agroquímicos se han propuesto además otros mecanismos como lo son la unión a complejos proteicos (Zimmermann *et al.* 2006), la degradación (Lipok *et al.* 2009) y la mineralización (Lipok *et al.* 2007).

Los agroquímicos son sustancias que no solo afectan la estructura celular si no que alteran procesos fisiológicos y bioquímicos, tales como la síntesis de enzimas y la fotosíntesis (Zheng *et al.* 2013). En cepas de cianobacterias se ha demostrado que afectan la tasa de crecimiento, la fotosíntesis, la fijación de nitrógeno y las actividades metabólicas (Singh *et al.* 2013)

El estudio de la alteración morfológica y fisiológica de las células después de estar en contacto con las sustancias contaminantes es muy importante para conocer su potencial en sistemas de biorremediación, ya que se debe determinar los efectos inhibitorios o estimulantes en la tasa de crecimiento y los procesos fisiológicos (Dubey *et al.* 2013). Se han considerado diversos criterios para determinar la viabilidad en cianobacterias, entre ellos los cambios morfológicos, bioquímicos, modificaciones en el citoesqueleto y cambios ultraestructurales (Zheng *et al.* 2013).

La metodología utilizada para determinar los cambios morfológicos es la microscopia de luz y la de fluorescencia ultravioleta. Según Zheng y colaboradores (2013) mediante estas técnicas se puede identificar el proceso de muerte celular y viabilidad en células vegetativas, hormogonios, heterocistes y acinetos. En los últimos años la citometría de flujo ha emergido como herramienta útil para determinar la viabilidad celular.

La citometría de flujo, es una técnica de análisis automatizado de células o partículas biológicas, es capaz de analizar múltiples parámetros de una célula y ha sido ampliamente utilizado para evaluar y cuantificar las condiciones de estrés a nivel celular, así como la toxicidad de diversas sustancias en cianobacterias

(Franklin, 2001)(Hadjoudja *et al.* 2009),(Prado, 2009). Esta técnica también ha sido utilizada para separar células mutantes de *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 (Perelman *et al.* 2002), estudios de afloramientos de *Microcystis* (Zhou *et al.* 2012) y análisis de fitoplancton (Dijk *et al.* 2010).

El sistema estándar BD FACSCalibur de citometría incluye un láser (15mW, 488 nm, argón) y detectores para dos parámetros de dispersión y tres parámetros de fluorescencia. Adicionalmente, puede tener un láser adicional (635 nm) y detector de diodos (FL4) (BD FACSCalibur Instructions For Use, 2007). La luz del láser se enfoca en el flujo de células por un lente, esta es interceptada por detectores, los cuales envían los datos a un programa informático que permite analizarlos. La fluorescencia y la dispersión proveen información acerca de la forma, el tamaño, la granularidad del citoplasma y la intensidad de la fluorescencia en cada célula. La dispersión frontal (FSC siglas en inglés) es colectada por el diodo frontal y la dispersión lateral (SSC siglas en inglés) es colectada por lentes colectores de fluorescencia, espejos dicróicos (DMs) y fotomultiplicadores (BD FACSCalibur Instructions For Use, 2007) (Figura 7)

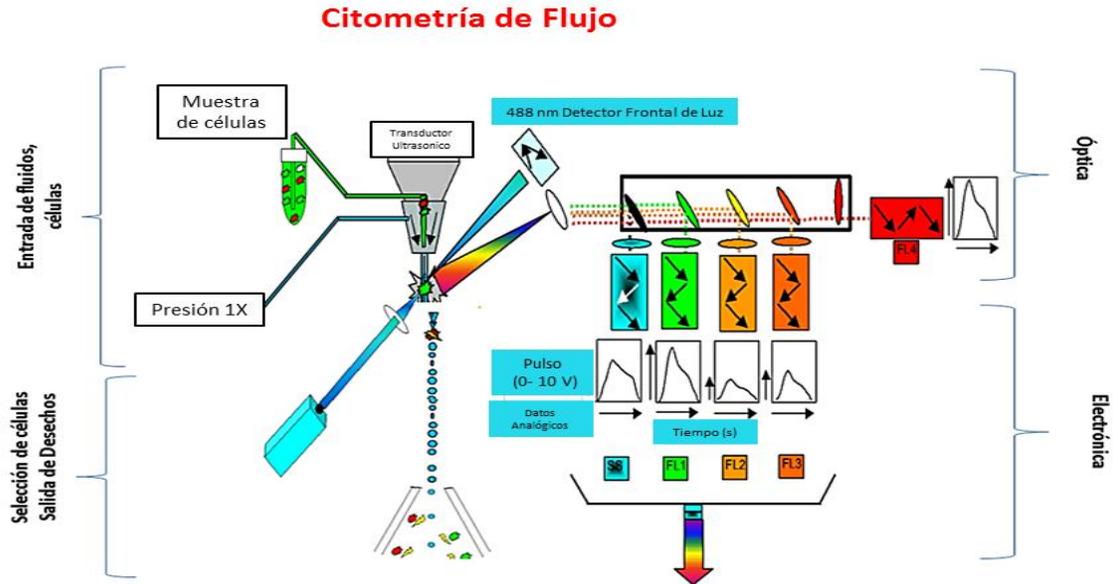


Figura 6. Diagrama funcionamiento básico de la citometría de flujo. Se señalan las etapas de entrada de fluidos o células, la sección óptica, la electrónica y la selección de células y desechos. Fuente: Modificado de Basic Principles in Flow Cytometry. Universidad de Berkley.

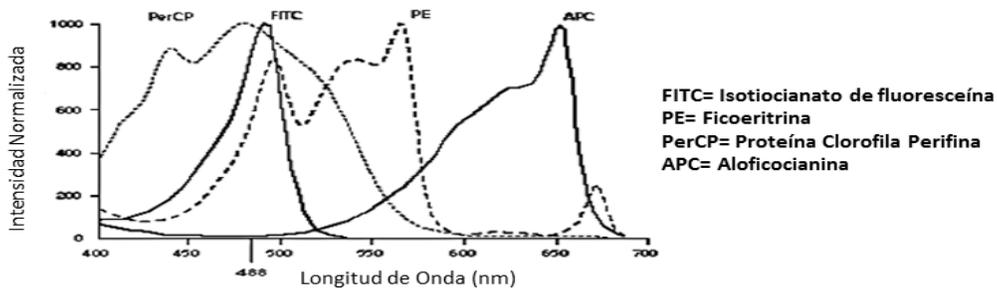
La dispersión frontal es proporcional al área y tamaño de la superficie celular, por lo que es útil para distinguir poblaciones celulares de diferente tamaño y forma; la dispersión lateral es proporcional a la granularidad del citoplasma celular o la complejidad interna de la misma, al menos en eucariotas. Un gráfico bivariado de FSC y SSC permite diferenciar tipos de células en poblaciones heterogéneas (BD FACSCalibur Instructions For Use, 2007). El láser de argón es utilizado en citometría de flujo debido a que emite luz a 488 nm lo cual genera la excitación de más de un fluorocromo. Uno de estos es el isocianato de fluoresceína, el cual tiene un pico de absorción máximo de 488 nm (Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide, 2000).

Dentro de esta técnica, los principales parámetros que se utilizan para determinar la viabilidad celular son la medición de la autofluorescencia y el procesamiento celular del isocianato de fluoresceína(FDA), es cula es un indicador

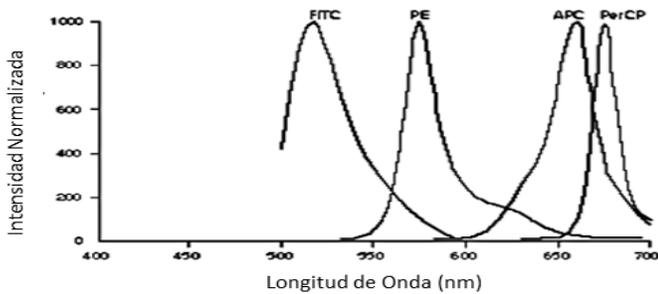
de la integridad de la membrana (Hyka et al. 2013). La autofluorescencia permite evaluar pigmentos como clorofila a, b, c y d, ficoeritrinas y carotenoides; todos estos pigmentos absorben radiación a 488 nm y presentan un pico de emisión a longitudes de onda mayores a 600 nm, todos son detectados por el filtro FL3.

El ensayo con diacetato de fluoresceína (FDA) ha sido utilizado en estudios fisiológicos de diferentes tipos de células y fitoplancton (Latour *et al.* 2004), así como en evaluaciones de la toxicidad de diferentes agroquímicos y metales pesados en microalgas (Prado *et al.* 2009). Es un compuesto no polar, hidrofóbico y sin fluorescencia, su absorbancia máxima es a 490nm y la emisión máxima de 513 nm (Hyka *et al.* 2013) (Fig. 8), tiene una alta absorción, excelente energía de fluorescencia y alta solubilidad en agua (Straüber & Müller, 2010).

Una vez dentro de la célula, el FDA es hidrolizado por esterasas no específicas que generan la fluoresceína, que sí es fluorescente (Li *et al.* 2011) (Fig. 9). Las esterasas son principalmente lipasas y acilasas, las cuales son esenciales para el metabolismo de fosfolípidos en las membranas celulares (Prado *et al.* 2009). Debido a la alta polaridad de la fluoresceína es atrapada dentro de las células mostrando la integridad de la membrana, y la intensidad de la fluorescencia se incrementa en el tiempo dependiendo de la actividad metabólica de las esterasas (Prado et al. 2009). De esta manera, la observación de una señal fluorescente en células que fueron tratadas con FDA indica que aún se mantiene una función celular, y por lo tanto se interpreta como evidencia de viabilidad celular.



A. Espectro de absorción de los cuatro fluorocromos



B. Espectro de emisión de los cuatro fluorocromos

Figura 7. Intensidad Normalizada en relación con la longitud de onda (nm) de los fluorocromos Isotiocianato de fluoresceína, Ficoeritrina, Proteína Clorofila Perifina y alofococianina. A. Espectro de absorción. B. Espectro de emisión. Fuente: Modificado de Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide. 2002.

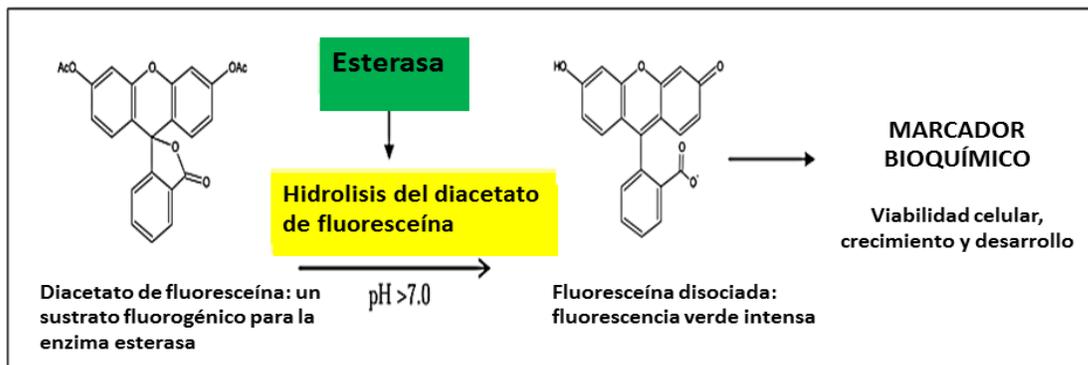


Figura 8. Transformación del diacetato de fluoresceína en fluoresceína por acción de las enzimas esterases.. Fuente: Modificado de A Fluorimetric Sensor for Detection of One Living Cell. 2007.

Se ha reportado la citometría de flujo como una técnica para determinar la viabilidad celular de las cianobacterias expuestas a agroquímicos (Yamagami et al. 1994; Du *et al.* 2017). No existe reporte de investigaciones que hayan utilizado esta técnica en nuestro país para determinar la viabilidad celular en cianobacterias. Igualmente, no hay investigaciones relacionadas con la remoción de agroquímicos utilizando estos microorganismos.

Las cepas que se utilizaron en esta investigación forman parte de la colección de cianobacterias y microalgas del laboratorio de Microbiología Ambiental. Estas cepas se han identificado basándose en técnicas moleculares (Morales, 2008) y se han utilizado en diferentes proyectos para la biorremediación de metales como aluminio, zinc y cobre (Núñez, 2012).

JUSTIFICACIÓN

Los agroquímicos son sustancias muy tóxicas que alteran los procesos fisiológicos de las células. El uso intensivo de los mismos en la producción de piña en nuestro país es un grave problema, ya que ocasiona que residuos de estos compuestos lleguen a los cuerpos de agua y afecten a organismos como peces, macroinvertebrados, plantas acuáticas y microorganismos; así como a la población en general. En los principales cantones piñeros del país se ha reportado la presencia de estos compuestos en ríos, lagunas y humedales.

La utilización de mecanismos químicos y físicos para remover estos compuestos ha sido reportada en la literatura, sin embargo el empleo de microorganismos como las cianobacterias en sistemas de biorremediación es un proceso alternativo y novedoso. Estudios demuestran que las cianobacterias tienen la capacidad de remover agroquímicos del medio en el que viven. Las características de estos microorganismos las hacen buenas candidatas para ser incorporadas en sistemas de tratamiento, con el fin de reducir y eliminar estos compuestos.

Las cepas de la colección de ambientes extremos del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular han demostrado su capacidad en la remoción de diversos metales pesados, por lo que pueden tener un alto potencial en la biorremediación de agroquímicos; proceso que ha sido demostrado en la literatura utilizando otras cepas de cianobacterias. Este estudio es el primero en Costa Rica en utilizar estas cepas de cianobacterias para remover agroquímicos del medio.

La citometría de flujo es una técnica utilizada en análisis de células humanas, sin embargo este es el primer estudio en nuestro país que utiliza esta técnica para determinar la viabilidad celular en suspensiones libres de células de cianobacterias. Además del establecimiento de un protocolo de preparación de las muestras y análisis de resultados que pueden ser útiles para futuras investigaciones.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la capacidad de remoción de Paraquat® (Gramoxón), Diuron® y Bromacil® de dos cepas de cianobacterias aisladas de fuentes termales de Costa Rica para la recuperación de aguas residuales.

