

## DEVELANDO EL POTENCIAL DE *Chlorella sp.* PARA LA ELIMINACIÓN DE BTEX: UN ENFOQUE INNOVADOR PARA LA BIORREMEDIACIÓN

Brenda Kristell Núñez Mork<sup>a</sup>, Brenda Tatiana Núñez Lozada<sup>a</sup>, Edilberto Vicente Medina Cabrera<sup>a</sup>, Ricardo Alonso Abril Ramírez<sup>a</sup>, Tiffany Lynne Vincent Lozano<sup>a</sup>, Joshelyn Mariangela Paredes Zavala<sup>a</sup>, Jaime Dante Cárdenas García<sup>\*a</sup>

### RESUMEN

Los hidrocarburos aromáticos BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xileno) son contaminantes persistentes y tóxicos provenientes de actividades industriales y derrames de petróleo que afectan significativamente la calidad del agua, del suelo y la salud humana. Dadas las limitaciones de los métodos fisicoquímicos para la remediación de estos contaminantes, la biorremediación, particularmente mediante el uso de microalgas como *Chlorella sp.*, emerge como una alternativa eficiente y sostenible debido a su capacidad para biodegradar compuestos orgánicos contaminantes y adaptarse a diversas condiciones ambientales. Es por eso que este estudio evaluó la eficiencia de biodepuración de hidrocarburos BTEX utilizando la microalga *Parachlorella kessleri*, aislada y caracterizada morfológica y molecularmente. Se determinó su cinética de crecimiento, obteniendo una fase exponencial de 120 horas, una velocidad específica de crecimiento  $\mu=0,0230 \text{ h}^{-1}$  y un tiempo de generación  $G=30,15 \text{ h}$ . La medición de BTEX mediante cromatografía de gases FID mostró alta precisión y selectividad, con concentraciones mínimas detectables para benceno de 0,4 mg/L, tolueno 1,7 mg/L, etilbenceno 4,7 mg/L y xilenos entre 1,4-7,2 mg/L. *Parachlorella kessleri* demostró una notable capacidad de biorremediación, eliminando hasta 93,6% de benceno, 78,1% de tolueno, 66,0% de etilbenceno y 73,7% de xilenos en cinco días. Estos resultados destacan el enorme potencial de las microalgas en la mitigación de la creciente contaminación ambiental e invita a revalorar el papel de la biotecnología para enfrentar de manera sostenible los desafíos ambientales globales contemporáneos.

**Palabras clave:** *Chlorella*, Hidrocarburos aromáticos, Biorremediación, BTEX, Biotecnología

---

<sup>a</sup> Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas. Universidad Católica de Santa María. Urbanización San José s/n, Umacollo, 04013, Arequipa, Perú. jcardenas@ucsm.edu.pe

# UNLOCKING THE POTENTIAL OF *Chlorella sp.* FOR BTEX REMOVAL: AN INNOVATIVE APPROACH TO BIOREMEDIATION

## ABSTRACT

BTEX aromatic hydrocarbons (benzene, toluene, ethylbenzene and xylene) are persistent and toxic pollutants from industrial activities and oil spills that significantly affect water and soil quality as well as human health. Given the limitations of physicochemical methods for the remediation of these contaminants, bioremediation, particularly through the use of microalgae such as *Chlorella sp.*, emerges as an efficient and sustainable alternative due to its ability to biodegrade contaminating organic compounds and adapt to various environmental conditions. Hence, this study evaluated the efficiency of BTEX hydrocarbon biopurification using the microalgae *Parachlorella kessleri*, isolated and morphologically and molecularly characterized. Its growth kinetics were determined, obtaining an exponential phase of 120 hours, a specific growth rate  $\mu=0.0230 \text{ h}^{-1}$  and a generation time  $G=30.15 \text{ h}$ . Measurement of BTEX by FID gas chromatography showed high precision and selectivity, with minimum detectable concentrations for benzene of 0,4 mg/L, toluene 1,7 mg/L, ethylbenzene 4,7 mg/L, and xylenes between 1,4-7,2 mg/L. *Parachlorella kessleri* demonstrated a remarkable bioremediation capacity, removing up to 93,6% of benzene, 78,1% of toluene, 66,0% of ethylbenzene and up to 73,7% of xylenes in five days. These results highlight the enormous potential of microalgae in mitigating growing environmental pollution and sets an invitation to reevaluate the role of biotechnology to sustainably address contemporary global environmental challenges.