Objetivos Específicos

1. Determinar la isoterma de adsorción de los agroquímicos sobre las dos cepas de cianobacterias.
2. Estimar la cinética de adsorción y el efecto del pH en dicha cinética, de la cepa que presente la mayor absorción de los agroquímicos.
3. Evaluar el efecto de los tratamientos sobre la viabilidad celular de las cepas de cianobacterias utilizando citometría de flujo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas de cianobacterias

Se utilizaron dos cepas de cianobacterias pertenecientes a la colección de cianobacterias termofílicas del área de Microbiología Ambiental del CIBCM, aisladas de fuentes termales. Dichos morfotipos han sido identificados como 7M M04 *Leptolyngbya* sp 2 (Morales, 2008) y M03 *Nostoc* (Fig.10). El género *Leptolyngbya* pertenece al orden Synechococcales, se caracteriza por ser una cepa filamentosa, con células vegetativas alargadas y en algunos casos presencia de hormogonios. El género *Nostoc*, por otro lado forma parte del orden Nostocales y se caracteriza por la presencia de heterocistes y acinetos, las células tienen forma esférica.

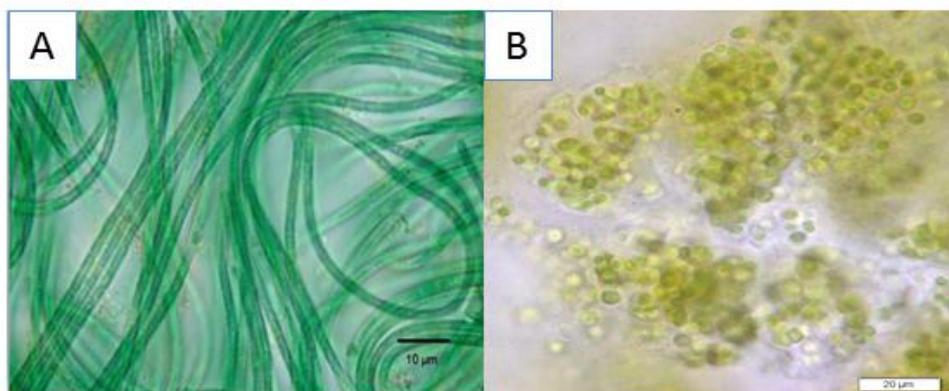


Figura 9. Fotografía microscopio de luz.A.Cepa 7M M04 *Leptolyngbya* sp 2.

Fuente: Morales (2008). B. Fotografía microscopio de luz Cepa M03 *Nostoc* sp

Preparación de la biomasa de cada cepa

Las cianobacterias se mantuvieron en medio modificado BG₁₁ Rippka *et al.* (1979). Cuando la biomasa fue suficiente, fue filtrada y , lavada 3 veces con agua Milli-Q y secada a 45°C durante 24 h (Fig. 11). La biomasa seca se morterizó y almacenó en tubos cónicos estériles de 15 mL en una desecadora para su posterior utilización. Se hicieron pruebas preliminares con diferentes concentraciones de los agroquímicos para obtener las isotermas de absorción.

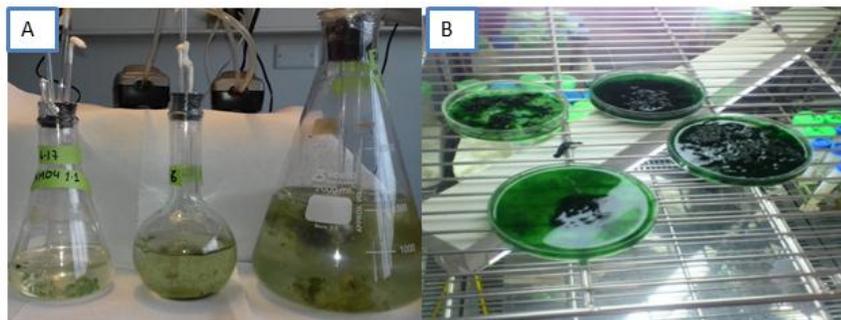


Figura 10. A. Escalamiento de biomasa en Erlenmeyer. B. Secado de biomasa a 45°C durante 24 h.

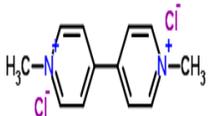
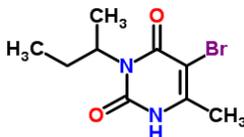
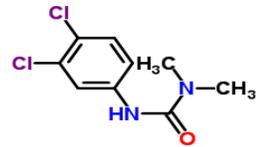
Preparación de los herbicidas

Se utilizó la versión comercial de los herbicidas Paraquat® y Bromacil®. El Paraquat® (20SL), es distribuido por la casa comercial Colono Agropecuario y el Lote utilizado fue el A0431502, el Bromacil® (80 WP) por su parte está registrado por la casa comercial Agromart. INQUISA dentro del lote 0703815. El Paraquat® tiene una presentación líquida espesa de color verde, por lo cual para obtener las concentraciones utilizadas (0, 28.76, 71.42, 114.28, 157.15, 200.01, 244.69, 285.70 mg /L) se hicieron diluciones con agua MilliQ estéril. El Bromacil®, tiene una presentación en polvo blanco, que fue disuelto en agua MilliQ para obtener disoluciones utilizadas (0, 100, 200, 300, 400, 500 mg/L). El herbicida Diuron® es distribuido por la casa comercial Agromart. INQUISA con el número de lote 2030714, y tiene una consistencia líquida blanca espesa.

Se utilizaron envases plásticos previamente lavados con jabón Alconox y agua destilada para eliminar las posibles sustancias contaminantes de los tubos. Los patrones para la elaboración de la curva estándar en el espectrofotómetro de luz ultravioleta fueron facilitados por el Centro de Investigación en Contaminación Ambiental (CICA).

Las principales características de los agroquímicos se muestran en el Cuadro 6

Cuadro 6. Principales características y propiedades de los herbicidas Paraquat®, Bromacil® y Diuron®.

	Paraquat®	Bromacil®	Diuron®
Nombre	Dicloruro de 1,1'- <i>dimetil-4,4'- bipiridilo</i> <i>Bipiridilo</i>	5-Bromo-3-sec-buti l-6-metiluracil Uracil	3-(3,4-Diclorofenil)- 1,1-dimetilurea Fenilurea
Fórmula Molecular	C ₁₂ H ₁₄ Cl ₂ N ₂	C ₉ H ₁₃ BrN ₂ O ₂	C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O
Estructura química			
Peso Molecular	274,17	261,12	233,09
Solubilidad en agua ⁵ (mg/L a 20°C)	62	815	42
Características de hidrólisis	Hidrolíticamente estable en condiciones ácidas, neutras y alcalinas, no hay una disminución significativa de la concentración a pH 5,7 y 9 después de 30	Estable con bases acuosas. Se descompone levemente con ácidos concentrados.	Se descompone entre 180 y 190 °C librando gases tóxicos de cloro y nitróxidos. Poco estable en condiciones alcalinas ⁸

	días a 25°C y 40°C ¹		
Características de fotólisis	Vida media estimada en agua bajo ambientes Europeos fue calculada entre 2 y 280 años, dependiendo de la intensidad de luz y la profundidad ¹	Vida media en suelo 275 días Baja descomposición en presencia de luz ⁶	Se descompone levemente en presencia de luz ⁷
Toxicidad ²	II	IV	IV
Modo de acción en plantas	Herbicida de contacto no selectivo que se absorbe por follaje. Destruye el tejido de la planta, es un disruptor de la fotosíntesis y de la membrana celular. Esto provoca la salida de agua y la rápida desecación del follaje ³	Herbicida sistémico de amplio espectro. Inhibe la fotosíntesis y el crecimiento de la planta	Herbicida sistémico de amplio espectro. Inhibe la fotosíntesis y el crecimiento de la planta. Ocasiona peroxidación lipídica
Efecto en organismos	Ligeramente tóxico para peces	No tóxico para peces y	Moderadamente tóxico para peces e

acuáticos	Embriotoxicida y teratogenicidad en peces y anfibios. Afecta especies de algas de agua dulce y plantas acuáticas ³	macroinvertebrados. No se bioacumula ⁴	invertebrados acuáticos ⁹ Utilizado como alguicida
-----------	---	---	--

¹ FAO Specifications and Evaluations for Agricultural Pesticides, 2003.

² Clasificación según el Servicio Fitosanitario del Estado, Costa Rica.

³ PANAP. <http://www.panna.org/sites/default/files/Paraquat%20monograph%20final%202011-1.pdf>

⁴ <http://www.wsdot.wa.gov/NR/rdonlyres/7004073D-DBAD-4BBA-B32D-04082C699136/0/Bromacil.pdf>

⁵ PubChem Open Chemistry Database. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

⁶ Moilanen & Crosby. 1974. The photodecomposition of Bromacil®. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2:3-8

⁷ Okamura. 2002. Photodegradation of the antifouling compounds Irgarol 1051 and Diuron® released from a commercial antifouling paint. *Chemosphere*. 48:43-50

⁸ Djebbar, K. et al. 2008. Comparison of Diuron® degradation by direct UV photolysis and advanced oxidation processes. *Journal of Environmental Management*. 88:1505-1512.

⁹ Environmental Fate of Diuron®. <http://www.cdpr.ca.gov/docs/emon/pubs/fatememo/Diuron.pdf>

Análisis de adsorción y análisis residual del contenido del pesticida en la solución

Se utilizó el protocolo publicado por Kumar y colaboradores (2010). La adsorción de los herbicidas fue determinada en lotes con tres réplicas. Se colocaron 200 mg de la biomasa seca en cada tubo y se agregaron 10 mL de la disolución del herbicida en una concentración conocida (Fig. 18a), se mantuvo en agitación 100 rpm durante 96 horas a temperatura ambiente (25 ± 2 °C). Antes de realizar las isotermas se hicieron evaluaciones previas con diferentes rangos de concentraciones y pH en placas de cultivo plásticas con 5mg de biomasa y 5 mL del herbicida durante 3 h de exposición.

La biomasa se separó por centrifugación a 5,000 rpm. El sobrenadante se colocó en tubos limpios para la determinación de la concentración residual de pesticida. La absorbancia en la disolución se obtuvo en un espectrofotómetro de

luz ultravioleta. El Paraquat® fue cuantificado a 257 nm (Sannino *et al.* 2007) y el Bromacil® a 405 nm Bromacil® (Linde *et al.* 1996). Los resultados de las concentraciones remanentes en la isoterma de Paraquat® fue validado mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) en colaboración con el CICA. El pH utilizado en todos los experimentos fue de 7, ya que se trató de modificar el pH utilizando ácido clorhídrico a 1% y se observó una disminución en la concentración del mismo.

Cinética y modelos de isotermas de los datos de adsorción

Se realizó un modelo de la aproximación a ecuaciones empíricas como las de Freundlich y Langmuir ya que se ha encontrado previamente que los datos siguen este tipo de curva (Kumar *et al.* 2010). Una vez encontrada la capacidad de absorción máxima, se determinó la ecuación de la cinética solamente a la reacción de la cepa *Leptolyngbya* sp 2 con el herbicida Paraquat®. La escogencia de la misma se basó en la cantidad de biomasa, y que la concentración remanente del herbicida se comprobó por HPLC. Se utilizó 200 mg de biomasa en cada tubo, el volumen total del agroquímico fue de 15 mL a una concentración de 100 mg/L.

Análisis de viabilidad celular

Después de los análisis de cuantificación de adsorción se tomaron las células y estas fueron lavadas con agua destilada estéril y maceradas levemente. Posteriormente se filtraron con un tamiz de 40 μm (Fig. 12a y b) y el filtrado fue colocado en tubos Corning Falcon Round Bottom de poliestireno. En cada tubo se agregaron 3 gotas de fluoresceína al 1% en agua destilada minutos antes de la medición, se agitó levemente en un agitador. Se utilizó como referencia el protocolo establecido por Hadjoudja y colaboradores (2009). El citómetro marca BD FACSCalibur™.



Figura 11. A. Macerado de la muestra antes de ser filtrada para citometría. B. Sistema de filtración con tamiz de menos de 40 μm .

El análisis posterior de los datos se realizó con el software BD FACSComp™, para obtener el porcentaje de células considerado como viables y no viables, los gráficos de dispersión de las células y el promedio en cada medición según el fluorocromo utilizado. Se utilizó como control las cepas que no habían sido expuestas a los herbicidas, y con esto se determinó la medición estándar para FL1 y FL3, que corresponden a la fluoresceína y a la clorofila respectivamente (Fig. 13). Como control positivo se utilizaron cianobacterias expuestas a cloro al 3% durante 30 min.

Se tomó una de las réplicas expuestas a los herbicidas de cada concentración y se tomaron fotografías utilizando un microscopio de fluorescencia ultravioleta para evaluar el efecto de los mismos en la fluorescencia y los pigmentos.