**Keywords:** Chlorella, Aromatic hydrocarbons, Bioremediation, BTEX, Biotechnology

## INTRODUCCIÓN

Los impactos de la contaminación a causa de hidrocarburos aromáticos, y en especial los hidrocarburos aromáticos, mono y disustituidos, conocidos como BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xileno) representan un problema ambiental crítico que repercute en ecosistemas acuáticos y terrestres<sup>1,2</sup>. La procedencia principal de estos contaminantes corresponde a actividades industriales, derrames de petróleo y el excesivo uso de productos derivados del petróleo. Estos se caracterizan por una elevada persistencia y toxicidad, lo que compromete significativamente la calidad del agua, del suelo, y la salud de los organismos vivos<sup>3</sup>. Adicionalmente, los BTEX están asociados a posibles efectos carcinogénicos, teratogénicos y mutagénicos en animales y humanos<sup>4</sup>, lo que señala la necesidad de desarrollar métodos sostenibles y eficientes para su remoción del medio ambiente.

Los métodos tradicionales de remediación de BTEX incluyen técnicas fisicoquímicas como la adsorción con carbón activado, la oxidación avanzada y la filtración mediante membranas.

Aunque estas tecnologías han demostrado ser efectivas en la eliminación de BTEX, presentan limitaciones significativas, tales como altos costos operativos, generación de subproductos tóxicos y dependencia de condiciones específicas que pueden no ser factibles en todos los contextos<sup>5-7</sup>. En este sentido, la biorremediación emerge como una alternativa prometedora y más ecológica, aprovechando la capacidad de algunos organismos vivos para degradar compuestos orgánicos contaminantes de manera natural<sup>8</sup>.

La biorremediación es una estrategia para la descontaminación de ambientes contaminados que emplea organismos como microalgas, hongos, bacterias, consorcios microbianos o procesos (aeróbicos o anaeróbicos)<sup>9</sup>, para reducir la concentración y toxicidad de determinados contaminantes, basada en la aceleración del proceso natural de biodegradación de determinadas sustancias en el medio ambiente; donde la velocidad del proceso depende de condiciones ambientales como temperatura, presencia de oxígeno, nutrientes y pH<sup>10</sup>. Estos microorganismos pueden utilizar contaminantes, compuestos orgánicos o inorgánicos, como fuente de energía o carbono durante sus procesos metabólicos, utilizándolos como nutrientes o pudiendo ser degradados enzimáticamente<sup>11</sup>.

Esta técnica se puede dividir en dos categorías: *in situ* (en un sitio contaminado) y *ex situ* (en otro lugar que no sea el área contaminada)<sup>12,13</sup>. La ficorremediación, es un tipo de biorremediación que se refiere a la utilización de micro o macroalgas para la remoción de contaminantes de aguas residuales, suelos contaminados y CO<sub>2</sub> del aire contaminado<sup>14</sup>, lo que aporta una mejora a los métodos convencionales, demostrando ser una solución sostenible y ayudando a reducir la carga de contaminantes en el medio ambiente<sup>15</sup>.

El cultivo de microalgas proporciona un biotratamiento que ha captado la atención de los investigadores debido a su versatilidad y eficiencia metabólica<sup>16</sup>. Son numerosas las investigaciones y proyectos que han utilizado las microalgas para metabolizar una amplia gama de contaminantes orgánicos, y que a su vez han utilizado la biomasa obtenida de estos ambientes contaminados para la producción de biocombustibles como biodiesel, biogás y bioetanol, así como otros productos industriales<sup>17,18</sup>.

Se ha demostrado que varias especies de microalgas de diferentes géneros, como *Botryococcus*, *Chlamydomonas*, *Chlorella* y *Phormidium*, tienen diferentes fines de ficorremediación. Sin embargo, seleccionar las especies de algas más adecuadas para la eliminación de ciertos contaminantes requiere más investigación en áreas clave. El uso de microalgas en la biorremediación del petróleo crudo sigue siendo un área de investigación interesante en discusión. Algunas especies de algas pueden oxidar y degradar muchos tipos de hidrocarburos en componentes menos dañinos, lo que sugiere su potencial para remediar el petróleo crudo, así como hidrocarburos aromáticos específicos<sup>19</sup>. Varios estudios demuestran la capacidad de diferentes especies de microalgas para biodegradar compuestos orgánicos en otras condiciones o regímenes metabólicos utilizando carbono orgánico como fuente de energía o carbono<sup>20</sup>.

Entre las diversas especies de microalgas, *Chlorella sp.* destaca por su robustez, alta tasa de crecimiento y capacidad para adaptarse a diferentes condiciones ambientales, lo que la convierte en una candidata ideal para aplicaciones de bioremediación<sup>21</sup>.

## PARTE EXPERIMENTAL

### **Aislamiento y purificación de *Chlorella sp.***

Se obtuvo un cultivo mixto de microalgas proporcionadas por el Laboratorio de Biología acuática de la Escuela de Biología de la Universidad Nacional de San Agustín. Se empleó el método de diluciones seriadas con medio BBM (Basal Bold Medium). Después de 5 días de incubación, se validó el aislamiento de una sola especie de microalga mediante observación en microscopio.

Para la purificación del cultivo de la cepa ya aislada de *Chlorella sp.*, se emplearon los métodos de Lavado por centrifugación y Ultrasonido, para la eliminación de bacterias. Se depositaron 6 mL de cultivo en fase de crecimiento exponencial en un tubo Falcon y se sometió a ultrasonido de baja frecuencia introduciendo el tubo en un baño de agua durante 15 segundos a 90 kHz. Luego, se centrifugó por 90 segundos a 2000 RPM. Se descartó el sobrenadante y se conservó el pellet. Se adicionaron 6 mL de medio Basal Bold estéril, se volvió a suspender el pellet y se repitió el proceso de centrifugación cinco veces.

### **Caracterización microscópica de *Chlorella sp.***

Se observó en fresco en microscopio a 40X y 100X y se midió el diámetro a través de la captura de microfotografías. Posteriormente, se analizaron las principales características estructurales de los cloroplastos.

### **Caracterización macroscópica de *Chlorella sp.***

En una cámara de flujo laminar en presencia de mechero, se cultivó la microalga en placas Petri con medio Agar BBM con la técnica de rayado en estría. Para la elaboración del medio Agar BBM, se empleó la composición descrita reportada con anterioridad<sup>22</sup> y 2% de agar. Se depositó en placas Petri y se esterilizó en autoclave a 120°C y 1,1 kg/cm<sup>3</sup> de presión durante 15 minutos. Seguidamente, se dejó enfriar al ambiente para su solidificación. Se sembró el medio con un asa de Kolle. Se colocaron las placas invertidas en un ambiente de luz controlada y se incubó durante 6 días<sup>23</sup>. Se determinó la morfología y pigmentación de las colonias, así como el tiempo de crecimiento.

### **Determinación de la cinética de crecimiento de *Chlorella sp.***

Se monitoreó el crecimiento de la microalga mediante lecturas de su densidad poblacional por conteo en cámara de Neubauer, así como por espectrofotometría, previa elaboración de una curva patrón.

### **Recuento celular en cámara de Neubauer**

Se agitó el cultivo hasta obtener una distribución homogénea y se succionó muestra del cultivo con una pipeta Pasteur. Se llenó la cámara de Neubauer con el cubreobjeto puesto, asegurando que los canales laterales se encuentren llenos. Se enfocó la cámara en el objetivo 10X del microscopio y se contaron todas las células presentes en el cuadrante central subdivididos en 25 cuadrados pequeños. Se diluyó la muestra, 1:10, cuando el cultivo estaba

muy concentrado. Se ejecutaron los conteos con intervalos de 24 horas. La concentración celular fue calculada de acuerdo con la fórmula:

$$C = N \cdot 10^4 \cdot dil$$

En donde:  $C$  corresponde a la concentración (cel/ml);  $N$ , al promedio de células presentes en 1 mm<sup>3</sup> (0.1 µL) y  $dil$ , al Factor de dilución<sup>24</sup>.

### Cuantificación de densidad poblacional por espectrofotometría

Se determinó la concentración celular indirectamente a través de la densidad óptica del cultivo empleando un espectrofotómetro. Se calibró el equipo con medio BBM estéril. Se agitó el cultivo recién inoculado hasta su distribución homogénea. Se llenó la celda óptica con la muestra. En caso de altas concentraciones de cultivo, se realizó una dilución 1:10. Se midió la absorbancia en el espectrofotómetro, usando las longitudes de onda 435 nm, 440 nm, 680 nm.