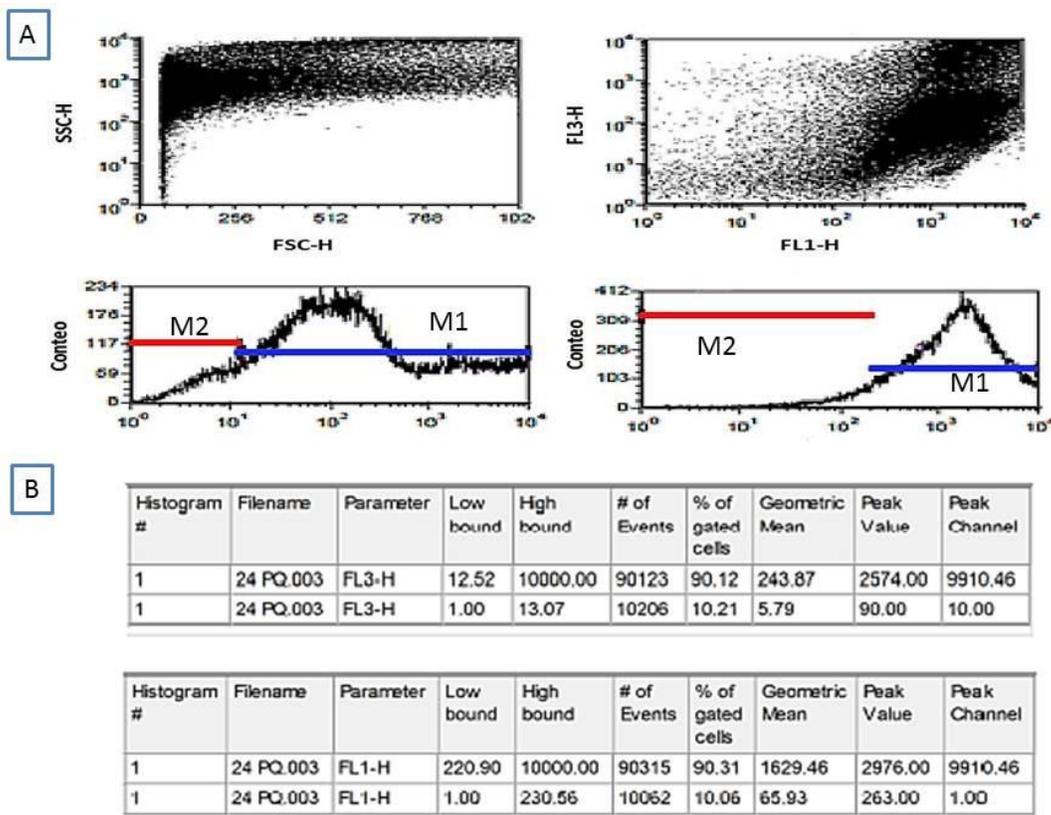


Figura 12. Resultados del tratamiento control en el análisis de citometría que se utilizó como medición estándar. FL1 corresponde a la fluoresceína y FL3 a la clorofila. Se midieron 100000 eventos. La línea azul señala las células no afectadas o viables (M1) y la línea roja las células afectadas (M2) o no viables. A. Diagrama de dispersión. Cada punto representa la medición de una célula. B. Cuadro de resultados que se obtienen en cada medición.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron con un análisis de variancia para determinar si existe una diferencia entre los tratamientos utilizados. En caso de un resultado positivo, se utilizó una prueba post-hoc de Tukey-Kramer. El análisis se realizó con el paquete estadístico R con la interfase R studio para comparar los resultados obtenidos en el análisis de citometría de flujo. Los gráficos de este análisis también fueron elaborados en este programa. Los valores de las ecuaciones de las isothermas y la cinética se obtuvieron en el programa OriginPro y se graficaron en el programa estadístico R.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Isoterma de adsorción del herbicida Diuron® con las cianobacterias *Leptolyngbya sp* y *Nostoc sp*.

Se hicieron evaluaciones previas para encontrar las concentraciones a utilizar y con esto determinar la isoterma de adsorción utilizando Diuron®, sin embargo se dió la formación de un precipitado de color blanco que se mantenía adherido a la placa utilizada en este ensayo (Fig. 14). Esto dificultó el análisis de los datos ya que no fue posible cuantificar con precisión la concentración remanente. La formación del precipitado se observó en todas las concentraciones evaluadas a pH 7, por lo que no se pudo determinar la capacidad de remoción de Diuron® de las dos cepas de cianobacterias.

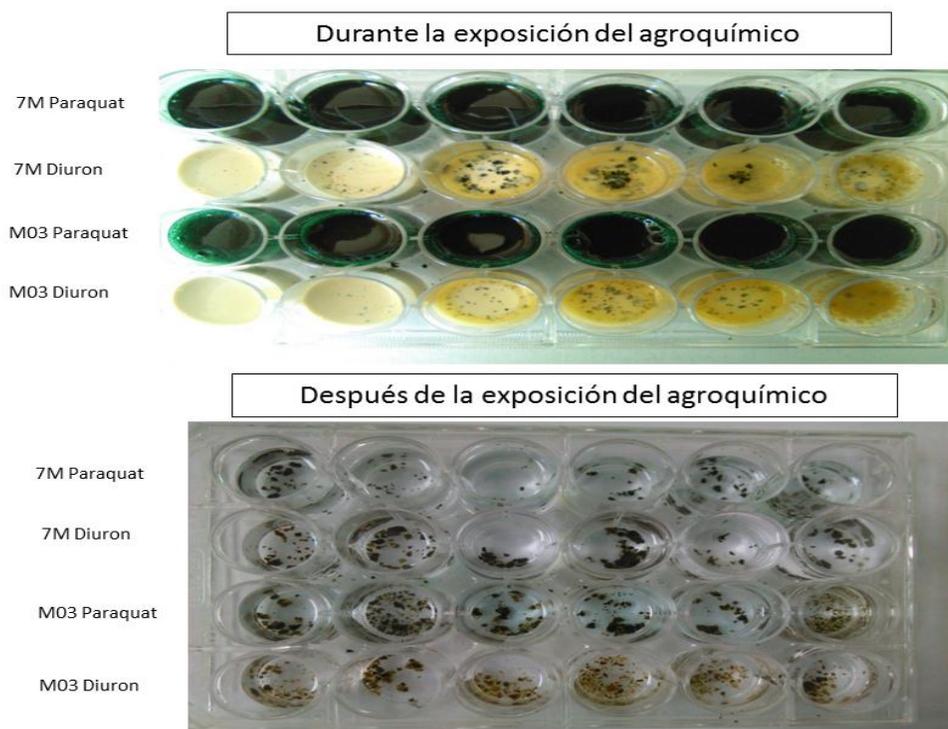


Figura 13. Evaluación previa del efecto de los herbicidas Paraquat® y Diuron® en placas de cultivo plásticas.

En la foto superior se muestra la formación de un precipitado de color blanco. En la placa inferior se observan las cianobacterias después de la exposición a Diuron®.

Isoterma de adsorción del Paraquat® y Bromacil® con las cianobacterias *Leptolyngbya* y *Nostoc*

La isoterma de adsorción del Paraquat® y del Bromacil® se ajusta al modelo de Langmuir (Fig. 15 y Fig. 16). El ajuste a estos modelos sugiere una distribución heterogénea de los sitios de unión del Paraquat® en la superficie de la biomasa (Kumar *et al.* 2010). Los valores de q_{max} , y ajuste del modelo se describen en el cuadro 7.

La cepa *Leptolyngbya* tiene la capacidad de remover hasta $11,72 \pm 0.002$ mg/g del agroquímico Paraquat® en disolución acuosa a pH 7,0, mientras que la cepa *Nostoc* puede remover hasta $17,59 \pm 0.002$ mg/g del compuesto a pH 7. La cepa *Nostoc* tiene una mayor capacidad de remoción de Bromacil® que la cepa *Leptolyngbya*, sin embargo estas diferencias no son significativas. Ambas pueden remover una mayor cantidad de Bromacil® que de Paraquat®. *Leptolyngbya* tiene la capacidad de remover hasta 52,33 mg/g del herbicida en disolución acuosa y pH 7, la cepa *Nostoc* puede remover hasta 53,33 mg/g del compuesto a pH 7.

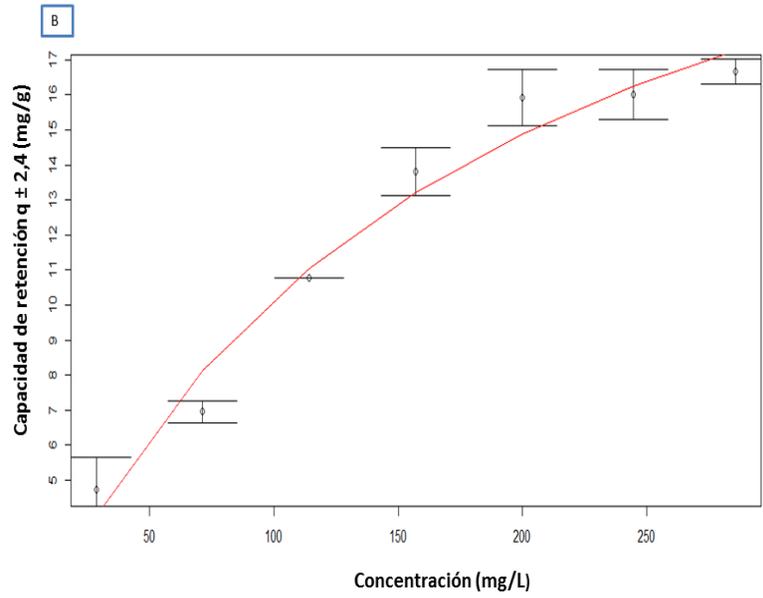
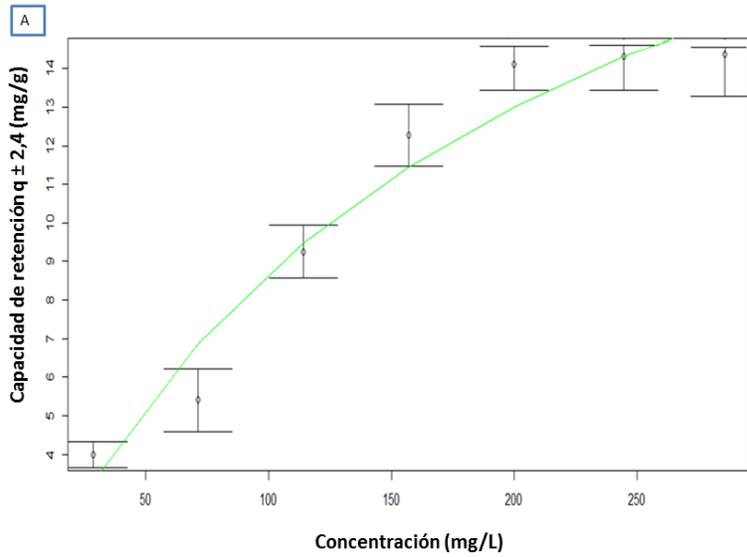


Figura 14. Isotherma de adsorción del Paraquat® de las dos cepas y su ajuste al modelo de Langmuir A. Cepa Leptolyngbya. B. Cepa Nostoc

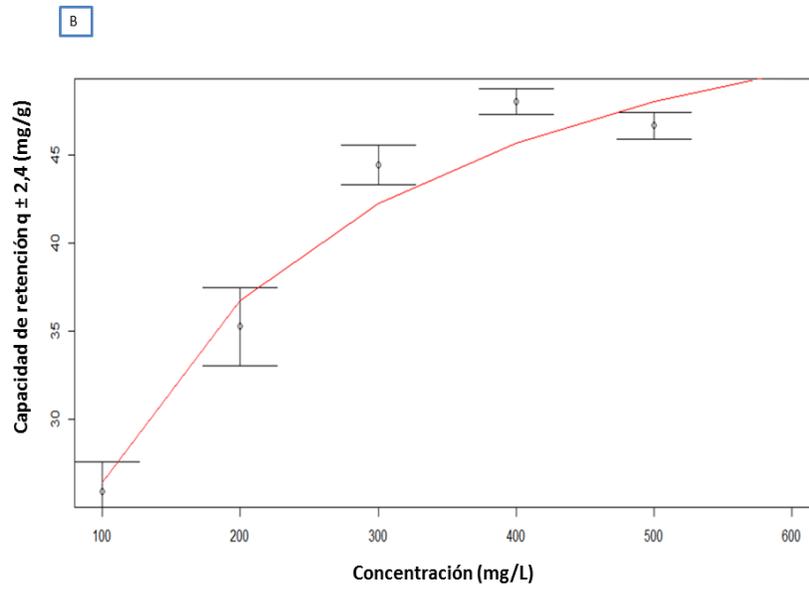
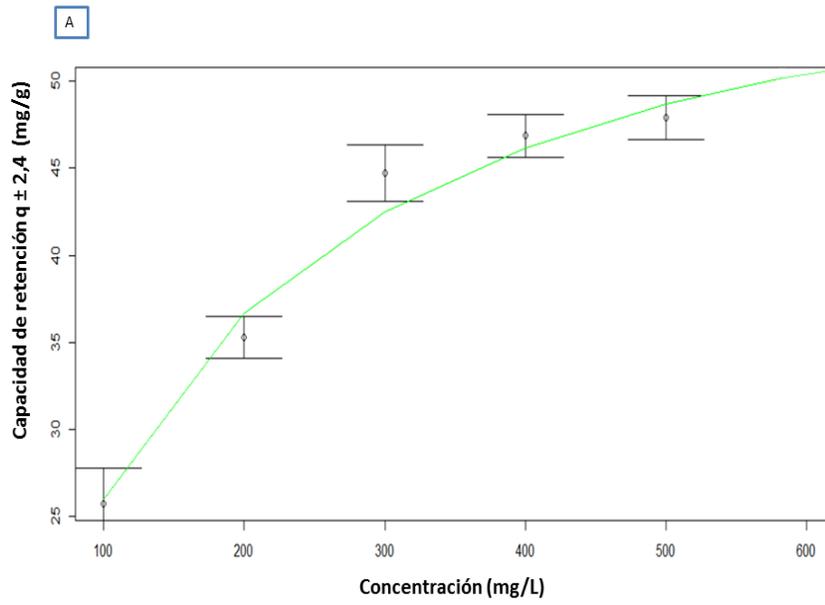


Figura 15. Isotherma deadsorción del Bromacil®de las dos cepas y su ajuste a los modelos de Langmuir. A. Cepa *Leptolyngbya*. B. Cepa *Nostoc*

Cuadro 7. Parámetros, coeficientes de determinación y ajuste de los modelos Langmuir a las isotermas de adsorción de las dos cepas de cianobacterias.

Modelo		Paraquat®		Bromacil®	
		<i>Leptolyngbya</i>	<i>Nostoc</i>	<i>Leptolyngbya</i>	<i>Nostoc</i>
Langmuir y Freundlich	qmax (mg/g)	11,72±0,91	17,59±1	52,33±3	53,33±1,46
	b (g/L)	0,006±0,0014	0,012±0,035	0,00713±0,009	0,00514±0,004
	r ² a	0,779	0,796	0,887	0,878

El modelo de absorción de agroquímicos en superficies biológicas y soluciones acuosas ha sido reportado en algunos estudios. Tsai y colaboradores (2005) señalan que la carga negativa de la superficie de las células interactúa con la propiedad catiónica que tienen los agroquímicos. Otras hipótesis propuestas para plantas sugieren la existencia de transportadores, vesículas y mecanismos de secuestro en las paredes celulares (Hawkes, 2013).

En otros estudios con metales pesados utilizando cepas de la misma colección se ha observado que la capacidad de retención aumenta hasta alcanzar una curva cóncava donde la biomasa alcanza un punto de saturación (Núñez 2012). En este caso no se alcanza con tanta precisión ese punto de saturación y algunos de los datos se desvían del ajuste matemático de Langmuir. La desviación de los datos obtenido según el ajuste de Langmuir y Freundlich representa la heterogeneidad de los sitios de unión en la superficie de la biomasa (Kumar *et al.* 2010).

La cepa *Nostoc* tiene una mayor capacidad de remoción del herbicida Paraquat® que la cepa *Leptolyngbya*, sin embargo ambas presentaron valores mayores que los reportados en otras cianobacterias como *Oscillatoria* (0,3 mg/g) (Kumar *et al.*2010) y capacidad similar a la encontrada utilizando hidrogeles de poliacrilamida y metilcelulosa (14.3 mg/g) (Aouada *et al.* 2009), pero menor a la reportada para cenizas (30mg/g) (Igwe *et al.* 2012) , carbón activado (116 mg/g) (Lerdsirivichai 2011) y materiales microsporosos (Rongchapo *et al.* 2013).

No se encontraron estudios relacionados con la remoción del herbicida Bromacil® utilizando cianobacterias, es la primera vez que se reporta para las cepas de esta colección la capacidad de remover estos herbicidas. Algunos estudios de los años 80 señalan la tolerancia de cepas de *Mastigocladus laminosus* y *Tolypothrix tenium* a concentraciones de 100 ppm and 500 ppm de agroquímicos del grupo de los uracilos (Khalil *et al.*1980), sin embargo no reportan si estas cepas puede remover o no el compuesto del medio.

Análisis de viabilidad celular mediante citometría flujo utilizando fluoresceína y clorofila

El análisis indica que para ambas cepas, conforme aumenta la concentración del herbicida Paraquat®, el porcentaje de células vivas disminuye significativamente utilizando el indicador fluoresceína (*Nostoc*: $gl=23$, $F=510.9$, $p<0.001$; *Leptolyngbya*: $gl=23$, $F=138.5$, $p<0.001$) (Fig. 17), por lo que se utilizó un análisis de contraste de Tukey-Kramer para determinar en cuales concentraciones se observaban estas diferencias. Para *Leptolyngbya* el menor porcentaje de células vivas se obtuvo cuando se utilizaron 285,70 mg/L de agroquímico (Cuadro 8), no se encontraron diferencias significativas entre el tratamiento control sin agroquímico y la concentración de 28,76 mg/L.

El menor porcentaje de células vivas de *Nostoc* se encontró en la máxima concentración (285,70 mg/L) se obtuvo cerca del 40% de eventos positivos (Cuadro 9). En este caso hay diferencias entre el tratamiento control sin herbicida

y la concentración de 28,76 mg/L. Para ambas cepas la dosis que afecta a la mitad de la población es de 144,69 mg/L. Según este indicador la cepa *Nostoc* es más sensible al agroquímico, ya que en bajas concentraciones se observa un menor porcentaje de eventos positivos en comparación a la cepa *Leptolyngbya*.

Por otro lado utilizando el indicador clorofila se observó que en ambas cepas, se mantuvo constante conforme aumentaba la concentración del herbicida Paraquat®, sin embargo a la concentración de 285,70 mg/L se observó una disminución significativa en comparación a los otros tratamientos (*Nostoc*: $gl=23$, $F=41.9$, $p<0.001$; *Leptolyngbya*: $gl=23$, $F=30.7$, $p<0.001$) (Fig. 17). Al analizar el resultado de la prueba de contraste de Tukey- Kramer, se encontró que no hay diferencias entre algunos tratamientos a lo largo del tiempo. Según este indicador, la dosis media en donde podemos encontrar el 50% de células vivas en *Nostoc* está en el rango de 244,69 mg/L y 285,70 mg/L, en la cepa *Leptolyngbya* este valor se encuentra a una concentración de 285,70 mg/L (Cuadro 9).

La disminución significativa de la clorofila en presencia de Paraquat® para ambas cepas solo se observó cuando se exponía la cepa al agroquímico comercial puro. A diferencia de los resultados obtenidos en este estudio, Prado y colaboradores (2011) encontraron una disminución significativa de la clorofila en células de *Chlamydomonas* conforme aumentaba la concentración del herbicida Paraquat®, tanto en la concentración en la biomasa como en la autofluorescencia, además plantean que la fluorescencia de la clorofila es un parámetro muy sensitivo. Resultados similares se han descrito para la cepa *Haematococcus* donde se encontró una disminución significativa de la clorofila después de 12 horas de exposición al herbicida utilizando concentraciones menores a las utilizadas en este estudio (Rioboo *et al.* 2012).

En plantas se ha observado un fenómeno similar a los resultados obtenidos con la clorofila en esta investigación. En plantas de frijol con deficiencia de magnesio se ha descrito cierta resistencia a las especies de oxígeno reactivas mediante la producción de enzimas y antioxidantes, la clorofila en estas plantas no disminuye significativamente en comparación con el tratamiento control

(Cakmak & Marschner *et al.* 1992). En otras plantas resistentes al Paraquat® se ha planteado la presencia de mecanismos de secuestro del agroquímico en el cloroplasto, esto provoca que la disminución de la clorofila sea un proceso más lento que lo observado en plantas no resistentes (Fuerst *et al.* 1985).

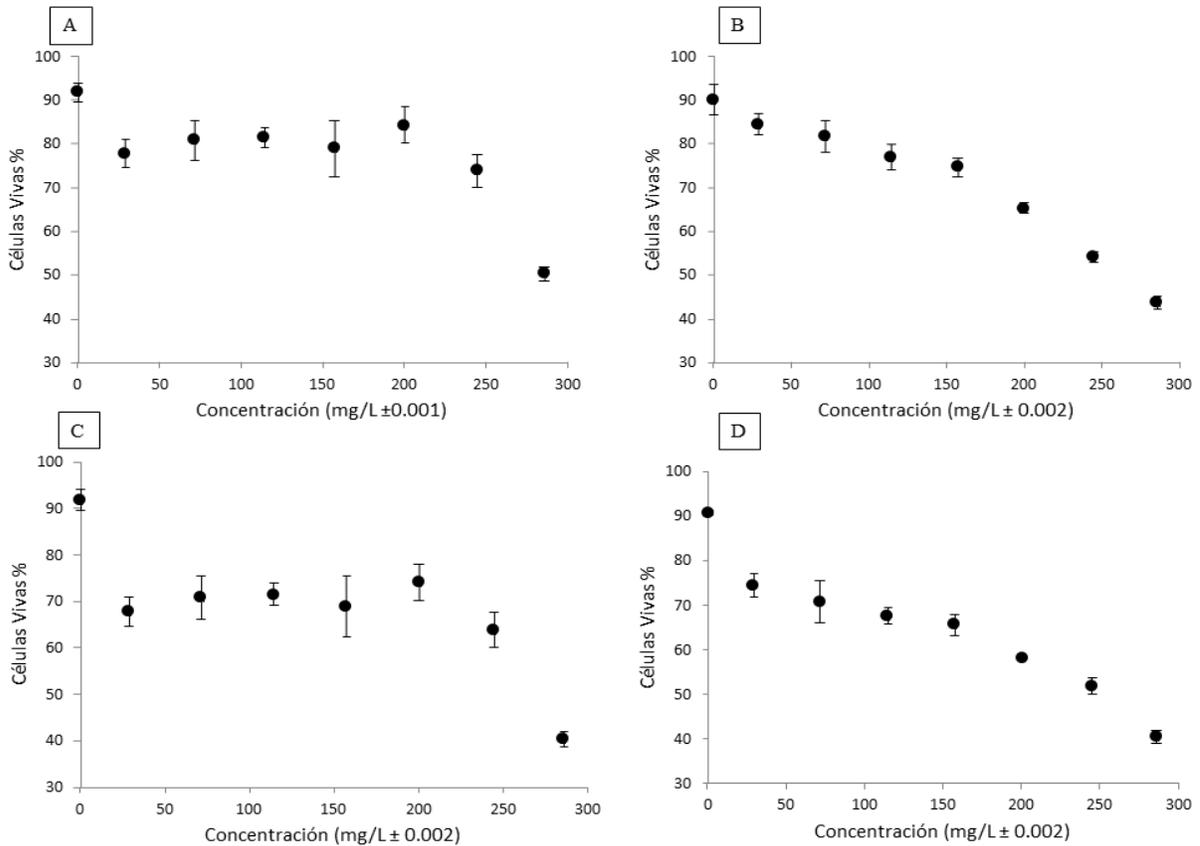


Figura 16. Porcentaje de células vivas según la concentración del herbicida Paraquat®. A. *Leptolyngbya* clorofila. B. *Leptolyngbya* fluoresceína. C. *Nostoc* clorofila. D. *Nostoc* fluoresceína.

Cuadro 8. Porcentaje de células vivas de la cepa *Leptolyngbya*, desviación estándar según los indicadores fluoresceína y clorofila en relación a la concentración del herbicida Paraquat®.

Tratamiento	Concentración (mg/L)	Fluoresceína		Clorofila	
		Porcentaje de Células vivas	Desviación estándar	Porcentaje de Células vivas	Desviación estándar
1	28,76	84,37 ^{a,b}	0,34	77,72 ^{a,b}	3,26
2	71,42	81,66 ^{b,c}	0,19	80,73 ^{a,b}	4,01
3	114,28	76,88 ^{c,d}	0,21	81,44 ^b	4,56
4	157,15	74,59 ^d	0,43	78,87 ^b	1,91
5	200,01	65,15 ^e	0,52	84,12 ^b	2,76
6	244,69	53,96 ^f	0,31	73,82 ^b	1,53
7	285,70	43,70 ^g	0,15	50,24 ^c	1,19
	Control negativo	89,94 ^a	0,09	91,70 ^a	2,19
	Control positivo	58,61	0,35	55,92	3,80

Las letras iguales indican similitud según Análisis de contraste de Tukey-Kramer ($q=3,46$).

Cuadro 9. Porcentaje de células vivas de la cepa Nostoc, desviación estándar según los indicadores fluoresceína y clorofila en relación a la concentración del herbicida Paraquat®.

Tratamiento	Concentración (mg/L)	Fluoresceína		Clorofila	
		Porcentaje de Células vivas	Desviación estándar	Porcentaje de Células vivas	Desviación estándar
1	28,76	74,4 ^b	1,25	77,72 ^b	3,14
2	71,42	70,82 ^c	1,06	70,73 ^b	4,63
3	114,28	67,33 ^d	1,68	71,44 ^b	2,28
4	157,15	65,7 ^d	1,32	68,87 ^b	3,38
5	200,01	58,67 ^e	1	74,11 ^b	4,01
6	244,69	51,46 ^f	1,26	63,82 ^b	3,76
7	285,70	40,34 ^g	0,46	40,24 ^c	1,65
	Control negativo	90,61 ^a	0,78	91,61 ^a	2,16
	Control positivo	57,21	0,39	57,21	0,39

Las letras iguales indican similitud según Análisis de contraste de Tukey-Kramer (q=3,46)

A diferencia de lo observado con el Paraquat®, los porcentajes de células vivas encontrados en ambas cepas no disminuye significativamente en relación a las concentraciones utilizadas de Bromacil®. No se observaron diferencias significativas en la cantidad de células vivas entre el tratamiento control y los

tratamientos para ninguna de las dos cepas utilizando la fluorescencia de la clorofila (*Leptolyngbya*: g/L= 5/12; F=1,02; p> 0,05 ; *Nostoc*: g/L= 5/12; F=2,10; p> 0,05). Por el contrario en ambos casos, el porcentaje de células vivas tuvo un leve aumento (Fig. 18)

La fluoresceína si disminuye conforme aumenta la concentración del agroquímico Bromacil®, sin embargo esta disminución no es significativa para ninguna de las dos cepas. En la cepa *Leptolyngbya*, el menor porcentaje de células vivas utilizando el indicador fluoresceína se obtuvo a una concentración de 400 mg/L, sin embargo en concentraciones más altas del agroquímico se observa porcentajes cercanos al 90% de células vivas (Cuadro 10). En todos los tratamientos se encontró un menor porcentaje de células vivas en comparación con el control, sin embargo no se encontraron diferencias significativas (g/L= 5/12; F=0,39; p> 0,05)

Este mismo comportamiento se observó en la cepa *Nostoc*, en donde el menor porcentaje de células vivas utilizando el indicador fluoresceína se observó en la concentración máxima utilizada 500 mg/L (Cuadro 11), sin embargo en las concentraciones más altas el porcentaje de células vivas es cercano al 90% por lo que es similar al tratamiento control. No se encontraron diferencias significativas entre el control y las diferentes concentraciones (g/L= 5/12; F=1,02; p> 0,05)