Para la selección de las longitudes de onda, se empleó el método de Determinación de la longitud de onda máxima por barrido espectral del *Thermo Scientific INSIGHT 2 Software*<sup>25</sup>. Asimismo, se consideraron las longitudes 440 nm y 680 nm, reportadas por Cho, C., Nam, K., Seo, Y.H. et al y Zuliani L, Frison N, Jelic A, et al<sup>26,27</sup>.

Se elaboró una curva de crecimiento con los datos de la densidad óptica, considerando:

$$DO = 100 - T$$

En donde: DO = Densidad óptica; T = Transmitancia, % de luz incidente recibida por el fotodetector<sup>24</sup>.

Asimismo, se calcularon los parámetros cinéticos de densidad óptica considerando:

$$\ln N - \ln N_0 = \mu(t - t_0) ; g = 0,693/\mu$$

En donde: N = Densidad óptica;  $\mu$  = constante específica de velocidad de crecimiento; g= tiempo de generación

### Caracterización molecular la microalga *Chlorella sp.*

Se extrajo el DNA de la microalga mediante el método fenol-cloroformo alcohol isoamílico. Se depositaron 1,5 mL de cultivo de microalga en un tubo Eppendorf. Se centrifugó a 13000 rpm por 2 minutos. Se decantó el sobrenadante y se conservó el pellet de biomasa. Se adicionó 1 mL de Buffer de Lisis a pH 7,5, como fue reportado<sup>28</sup>. Se sometió la mezcla a vortex, a 30 RPS por 1 minuto. Se adicionaron micro perlas y se mantuvo a -20°C por 5 minutos. Seguidamente, se sometió a Vortex por 5 minutos. Nuevamente se mantuvo a -20°C por 5 minutos y a vortex por otros 5 minutos. Se rescató el sobrenadante y se adicionó 500 µL de fenol cloroformo alcohol isoamílico 25:24:1. Se sometió la mezcla a vortex por 1 minuto. Se centrifugó la suspensión a 12000 rpm por 10 minutos. Se transfirió 650 µL del sobrenadante a un nuevo Eppendorf y se adicionó 1000 µL de alcohol isopropílico. Se invirtió

el Eppendorf 5 veces y se centrifugó a 12000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Se mantuvo a 4 °C por 12 horas. Se removió el sobrenadante y se lavó el pellet con 500 µL de etanol al 70%. Se removió el etanol. Se dejaron evaporar las trazas restantes de etanol<sup>28</sup>.

Se volvió a suspender el DNA con 40 µL de agua ultrapura. Se validó la extracción de DNA por electroforesis en gel de agarosa 1,5% por 15 minutos, a 100 mV y 400 mA<sup>28</sup>.

### Amplificación del 18S rRNA y 28S rRNA

Se tomó 1 µL de muestra y se mezcló con 19 µL de Máster Mix. Para la elaboración del Máster Mix, se midieron con micropipetas los componentes mostrados en la Tabla 1<sup>28</sup>.

El ADN genómico de la región 18S rRNA fue amplificada en PCR usando los primers: Forward 5'-GCGGTAATTCCAGCTCCAATAGC-3' y Reverse 5'-GACCATACTCCCCCGGAACC-3'<sup>29,30</sup>. Por otro lado, para la amplificación de la zona 28S rRNA, se usaron los primers: Forward 5'-AGCGGAGGAAAAGAACTA-3' y Reverse 5'-TACTAGAAGGTTTCGATTAGTC-3'<sup>31,32</sup>.

El programa usado para PCR se muestra en la Tabla 1. Detalle del programa de PCR usado para este estudio. Los programas se utilizaron para amplificar la secuencia ribosómica para la identificación de la cepa de microalgas.<sup>33</sup>

**Tabla 1.** Detalle del programa de PCR usado para este estudio. Los programas se utilizaron para amplificar la secuencia ribosómica para la identificación de la cepa de microalgas.

FASE	18S rRNA			28S rRNA		
	Temperatura °C	Tiempo (s)	Número de ciclos	Temperatura °C	Tiempo (s)	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95	300	1	95	240	1
Desnaturalización	95	30		95	30	
Hibridación	56	60	35	52.5	20	30
Elongación	68	60		68	90	
Extensión final	68	300	1	68	480	1
Almacenamiento	4	∞	1	4	∞	1

Tomado de Medina C.<sup>33</sup>

### Secuenciación molecular

Se realizaron dos secuenciaciones habiéndose empleado primers forward y reverse para ambos amplicones, 18S rRNA y 28S rRNA.