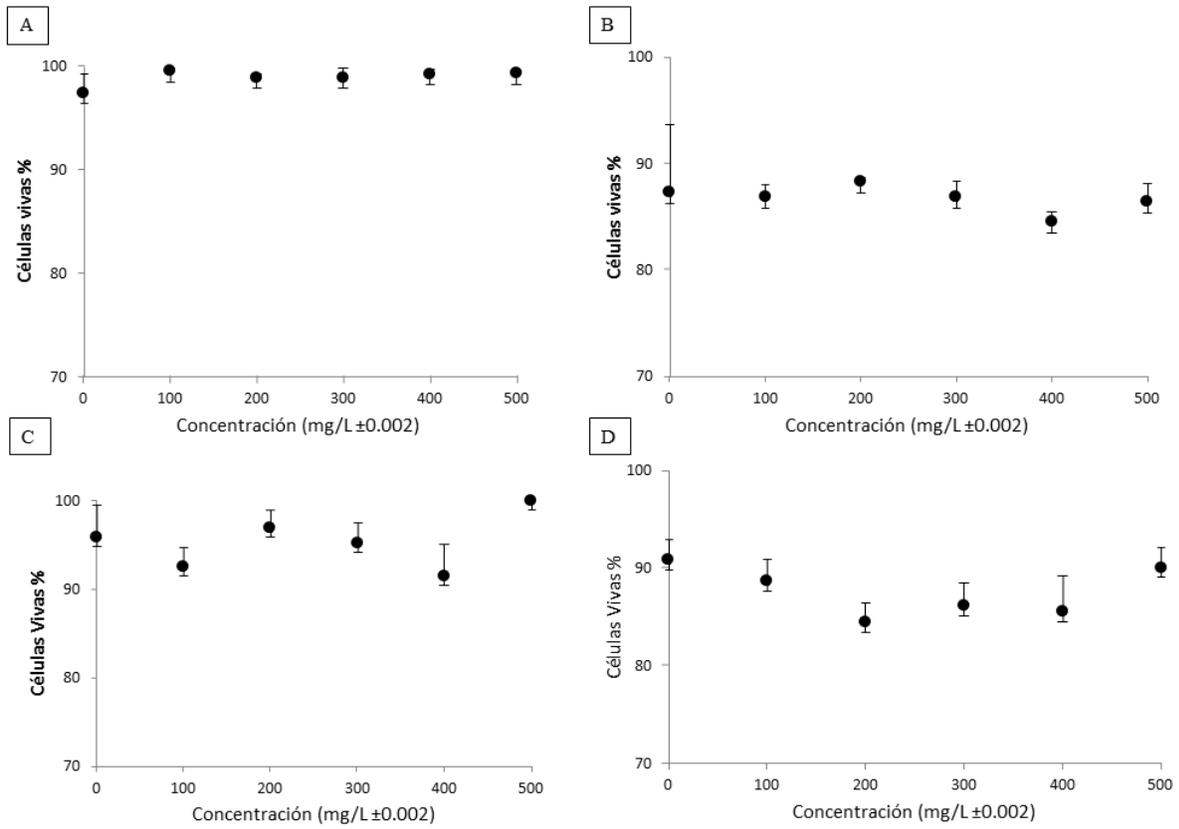


Figura 17. Porcentaje de células vivas según la concentración del herbicida Bromacil®. A. *Leptolyngbya* clorofila. B. *Leptolyngbya* fluoresceína. C. *Nostoc* clorofila. D. *Nostoc* fluoresceína

Cuadro 10. Porcentaje de células vivas de la cepa *Leptolyngbya*, desviación estándar según los indicadores fluoresceína y clorofila en relación a la concentración del herbicida Bromacil®.

Tratamiento	Concentración (mg/L)	Fluoresceína		Clorofila	
		Porcentaje de células vivas	Desviación estándar	Porcentaje de células vivas	Desviación estándar
1	500	91,03	0,33	99,30	0,19
2	400	88,51	0,41	99,29	0,48
3	300	89,13	0,28	98,90	0,89
4	200	83,86	0,41	98,94	0,37
5	100	90,69	0,48	99,53	0,22
	Control negativo	86,82	8,00	97,46	1,86

Cuadro 11. Porcentaje de células vivas de la cepa *Nostoc*, desviación estándar según los indicadores fluoresceína y clorofila en relación a la concentración del herbicida Bromacil®.

Tratamiento	Concentración (mg/L)	Fluoresceína		Clorofila	
		Porcentaje de células vivas	Desviación estándar	Porcentaje de células vivas	Desviación estándar
1	500	99,94	1,75	99,91	0,040
2	400	99,84	1,02	98,43	13,53
3	300	99,86	1,46	99,10	8,23
4	200	99,7	0,44	98,82	4,04
5	100	99,8	1,18	98,48	12,10
	Control negativo	97,0	6,33	95,79	3,67

Los filamentos de *Leptolygnbya* poseen una cubierta mucilaginosa que podría ser capaz de remover el agroquímico y a la vez proteger a las células de estrés oxidativo, lo que se ve reflejado en el aumento de la capacidad de remoción del herbicida Bromacil® y la cantidad tan baja de células afectadas tanto cuantificando clorofila como fluoresceína. El herbicida Paraquat® posee detergentes que van degradando las membranas por lo que la protección que esta le da a las células va disminuyendo conforme aumenta la concentración del mismo.

La tolerancia al Paraquat® se ha relacionado a organismos capaces de resistir situaciones de desecación, altas concentraciones de sal y fuertes intensidades luminosas (Lascano *et al.* 2012). Estas características son similares a los que enfrentan estas cepas de cianobacterias de ambientes termofílicos, con altas concentración de iones y situaciones de desecación. Además se ha reportado la presencia de regulación positiva en la síntesis de pigmentos y las

enzimas asociadas a la protección contra especies reactivas de oxígeno como superóxido dismutasa, ascorbato peroxidase, catalasa y glutathion reductasa (Muller *et al.* 2004).

En cepas mutantes de *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 con alta tolerancia al Paraquat® se ha encontrado altos niveles de actividad en la enzima catalasa y bajo nivel de ROS en comparación a cepas silvestres (Moirangthem *et al.* 2014). Por otro lado, análisis bioinformáticos del genoma y pruebas moleculares con mutantes de *Synechocystis* sp PCC Demu6803 tolerante a Paraquat®, sugieren la presencia de genes que codifican para diferentes subunidades de la enzima permeasa, la cual transporta al agroquímico fuera de la célula (Prosecka *et al.* 2009). Estos genes también se han encontrado en cianobacterias como *Synechococcus*, *Anabaena variabilis* y *Thermus thermophilus*.

En este estudio la cuantificación de la actividad de la fluoresceína es un mejor indicador de la viabilidad celular de las cianobacterias utilizando la citometría de flujo. Conforme aumenta la concentración del agroquímico se puede observar una disminución en la actividad de las enzimas esterases debido a la peroxidación de los ácidos grasos en las membranas y la presencia de especies reactivas de oxígeno (Muller *et al.* 2004).

Aunque no se pudo realizar la isoterma de absorción para el caso de las muestras tratadas con Diuron®, el experimento de las cianobacterias en las placas de Petri mostraron algunos resultados. Para ambas cepas el porcentaje de eventos positivos a diferencia de los resultados con los otros dos agroquímicos muestran una mayor toxicidad en concentraciones más bajas, a concentraciones intermedias se observa un aumento en el porcentaje y luego disminuye hasta casi el 80%. Tanto la clorofila como la fluoresceína tienen comportamientos similares, siendo la clorofila levemente mayor. En la cepa *Nostoc* se observa un menor porcentaje de células vivas, alrededor del 60% en la concentración mayor. En la Figura 19, se muestran los resultados del análisis de citometría en cada concentración. Estos resultados no fueron analizados estadísticamente pues solamente se tenía una réplica por concentración.

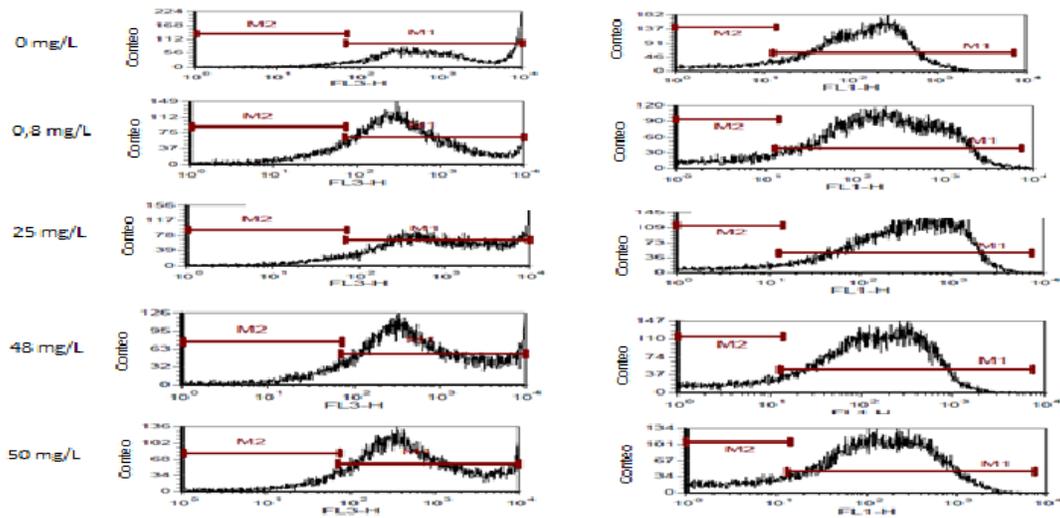


Figura 18. Resultados Análisis de Citometría de la cepa *Leptolyngbya* expuesta a diferentes concentraciones del herbicida Diuron.®. La concentración de 50 mg/L es la que se encuentra en la presentación comercial.

Dentro del grupo de bacterias, las cianobacterias de ambientes extremos se consideran como el grupo mejor adaptado, ya que pueden desarrollarse en ambientes hipersalinos y alcalinos (Margesin, 2001), soportar altas concentraciones de metales pesados, pH ácidos y tolerar la desecación (xerófilicas) (Horikoshi & Bull, 2001), son capaces de formar comunidades endolíticas en regiones desérticas (Rampelotto, 2013).

Algunas expresan ciertas proteínas en presencia de contaminantes como agroquímicos y mutagénicos (Ausc *et al.* 2011). Otras investigaciones demuestran que la biorremediación a altas temperaturas de hidrocarburos clorinados, como el agroquímico 2,4D, genera la mineralización del mismo (Michael *et al.* 1995). La presencia de lo que Leal y colaboradores (2015) llaman extremoenzimas es de gran importancia para adaptarse a condiciones físicas y químicas extremas lo que las hace útiles en aplicaciones industriales y biotecnológicas.

Cinética de Adsorción de la cepa *Leptolyngbya* expuesta al herbicida Paraquat®

La cinética de remoción del Paraquat® fue realizada con la cepa *Leptolyngbya* utilizando 200 mg/L del herbicida. Paraquat®. En la Figura 20 se muestra la variación de la concentración remanente del compuesto en función del tiempo. Se encontró que es una cinética de degradación de pseudo primer orden (Fig.21).

Las cinéticas químicas permiten explicar que tan rápido ocurren los procesos químicos y los factores que los afectan. Los sistemas de absorción en los sistemas naturales dependen de características físicas y químicas del absorbente y de las condiciones del sistema (Kumar 2006). Kumar y colaboradores (2005) plantean que las cinéticas más usadas para explicar los procesos de adsorción sólido/líquido son de pseudo primer orden o de pseudo segundo orden.

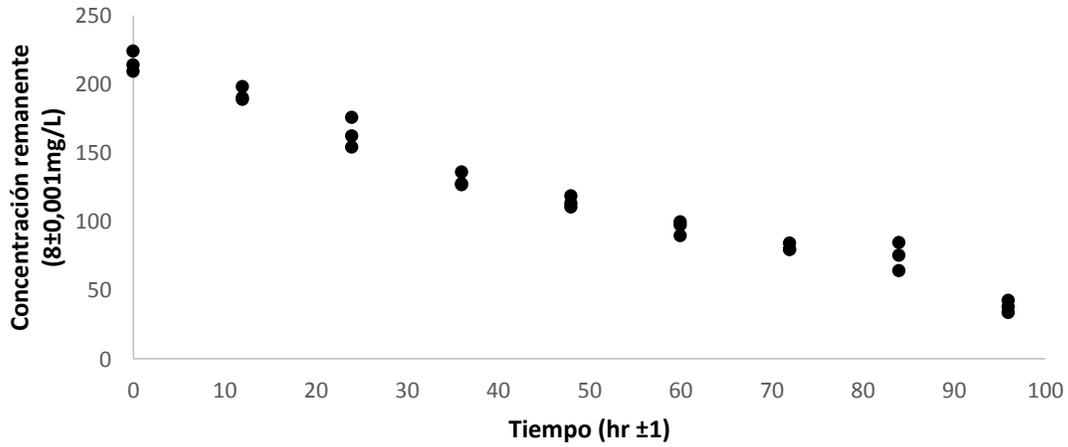


Figura 19. Variación de la concentración de Paraquat® en función del tiempo luego de la exposición a la cepa Leptolyngbya y su ajuste al modelo experimental.

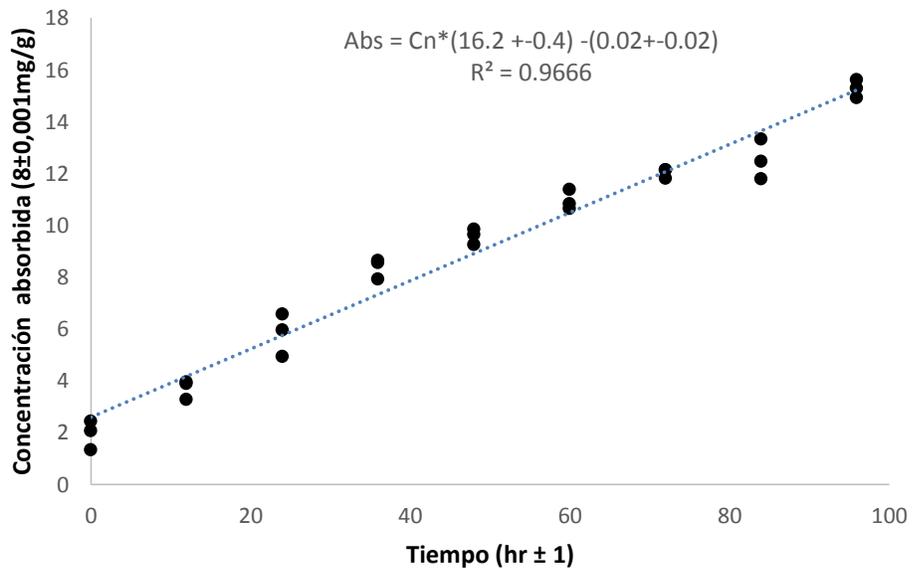


Figura 20. Variación de la concentración remanente del herbicida Paraquat® en relación al tiempo.

Este tipo de cinética de adsorción de agroquímicos se ha encontrado en otras investigaciones utilizando diversos bioabsorbentes. Tsai & Chen (2013) mostraron que la cinética de adsorción del Paraquat® en carbón activado es de pseudo primer orden, por otro lado Baup y colaboradores (2010) señalan que la biomasa inicial es un factor importante para determinar la tasa de remoción de agroquímicos, debido a la disponibilidad de sitios de unión en la membrana e internalización dentro de las células.

Fluorescencia ultravioleta

Las células de las cianobacterias que no estuvieron en contacto con los herbicidas o se expusieron a bajas concentraciones se observaban de color rojo, lo que indica la presencia de pigmentos fotosintéticos. Roldán y colaboradores (2014) estudiaron cianobacterias endolíticas del desierto de Atacama y observaron dos ámbitos distintos de emisión de señal de fluorescencia. Los agregados celulares emiten fluorescencia roja cuando hay presencia de pigmentos fotosintéticos autofluorescentes (PAF) tales como la clorofila a y las ficobiliproteínas. La emisión de color verde (GAF) sugiere la degradación de los pigmentos y el daño celular.

Se observaron las células de todas las concentraciones de los tres herbicidas sin embargo solamente a concentraciones cercanas a los 285 mg/L se observaron cambios en la fluorescencia de la clorofila en las células de las cianobacterias. En la cepa *Nostoc* expuesta al herbicida Paraquat®, se observa una reducción en el número de células en las colonias y cambio en la coloración de las células, sin embargo la cubierta mucilaginoso se mantiene (Fig.22). En la cepa *Leptolyngbya* expuesta al Paraquat® se observaron células de color amarillo y rojo muy tenue, lo que es indicador de la pérdida de pigmentos como la clorofila (Roldan *et al.* 2014) (Fig.23). Es importante considerar que no todas las células del mismo filamento son afectadas de igual manera, pues en un mismo filamento se observan diferentes colores.

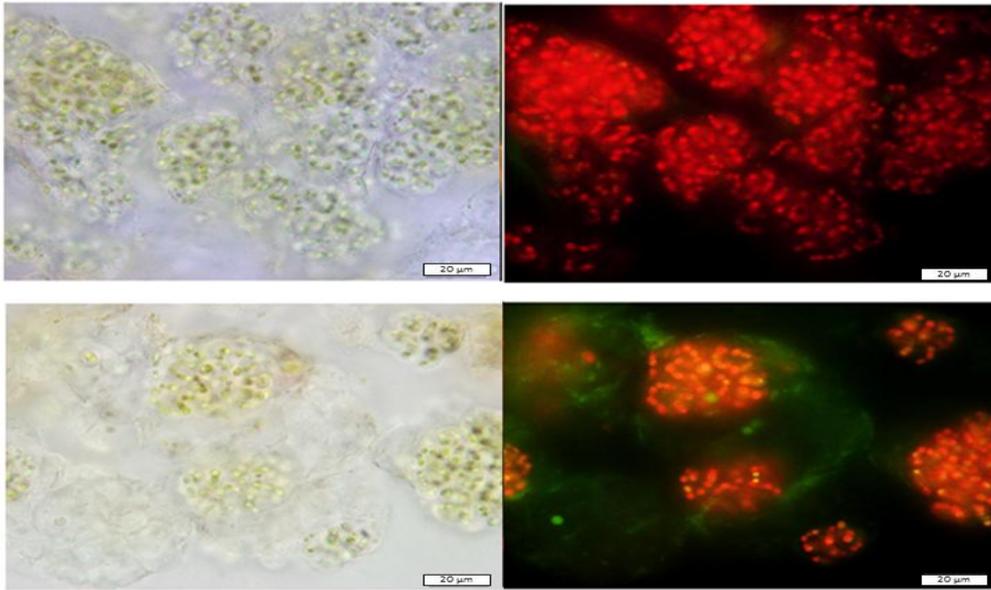


Figura 21. Imágenes de microscopio de luz y ultravioleta de la cepa *Nostoc* después de estar en contacto durante 96 horas con el herbicida Paraquat®. Las imágenes superiores corresponden al tratamiento control.

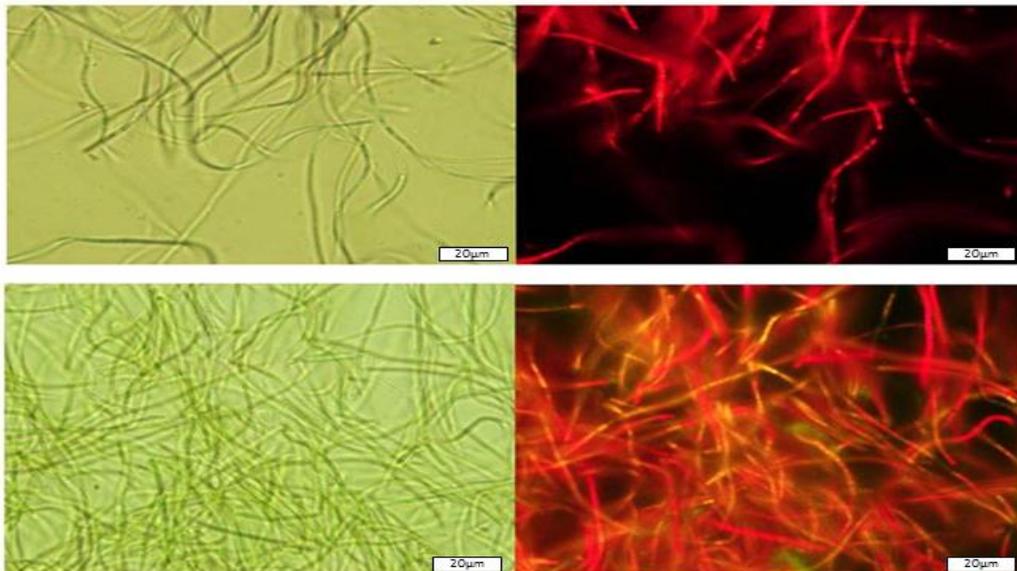


Figura 22. . Imágenes de microscopio de luz y ultravioleta de la cepa *Leptolyngbya* después de estar en contacto durante 96 horas con el herbicida Paraquat®. Las imágenes superiores corresponden al tratamiento control.

En cuanto a las cepas expuestas a Bromacil®, se encontraron resultados similares a los obtenidos con el Paraquat®. En la cepa *Nostoc* se observaron células de color rosado en el tratamiento con 500 mg/L. En la imagen de luz se observa el mucilago de las células vacío, protegiendo las células que se encuentran en el interior (Fig. 24). En la cepa *Leptolyngbya* se observan algunas células de los filamentos de color amarillo, rosado y anaranjado en lugar del rojo que indica clorofila sana (Fig. 25).

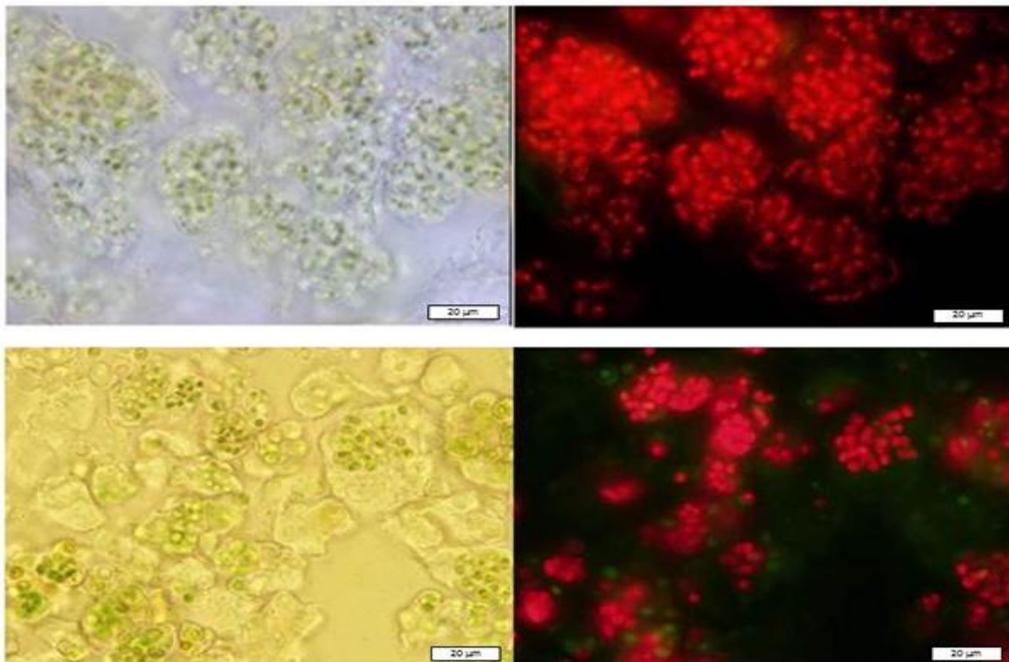


Figura 23 Imágenes de microscopio de luz y ultravioleta de la cepa *Nostoc* después de estar en contacto durante 96 horas con el herbicida Bromacil®. Las imágenes superiores corresponden al tratamiento control.

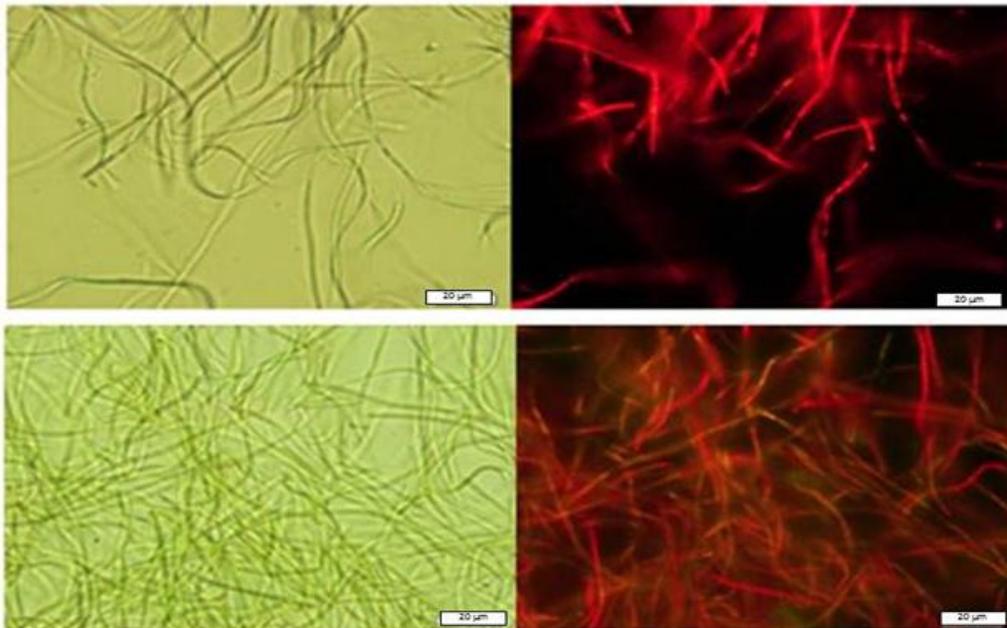


Figura 24. Imágenes de microscopio de luz y ultravioleta de la cepa *Leptolyngbya* después de estar en contacto durante 96 horas con el herbicida Bromacil®. Las imágenes superiores corresponden al tratamiento control.

Las cepas que fueron expuestas a Diuron® también mostraron efectos negativos, específicamente a concentraciones cercanas a los 50 mg/L (Fig. 26). En la cepa *Leptolyngbya* se observan células dentro de los filamentos de color anarajando. En *Nostoc* se muestra un color rojo poco intenso y células de color verde (Fig. 27).

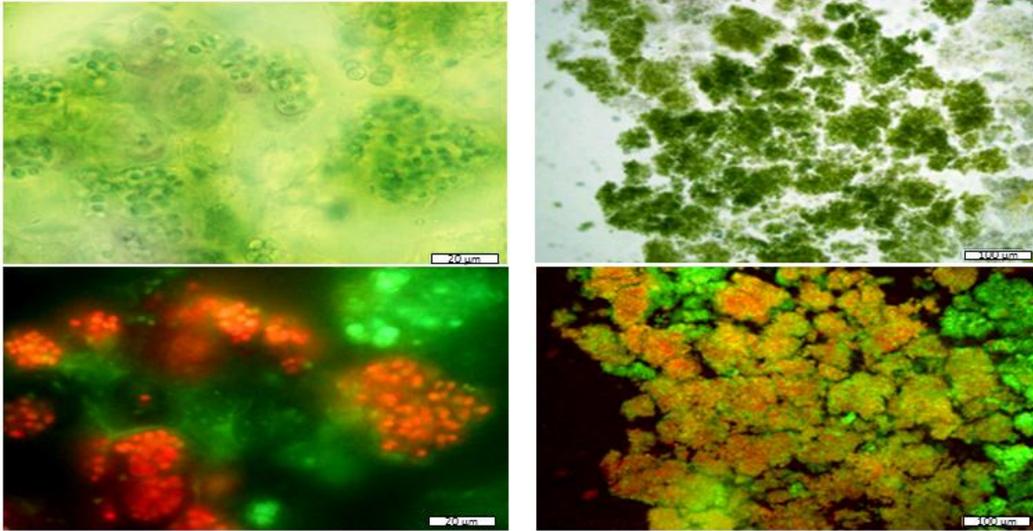


Figura 25. Imágenes de microscopio de luz y ultravioleta de la cepa *Nostoc* después de estar en contacto durante 96 horas con el herbicida Diuron®. Las imágenes superiores corresponden al tratamiento control.