Se ingresó la secuencia de nucleótidos en la base de datos NUCLEOTIDE BLAST de la NCBI para la identificación taxonómica de la microalga<sup>34</sup>.

### Cuantificación de hidrocarburos aromáticos BTEX por cromatografía de gases FID

Para la evaluación de la depuración de hidrocarburos por medio de *Chlorella sp.* se preparó soluciones de hidrocarburos aromáticos (Benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos). La concentración remanente, después de 120 horas, fue evaluada usando un cromatógrafo Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra usando una columna Zebron ZB-35. Para el análisis cuantitativo se usó BTEX, material certificado conteniendo 2000 µg/mL en metanol, de benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos obtenido de Merck Peruana S.A. así como los otros reactivos.

Tanto las soluciones estándar de concentración conocida, como los concentrados obtenidos de los tratamientos fueron filtrados con jeringas de 5 ml y membranas *Nylon* de 0,22 µm marca *RephiQuik* en viales de vidrio ámbar. Posteriormente se sellaron e insertaron en el inyector automático *AOC-20I* acoplado al cromatógrafo de gases. Las soluciones estándar fueron leídas repetidas veces variando las condiciones cromatográficas hasta lograr establecerlas y poder resolver los tiempos de retención y picos en los cromatogramas obtenidos. Las condiciones experimentales elegidas se basaron en el trabajo de Sidisky L.<sup>35</sup>

### Evaluación la capacidad de *Chlorella sp.* para biodepurar hidrocarburos BTEX a distintas concentraciones

Con el fin de estimar la capacidad biodepuradora de *Chlorella sp.*, se dividió el proceso en las siguientes etapas: Biorreacción, extracción, concentración y cuantificación. Para la etapa de biorreacción, se optó por simular muestras de aguas contaminadas con hidrocarburos mediante la elaboración de soluciones de hidrocarburos BTEX de concentraciones conocidas, con el objetivo de estimar en primera instancia concentraciones máximas remediabiles de BTEX por la microalga. Asimismo, considerando que la fuente de carbono es el reactivo limitante de la biorreacción, su cantidad podría influir en la eficiencia de esta, por ende se optó por evaluar la relación g de BTEX/ UFC de *Chlorella sp.*, a través de la manipulación del volumen de contaminante BTEX disponible para biorremediar versus una concentración estándar de densidad poblacional de *Chlorella sp.*, con el objetivo de definir el valor de dosis de inoculación requerida para una eficiencia óptima para casos de aplicación donde desee emplearse este método de biodepuración de BTEX. Al tratarse de un sistema bifásico compuesto de una fase orgánica contenedora de los contaminantes y otra acuosa portadora de los entes biorremediadores, se realizaron procesos de selección de solventes orgánicos y surfactantes, por lo que se tomaron como referencias antecedentes reportados en repositorios científicos y para su selección fueron sometidos a pruebas experimentales. Finalmente, para la neutralización de la biodepuración se seleccionó el método de microfiltración.

Asimismo, para la etapa de Extracción, se seleccionó el método líquido-líquido. El sistema de alimentación estuvo conformado por el contenido del biorreactor de tratamiento de BTEX por *Chlorella sp.* y como solvente extractor se seleccionó diclorometano de grado HPLC. El extracto del proceso resultante fueron los Hidrocarburos aromáticos BTEX recuperados en el solvente, y el refinado del proceso, por el resto de la alimentación. Se estableció la repetición del proceso de extracción para el refinado obtenido, con la finalidad de obtener una eficiencia del 99,9% de extracción. Luego se procedió a la concentración de la muestra usando un evaporador rotatorio. Finalmente, el extracto concentrado se cuantificó por GC con detector FID usando una columna Zebron ZB-35.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Aislamiento de *Chlorella sp.*

Se obtuvo un cultivo monoespecífico de microalgas mediante el método de diluciones seriadas. Posteriormente, las bacterias presentes en el cultivo fueron eliminadas utilizando técnicas de lavado por centrifugación y ultrasonido<sup>23</sup>. La Figura 1a muestra el cultivo de *Chlorella sp.* aislado y purificado.