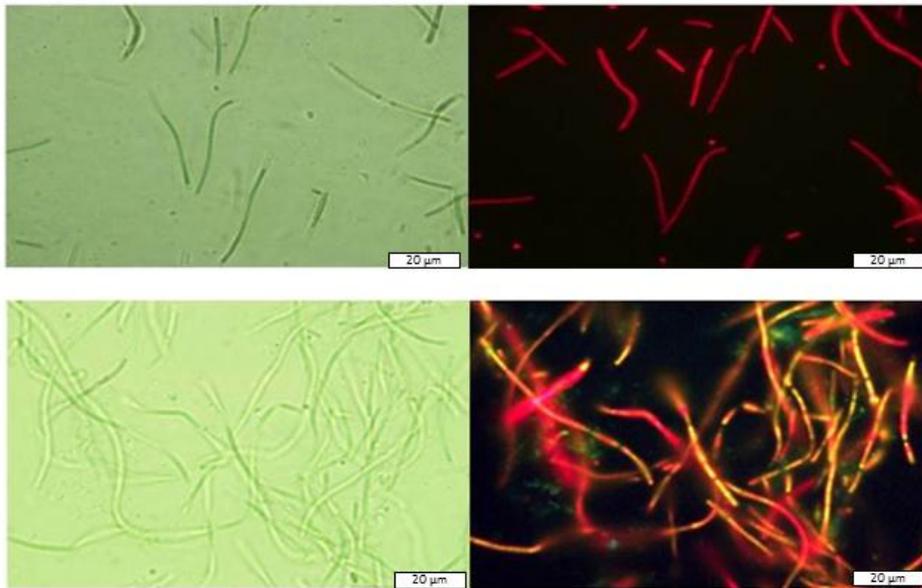


Figura 26. Imágenes de microscopio de luz y ultravioleta de la cepa *Leptolyngbya* después de estar en contacto durante 96 horas con el herbicida Diuron. Las imágenes superiores corresponden al tratamiento control.

Según Zheng y colaboradores (2013), la fluorescencia ultravioleta es utilizada como criterio morfológico para identificar el proceso de muerte celular y viabilidad en células vegetativas, hormogonios, heterocistes y acinetos. Frankling y colaboradores (2012) señalan que la pérdida de pigmentos fluorescentes se correlaciona con una reducción de la eficiencia del fotosistema II, un incremento de la abundancia de productos de oxidación de la clorofila como metoxiclorofila a e hidroxiclorofila y un aumento de la permeabilidad de la membrana. Además, puede ser indicador de senescencia (Airs *et al.* 2014).

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Las suspensiones celulares de las cepas *Leptolyngbya* 7M M04 y *Nostoc* M03 son capaces de remover los herbicidas Paraquat® y Bromacil®. La cepa *Nostoc* tiene una mayor capacidad de remoción sin embargo no existen diferencias significativas entre el valor de q_{max} entre ambas cepas. El valor de q_{max} en la remoción del herbicida Paraquat® obtenido en las cepas de cianobacterias es mayor al reportado en la literatura para algunas cepas de cianobacterias, sin embargo es menor en comparación con otros adsorbentes no biológicos. Es importante continuar con las investigaciones de remoción de agroquímicos utilizando otras cepas de la colección.

El Paraquat® afecta al fotosistema II y produce una letalidad mayor que el Bromacil®. Esto se puede atribuir a la alta toxicidad del mismo y a los detergentes que coadyudan a la desintegración de la membrana. La remoción del agroquímico del medio se alcanza alrededor de las 96 h de exposición con la cianobacteria.

La citometría de flujo es una técnica que permite cuantificar la viabilidad de cada célula lo que ayuda a medir el efecto de los compuestos tóxicos sobre cada individuo y no sobre todo el cultivo como se hace con otras técnicas como medición de clorofila utilizando espectrofotometría. Además permite cuantificar la viabilidad de cada célula por separado, sin embargo muestra una fotografía del momento y no permite cuantificar el daño de las mismas células a largo del tiempo. La fluorescencia es una técnica cualitativa que ayuda a visualizar el estado de las células según los diferentes tipos de pigmento, es útil si se tiene un cultivo control con el cual comparar.

En este estudio solamente se cuantificó la concentración del agroquímico remanente en el medio, sin embargo para determinar si en realidad existe un proceso de internalización del compuesto se debe hacer una lisis celular y cuantificar la concentración dentro de las células. Además se propone la utilización de otros agroquímicos y cepas que permitan validar los resultados.

Debido a que los resultados de la isoterma no se ajustan completamente al modelo de Langmuir, se propone el aumento de las réplicas y el tiempo de exposición al agroquímico para mejorar el ajuste a los modelos. Para próximas investigaciones se debe hacer varios experimentos para la cinética utilizando diferentes concentraciones iniciales de biomasa, además de evaluar el efecto del pH que no fue posible en esta investigación debido a la cantidad de biomasa disponible.

Las cepas de cianobacterias utilizadas en esta investigación tienen potencial para ser utilizadas en sistemas de biorremediación donde se encuentren agroquímicos, ya que su alta tolerancia a estos compuestos y su capacidad de remoción sería de utilidad en dichos sistemas. Es importante para futuras investigaciones incluir el estudio de genes relacionados con la degradación de agroquímicos y tolerancia a estos compuestos. Además del planteamiento de sistemas de escalamiento que permitan obtener altas cantidades de biomasa.

REFERENCIAS

- Acosta, E. 2008. Impacto ecológico del monocultivo piñero. *Ambientico*, 177: 9-10
- Aguirre, D. & D. Arboleda. 2008. Impacto ambiental del cultivo de piña y características de éste (caso Siquirres). *Ambientico*. 177: 5-8.
- Airs, R., B. Temperton, C. Sambles, G. Farnham, S Skill & C. Llewellyn. 2014. Chlorophyll f and chlorophyll d are produced in the cyanobacterium *Chlorogloeopsis fritschii* when cultured under natural light and near-infrared radiation. *Febs Letter*. 588: 3770–3777
- Allakhverdiev, S. V. Kreslavski, R. Voloshin, et al. 2016. Chlorophylls d and f and their role in primary photosynthetic processes of cyanobacteria. *Biochemistry (Moscow)*: 81: 201–212
- Aouada, F. Z. Pan, W. Orts & L. Mattoso. 2009. Removal of Paraquat® pesticide from aqueous solutions using a novel adsorbent material based on polyacrylamide and methylcellulose hydrogels. *Applied Polymer*. 114: 2139-2148
- BD Biosciences. BD FACSCalibur Instructions For Use. 2007. Disponible en https://www.bdbiosciences.com/documents/BD_FACSCalibur_instructions.pdf
- BD Biosciences. Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide. 2002. Disponible en <http://www.bu.edu/flow-cytometry/files/2010/10/BD-Flow-Cytom-Learning-Guide.pdf>
- Behrent, L., A. Brejnrod, M. Schliep, S. S. Sørensen, A. Larkum & M. Kühl. 2015. Chlorophyll f-driven photosynthesis in a cavernous cyanobacterium. *The ISME Journal*. 9: 2108 2111
- Cabrera. 2013. Informe del Estado de la Nación. Disponible en <http://www.estadonacion.or.cr/estado-educacion/educacion-informe-ultimo>

- Cáceres, A. M. Megharaj & R. Naidu. 2012. Biodegradation of the Pesticide Fenamiphos by Ten Different Species of Green Algae and Cyanobacteria. *Current Microbiology*. 57:643–646
- CANAPEP. 2016. Gobierno contradice informe de Oxfam: “piña cumple estándares de calidad. Disponible en <https://www.crhoy.com>
- Castillo LE., Ruepert C., Ballesteros D., Brenes C., Vargas S., Alvarez B., Gunnarsson J. 2011. Environmental changes and associated agrochemical impacts in a tropical coastal lagoon in the Caribbean area of Costa Rica. Deltanet Conference, Saint Carles de la Rapita, Catalonia, Spain, 6-10 June
- Cuadrado, G. 2008. Legalización de la contaminación de aguas para consumo humano (caso del diurón y el Bromacil®). *Ambientico* 177: 11-12
- De Philippis, R., G. Colica & E. Micheletti. 2011. Exopolysaccharide-producing cyanobacteria in heavy metal removal from water: molecular basis and practical applicability of the biosorption process. *Appl Microbiol Biotechnol*, 92:697–708
- Deloya, A. 2012. Tratamiento de desechos del cianuro por biorremediación. *Tecnología en Marcha*, 25:61-72
- Denton, D., S. Nicolson & S. Kumar. 2011. Cell death by autophagy: facts and apparent artefacts. *Cell Death Differ*. 19: 87–95
- Di Bernardo Dantas, A., C. Paschoalato. M. Martinez, R. Ballejo & L. Di Bernardo. 2011. Removal of Diuron® and hexazinone from guarany aquifer groundwater. *Braz. J. Chem. Eng.* 28: 415-424
- Dijk, M., G. Gregori, H. Hoogveld, et al. 2010. Optimizing the setup of a flow cytometric cell sorter for efficient quantitative sorting of long filamentous cyanobacteria. *Cytometry Part A*. 77: 911-924

- Du, Y., J. Ye, L. u, et al. 2017. Physiological effects and toxin release in *Microcystis aeruginosa* and *Microcystis viridis* exposed to herbicide fenoxaprop-p-ethyl. *Environmental Science and Pollution Research*. 24: 7752–7763
- Dubey, S., J. Dubey, S. Mehra, et al. 2013. A. Potential use of cyanobacterial species in bioremediation of industrial effluents. *Afr J Biotechnol*.10:1125–1132.
- Echeverría, S., F. Mena, M. Pinnock, C. Ruepert, K. Solano, E. de la Cruz, B. Campos, J. Sánchez, S. Lacorte & C. Barata. 2012. Environmental hazards of pesticides from pineapple crop production in the Río Jiménez watershed (Caribbean Coast, Costa Rica). *Science of The Total Environment*, 440: 106-114
- Echeverría, S., F. Mena, M. Pinnock, et al. 2012. Environmental hazards of pesticides from pineapple crop production in the Río Jiménez watershed (Caribbean Coast, Costa Rica). *Science of The Total Environment*. 440: 106–114
- Forlani, G., M. Pavan, M. Gramek, P. Kafarski & J. Lipok. 2008. Biochemical Bases for a Widespread Tolerance of Cyanobacteria to the Phosphonate Herbicide Glyphosate. *Plant Cell Physiol*, 49: 443–456
- Fournier, M., S. Echeverría, F. Mena, et al. 2017. Risk assessment of agriculture impact on the Frío River watershed and Caño Negro Ramsar wetland, Costa Rica. *Environmental Science and Pollution Research*: 1–13
- Franklin D., R. Airs, M. Fernandes, T. Bell, R. Bongaerts, J. Berges & G. Malin. 2012. Identification of senescence and death in *Emiliana huxleyi* and *Thalassiosira pseudonana*: Cell staining, chlorophyll alterations, and dimethylsulfoniopropionate(DMSP) metabolism. *Limnol. Oceanogr*. 57: 305-317.

- Franklin, N., M. , Adams, M.J. Stauber, et al. 2001. Development of an improved rapid enzyme inhibition bioassay with marine and freshwater microalgae using flow cytometry. *Arch Environ Contam Toxicol.* 40:469-80.
- Franqueira, D., A. Cid, E. Torres, et al. 1999. A Comparison of the Relative Sensitivity of Structural and Functional Cellular Responses in the Alga *Chlamydomonas eugametos* Exposed to the Herbicide Paraquat®. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology.* 36: 264–269
- Fuerst, E., H. Nakatani, A. Dodge, et al. 1985. Paraquat® resistance in conyza. *Plant Physiol.* 77:984-9.
- Gadd, G. 2009. Biosorption: critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment. *J Chem Technol Biotechnol,* 84: 13–28
- Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2017. *AlgaeBase.* World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 18 July 2017.
- Hadjoudja, S., V. Deluchat, J. Lenain, A. Le Jeuna, & M. Baudu. 2009. Short term copper toxicity on *Microcystis aeruginosa* And *Chlorella vulgaris* using flow cytometry. *Aquatic Toxicology* 94: 255–264
- Hattab, M. & A. Ghaly. 2012. Disposal and Treatment Methods for Pesticide Containing Wastewaters: Critical Review and Comparative Analysis. *Journal of Environmental Protection.* 3: 431-453
- Hawkes, T. 2013. Mechanisms of resistance to Paraquat® in plants. *Pest Management Science.*
- Henrique, P. 2013. Extremophiles and Extreme Environments. *Life (Basel).* 3: 482–485
- Herrero, A. 2008. *The Cyanobacteria: Molecular Biology, Genomics, and Evolution* (ed). Norkfold. UK. 474p.

- Hohmann, M. & R. Blankenship. 2011. Evolution of photosynthesis. *Annu. Rev.Plant. Biol.* 62:515-548
- Hyka, P., S. Lickova, P. Prilbyl, et al. 2012. Flow cytometry for the development of biotechnological processes with microalgae. *Biotechnology Advances.* 31: 2–16
- Ibrahim, W. M. aram, R. El-Shahat, et al. 2014. Biodegradation and Utilization of Organophosphorus Pesticide Malathion by Cyanobacteria. *Biomed Res Int.* 2014; 2014: 392682.
- Igwe, J., F. Nwadike & A. Abia. 2012. Kinetics and Equilibrium Isotherms of Pesticides Adsorption onto Bioler Fly Ash. *Terrestrial and Aquatic Environmental Toxicology.* 6:21-29
- INCAE. 1997. La Industria de la Piña en Costa Rica. Análisis de Sostenibilidad. Disponible en <http://www.incae.edu/es/clacds/publicaciones/pdf/cen707.pdf>
- INCAE. 2017. La Industria de la Piña en Costa Rica. Análisis de Sostenibilidad. Disponible en <http://www.incae.edu>
- Informe del Estado de la Nación. 2010. Disponible en http://www.estadonacion.or.cr/files/biblioteca_virtual/017/Lebendiker_Marc_elo_y_Petry_Petra_El_emprendedurismo_en_Costa_Rica.pdf
- Ingersen, W. 2012. Life cycle assessment of fresh pineapple from Costa Rica. *Journal of Cleaner Production.* 35: 152–163
- Instituto de Acueductos y Alcantarillados (AyA). La Nación. 2016. Disponible en http://www.nacion.com/nacional/salud-publica/AyA-herbicida-nacientes-San-Carlos_0_1555444534.html
- Ischebeck, T., A. Zbierzak, M. Kanwischer & P. Dörmann. 2006. A salvage pathway for phytol metabolism in Arabidopsis. *J. Biol. Chem.*, 281: 2470–2477

- Johnson, J. 2006. The Manganese-calcium oxide cluster of Photosystem II and its assimilation by the Cyanobacteria. Disponible en <http://www.chm.bris.ac.uk/motm/oec/motm.htm>
- Keeling, P. 2010. The endosymbiotic origin, diversification and fate of plastids. *Philosophical Transactions of The Royal Society B.* 365: 729–748.
- Khalil, K., Chaporkar, C.B. and Gangwane, L.V. 1980. Tolerance of bluegreen algae to herbicides. In: *Proc. Natl. Workshop on Algal Systems.* Ind. Soc. Biotech. IIT
- Komarek, J., J. Kastovský, J. Mares, et al. 2014. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. *Preslia* 86: 295–335
- Kumar, D., B. Prakash, L. Pandey & J. Gaur. 2010. Sorption of Paraquat® and 2, 4-D by an *Oscillatoria* sp.-dominated cyanobacterial mat. *Appl Biochem Biotechnol.* 160: 2475-2485
- Kumar, D. B. Prakash, L. Pandev & J. Gaur. 2010. Sorption of Paraquat® and 2,4-D by an *Oscillatoria* sp.-dominated cyanobacterial mat. *Appl Biochem Biotechnol.* 160:2475-85.
- Laflamme, C., D. Verreault, S. Lavigne, L. Trudel, J. Ho & C. Duchaine. 2005. Autofluorescence as a viability marker for detection of bacterial spores, *Front. Biosci.* 10: 1647-1653.
- Lascano, R., N. Muñoz, G. Robert, M. Rodriguez, et al. 2012. Paraquat®: An Oxidative Stress Inducer. *Agricultural and Biological Sciences : Herbicides - Properties, Synthesis and Control of Weeds.* Mohammed Naguib Abd El-Ghany. DOI: 10.5772/32590
- Latour D., Sabido O., Salencon M-J and Giraudet H., 2004. Dynamics and metabolic activity of the benthic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in the Grangent reservoir (France). *Journal of Plankton Research.* 26:719-726

- Leal, G., D. Ferreira & A. Vermelho. 2015. Marine Extremophiles: A Source of Hydrolases for Biotechnological Applications. *Mar Drugs*. 13: 1925–1965.
- Lee, R. 2008. *Phycology* (4 ed). Cambridge University Press.
- Lerdsirivichai, C. 2011. Membrane Technology Based Hybrid System to Remove Paraquat from Agricultural Run-Off Water. A thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Engineering in Environment Engineering and Management. Asian Institute of Technology. Thailand.
- Linde, S., S. Gee, K. Goh, J. Hsu, B. Hammock, T. Barry & D. Weaver. 1996. Regulatory Application of ELISA: Compliance Monitoring of Bromacil in Soil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 57:264-269
- Ma, J., R. Zheng, L. Xu, S. Wang. 2002. Differential Sensitivity of Two Green Algae, *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa*, to 12 Pesticides. *Ecotoxicology and Environmental Safety*: 57-61
- Maqbool, Z., S. Hussain, M. Imran, et al. 2016. Perspectives of using fungi as bioresource for bioremediation of pesticides in the environment: a critical review. *Environmental Science and Pollution Research*. 23: 16904–16925
- Margesin, R. & F. Schinner. 2001. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 56: 650–663
- Martin, W., S. Garg & V. Zimorski. 2015. Endosymbiotic theories for eukaryote origin. *Philosophical Transactions of The Royal Society B*. 370: 1-8
- Michel FC Jr, Adinarayana Reddy C, Forney LJ (1995) Microbial degradation and humification of the lawn care pesticide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid during the composting of yard trimmings. *Appl Environ Microbiol* 61:2566–2571

- Misra, R., S. Satyanarayan & N. Potle. 2013. Treatment of agrochemical/Pesticide Wastewater by Coagulation/Flocculation Process. *International Journal of Chemical and Physical Sciences IJPCS*. 2: 39-51
- Moirangthem ,D, S. Bhattacharya, K. Stensjö, P. Lindblad & J. Bhattacharya. 2014. A high constitutive catalase activity confers resistance to methyl viologen-promoted oxidative stress in a mutant of the cyanobacterium *Nostoc punctiforme* ATCC 29133. *Appl Microbiol Biotechnol*. 98:3809-18
- Molina, R., I. Pariente. L. Rodríguez, et al. 2014. Treatment of an agrochemical wastewater by combined coagulation and Fenton oxidation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 89: 1189–1196
- Morales, S. 2008. Diversidad Morfológica y Posición filogenética de cianobacterias encontradas en fuentes termales y volcanes de Costa Rica. Tesis para optar por el grado de Magíster Scientiae en Microbiología, Universidad de Costa Rica.
- Nolla, H. Basic Principles in Flow Cytometry. University of California, Berkeley. Disponible en <http://flowcytometry.berkeley.edu/pdfs/Basic%20Flow%20Cytometry.pdf>
- Núñez, J. 2012. Evaluación de la capacidad de retención de Cu²⁺, Zn²⁺ y Al³⁺ de cianobacterias para su recuperación de aguas residuales. Tesis para optar por el grado de Licenciatura en Química, Universidad de Costa Rica.
- Núñez, R. 2007. Técnicas In vitro para la biorremediación de Cromo y Plomo. Informe para optar por el grado de bachiller en Ingeniería en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica.
- Oxfam. 2016 Sweet Fruit, Bitter Truth. German Supermarkets´responsibility for inhuman conditions which prevail in the banana and pineapple industries in Costa Rica and Ecuador. Disponible en <https://www.oxfam.de/system/files/20160531-oxfam-sweet-fruit-bitter-truth-en.pdf>

- Oxidative Stress in *Synechococcus* sp. Strain PCC 7942: Various Mechanisms for H₂O₂ Detoxification with Different Physiological Roles. *J. Bacteriol.* 12 3654-3660
- Parkar, D. R. Jadhav & M. Pimpliskar. 2017. Marine bacterial extracellular polycaccharides: A review. *Journal of Coastal Life Medicine.*
- Perelman, A., A. Uzan, D. Hacoheh & R. Scharz. 2002.
- Prado R, García R, Rioboo C, Herrero C, et al. 2009. Comparison of the sensitivity of different toxicity test endpoints in a microalga exposed to the herbicide Paraquat®. *Environ Int* 35:240– 247
- Prado, R., Rioboo, C. C. Herrero, et al. 2011. Characterization of cell response in *Chlamydomonas moewusii* cultures exposed to the herbicide Paraquat®: Induction of chlorosis. *Aquat Toxicol.* 102:10-17.
- Price B. & R. Bay. 2012. Marine bacteria in deep Arctic and Antarctic ice cores: a proxy for evolution in oceans over 300 million generations. *Biogeosciences Discuss.* 9:6535–6577.
- PROCOMER. 2016. PROCOMER analiza oportunidades para exportar agroquímicos a Nicaragua. Disponible en <http://www.procomer.com>
- Prosecka, J., A. Orloy, Y. Fantin, et al. 2009. A novel ATP-binding cassette transporter is responsible for resistance to viologen herbicides in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEBS Journal* 276: 4001–4011
- Ramírez, F; Bravo, V; de la Cruz, E. 2012. Importación y Uso de Plaguicidas en Costa Rica: período 2006-2012. Informe Área Diagnóstico, Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas. Universidad Nacional. Heredia, Costa Rica.
- Raven, J. & J. Allen. 2003. Genomics and chloroplast evolution: what did cyanobacteria do for plants? *Genome Biology.* 4: 209.

- Reglamento de Vertido y Reúso de Aguas Residuales.2007. Disponible en <http://www.serquimsa.com/wp-content/uploads/2012/09/Decreto-No.-33601-MINAE-S.pdf>
- REPCar. 2011. Experiencias Exitosas para Reducir el Impacto de la Agricultura sobre los Ecosistemas Costeros. Reduciendo el Escurrimiento de Plaguicidas al Mar Caribe.
- Rice, K. & W. Bayles. 2008. Molecular control of bacterial death and lysis. *Microbiol Mol Biol Rev.* 72: 85–10
- Rioboo, C., O. Gonzalez, J. Abalde, et al. 2011. Flow cytometric analysis of the encystment process induced by Paraquat® exposure in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *European Journal of Phycology.* 46
- Rippka R, J. Deruelles, J. Waterbury, M. Herdman & R. Stanier. 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J Gen Microbio* 111 : 1 -61
- Roldán, M., C. Ascaso & J. Wierzchos. 2014. Fluorescent fingerprints of endolithic phototrophic cyanobacteria living within halite rocks in the Atacama Desert. *FEMS Microbiol Ecol.* 90:2 351-366
- Roldán, M., F. Thomas, S. Castel, A. Quesada & M. Hernández-Mariné. 2004. Non invasive pigment identification in living phototrophic biofilms by confocal imaging spectrofluorometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 3745-3750.
- Ruepert, C., L. Castillo, V. Bravo & J. Fallas. 2005. Vulnerabilidad de las aguas subterráneas a la contaminación por plaguicidas en Costa Rica. Instituto Regional de Estudios en Toxicología (IRET), Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.
- Ruggiero, M., D. Gordon, T. Orrell, N. Baill et al. 2015. Correction: A Higher Level Classification of All Living Organisms. *Plos One* 10(6): e0130114.

- Sannino, F., M. Iorio, A. De Martino, M. Pucci, C. Brown & R. Capasso. 2008. Remediation of waters contaminated with ionic herbicides by sorption on polymeric. *Water Res.* 42:643-652
- Sarlak, N. A. Taherifar & F. Salehi. 2014. Synthesis of Nanopesticides by Encapsulating Pesticide Nanoparticles Using Functionalized Carbon Nanotubes and Application of New Nanocomposite for Plant Disease Treatment. *Journal of Agricultural Food Chemistry.* 62: 4833–4838
- Semanario Universidad. 2009. Expansión piñera entre principales amenazas: Lanza voz de alerta por Humedal Caño Negro. Disponible en <http://semanariouniversidad.ucr.cr/pais/expansin-piera-entre-principales-amenazas-lanza-voz-de-alerta-por-humedal-caon-negro/>
- Semanario Universidad. 2014. Estudio sobre agricultura, salud y ambiente: Plaguicida usado en piña presente en Humedal Térraba-Sierpe. Disponible en <http://semanariouniversidad.ucr.cr/suplementos/crisol/estudio-sobre-agricultura-salud-y-ambiente-plaguicida-usado-en-pia-presente-en-humedal-trraba-sierpe/>
- Singh, D., K. Nadda, S. Garg. 2011. Chlorpyrifos degradation by the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PUPCCC 64. *Environ Sci Pollut Res Int.* 18:1351-9.
- Singh, S., H. Miller & B. Montgomery .2013 .Temporal dynamics of changes in reactive oxygen species (ROS) levels and cellular morphology are coordinated during complementary chromatic acclimation in *Fremyella diplosiphon* . *Photosynthesis Research.* 118: 95– 104 .
- Straüber, H. & S. Müller. 2010. Viability states of bacteria--specific mechanisms of selected probes. *Cytometry A.* 77:623-634
- Swain, N., B. Rath & S. Adhikary. 1994. Growth response of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to herbicides and pesticides. *J. Basic Microbiol.* 34: 197–204

- Torzillo, G., C. Faraloni, M. Silva, J. Kpecky, J. Pilny & J. Masojidek. 2012. Photoacclimation of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) cultures grown outdoors in photobioreactors and open ponds. *European J. of Phycology*. 47: 169-181.
- Trigo, A., A. Valencia & I. Cases. 2008. Systemic approaches to biodegradation. *FEMS Microbiological Revue*. 33: 98-108.
- Tsai, W., K. Y. Hsien & C. Chang. 2005. Removal of herbicide Paraquat® from an aqueous solution by adsorption onto spent and treated diatomaceous earth. *Bioresource Technology* 96: 657–663
- Tsui, M. & L. Chu. 2003. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere*: 52: 1189–1197
- Venkata, P. & K. Kim. 2015. A review of photochemical approaches for the treatment of a wide range of pesticides. *Journal of Hazardous Materials*. 285: 325–335
- Vermas, W. 2001. Photosynthesis and respiration in cyanobacteria. *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley and Sons. London. 7p.
- Vitecek, J., J. Petrlova, V. Adam, L. Havel, K. Kramer, P. Babula & R. Kizek. 2007. A Fluorimetric Sensor for Detection of One Living Cell. *Sensors*. 7: 222-238
- Whitfield C. 2006 Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *Annu Rev Biochem*. 75: 39-68
- Yamagami, K., M. Matsubara, Y. Kitazawa, et al. 1994. Flow cytometric analysis of the direct toxic effects of Paraquat® on cultured MDCK cells. *J Appl Toxicol*. 14:155-9.
- Zheng, W., U. Rasmussen, S. Zheng, X. Bao, B. Chen, Y. Gao, B. Chen, Y. Gao, X. Guan, J. Larsson & B. Bergman. 2013. Multiple Modes of Cell Death

Discovered in a Prokaryotic (Cyanobacterial) Endosymbiont. PLoS One. 6 : e66147. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3688857/>

Zhou, Q, Chen, H. Zhang, et al. 2012. A flow cytometer based protocol for quantitative analysis of bloom-forming cyanobacteria (*Microcystis*) in lake sediments. *Journal of Environmental Sciences*. 24: 1709-171.

Zinicovscaia I, Cepoi L. 2016. *Cyanobacteria for bioremediation of wastewaters*. Berlin: Springer.