### Caracterización microscópica de *Chlorella sp.*

Se determinó que el diámetro promedio de *Chlorella sp.* era de 1,34  $\mu\text{m}$ , lo que correspondía a un área de 1,41  $\mu\text{m}^2$  (Figura 1b). Este tamaño es menor al rango típico reportado para microalgas del género *Chlorella*, que varía entre 2 y 10  $\mu\text{m}$ <sup>36-38</sup>.

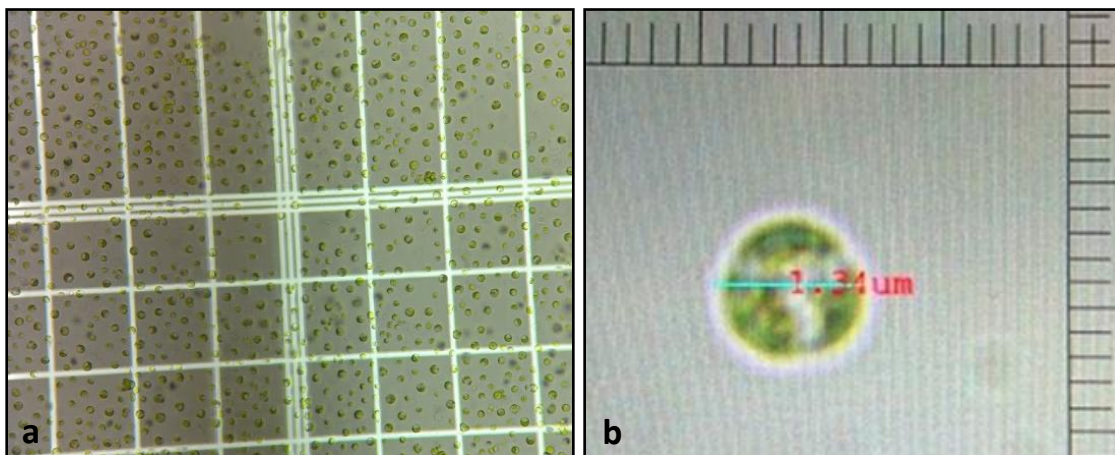
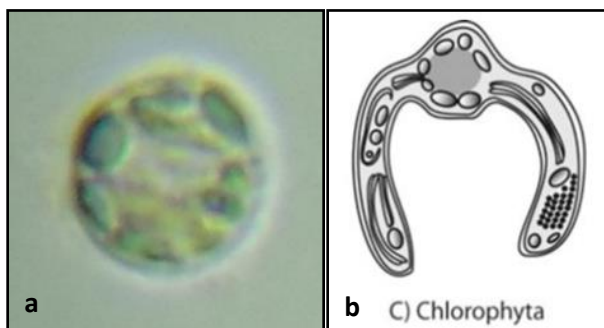


Figura 1. a. Cultivo de *Chlorella sp.* aislado y purificado. b. Determinación del diámetro de *Chlorella sp.*

Además, se identificaron las principales características estructurales de los cloroplastos, propias de la División *Chlorophyta*. Se observó un cloroplasto en forma de copa, un pirenoide de forma ampliamente elipsoidal a esférica y una superficie celular lisa sin flagelo (Figura 2a y 2b). Asimismo, se determinó que estas microalgas se reproducían mediante la formación de 2 a 4 autoesporas<sup>39</sup>.

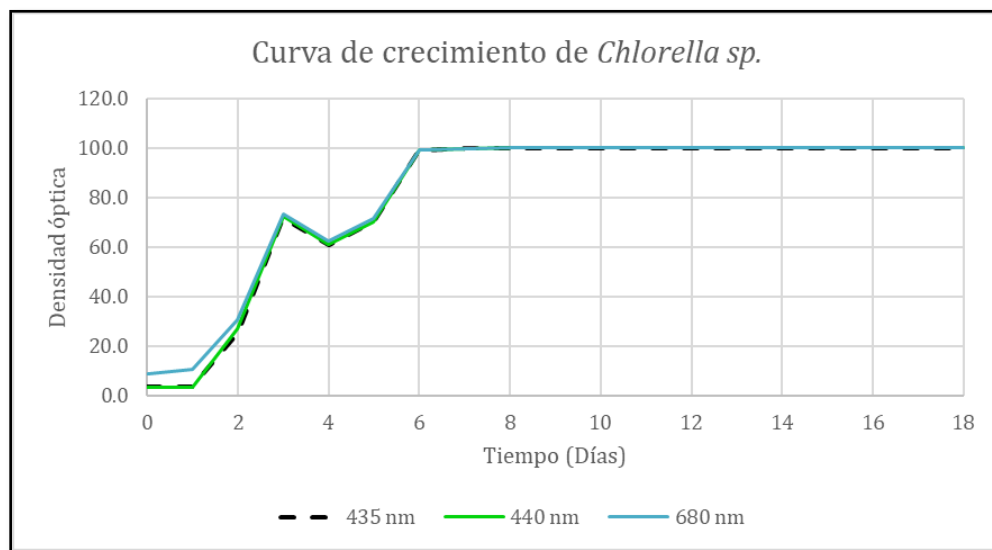




**Figura 2.** a. Se observan los organelos de *Chlorella sp.*, b. Se aprecian las principales características estructurales de los cloroplastos de *Chlorophyta*. (Tomado de Solymosi K)<sup>39</sup>

### Determinación de la cinética de crecimiento de *Chlorella sp.*

Se determinó la curva de crecimiento de la microalga (Figura 3), identificándose una fase lag o de adaptación que duró 24 horas, seguida de una fase exponencial que inició al día 1 y se prolongó por 120 horas, y finalmente una fase estacionaria que comenzó en el día 6. Los parámetros cinéticos obtenidos incluyeron una velocidad específica de crecimiento de  $\mu = 0,0230 \text{ h}^{-1}$  y un tiempo de generación de  $G = 30,1519 \text{ h}$ . Cabe destacar que, según algunos estudios, especies de *Chlorella sp.* pueden no alcanzar la fase de muerte incluso después de 25 a 28 días de cultivo<sup>40, 41</sup>.



**Figura 3.** Cinética de crecimiento de *Chlorella sp.*

### Caracterización macroscópica de *Chlorella sp.*

Se observó el crecimiento de colonias de *Chlorella sp.* en medio Agar BBM, visibles entre los días 3 y 6. Las colonias presentaron una forma esférica bien definida, tamaño uniforme, coloración verde claro y carecían de motilidad.

Super reino: Eucariota
•Reino: Viridiplantae
•División: Chlorophyta
•Clade: core chlorophytes
•Clase: Trebouxiophyceae
•Orden: Chlorellales
•Familia: Chlorellaceae
•Genero: Parachlorella
•Especie: Parachlorella kessleri
•Especie: Parachlorella beijerinckii
•Especie: <i>Parachlorella hussii</i>
•Genero: Masaia
•Especie: <i>Masaia oloidia</i>
•Género: Dictyosphaerium
•Especie: <i>Dictyosphaerium pulchellum</i>
•Género: Mucidosphaerium
•Especie: <i>Mucidosphaerium pulchellum</i>

**Figura 4.** Especies homólogas con lineamientos significativos obtenidos en BLAST para la secuencia de genes 18S rRNA. Nota: Tomado de NCBI<sup>34</sup>.

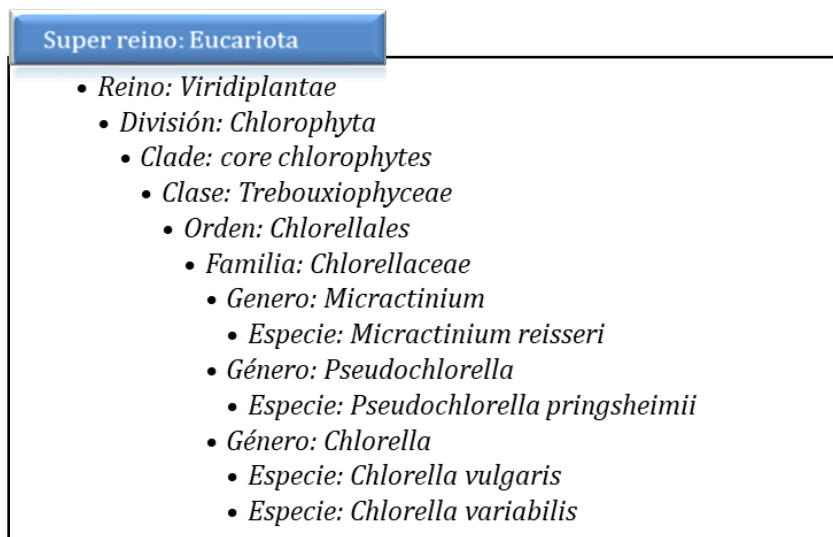
Parachlorella kessleri isolate GB1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence					
Sequence ID: <a href="#">KX151669.1</a> Length: 860 Number of Matches: 1					
Range 1: 194 to 681 <a href="#">GenBank</a> <a href="#">Graphics</a>				▼ Next Match ▲ Pre	
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
902 bits(488)	0.0	488/488(100%)	0/488(0%)	Plus/Plus	
Query 1	CTCGTAGTTGGATTTCCGGCGGGGCC	TGCCGGTCCGCCGTTTCGGTGTGCACTGGCAGGG	60		
Sbjct 194	CTCGTAGTTGGATTTCCGGCGGGGCC	TGCCGGTCCGCCGTTTCGGTGTGCACTGGCAGGG	253		
Query 61	CCCCCCTTGTGCGGGGACGGGCTCC	TGGGCTTCACTGTCCGGGACTCGGAGTCGGCGC	120		
Sbjct 254	CCCCCCTTGTGCGGGGACGGGCTCC	TGGGCTTCACTGTCCGGGACTCGGAGTCGGCGC	313		
Query 121	TGTTACTTTGAGTAAATAGAGTGTT	CAAAGCAGGCCACGCTCTGAATACATTAGCATG	180		
Sbjct 314	TGTTACTTTGAGTAAATAGAGTGTT	CAAAGCAGGCCACGCTCTGAATACATTAGCATG	373		
Query 181	GAATAACACGATAGGACTCTGGCC	TATCCTGTTGGTCTGTAGGACCGGAGTAATGATTAA	240		
Sbjct 374	GAATAACACGATAGGACTCTGGCC	TATCCTGTTGGTCTGTAGGACCGGAGTAATGATTAA	433		
Query 241	GAGGGACAGTCGGGGCATTTCGT	ATTCGATGTCAGAGGTGAAATCTTGGATTTTCGAA	300		
Sbjct 434	GAGGGACAGTCGGGGCATTTCGT	ATTCGATGTCAGAGGTGAAATCTTGGATTTTCGAA	493		
Query 301	AGACGAACTACTGCGAAAGCATT	TGCCAAGGATGTTTTTATTAAATCAAGAACGAAAGTTG	360		
Sbjct 494	AGACGAACTACTGCGAAAGCATT	TGCCAAGGATGTTTTTATTAAATCAAGAACGAAAGTTG	553		
Query 361	GGGGCTCGAAGACGATTAGATAC	CGTCTAGTCTCAACCATAAACGATGCCGACTAGGGA	420		
Sbjct 554	GGGGCTCGAAGACGATTAGATAC	CGTCTAGTCTCAACCATAAACGATGCCGACTAGGGA	613		
Query 421	TCGGCGGATGTTTCTTCGATGAC	TCCGCCGGCACCTTATGAGAAATCAAAGTTTTTGGGT	480		
Sbjct 614	TCGGCGGATGTTTCTTCGATGAC	TCCGCCGGCACCTTATGAGAAATCAAAGTTTTTGGGT	673		
Query 481	TCCGGGGG	488			
Sbjct 674	TCCGGGGG	681			

**Figura 5.** Alineamiento molecular de la secuencia 18S rRNA analizada y *Parachlorella kessleri*. Nota: Tomado de NCBI<sup>34</sup>.

### Identificación molecular la microalga *Chlorella* sp.

Se secuenciaron los genes 18S rRNA y 28S rRNA, cuyos análisis en BLAST revelaron relaciones cercanas con microalgas de la familia *Chlorellaceae* (Figura 4). En el caso del gen 18S rRNA, se obtuvo un porcentaje de identidad del 100% para una longitud de 496-860 nucleótidos, con una cobertura de consulta del 61-98%, un e-value de 0,0 y un bit score máximo de 902, sin errores de alineamiento. La especie más estrechamente relacionada fue *Parachlorella kessleri*, con un e-value de 0,0 y un bit score de 902 (Figura 5).

Por otro lado, el análisis del gen 28S rRNA, caracterizado por un amplicón más largo, mostró una identidad del 90,69-100% para una longitud de 883 nucleótidos, una cobertura de consulta del 97%, un e-value de 0,0 y un bit score máximo de 1051-1458, con un error de alineamiento del 0-1% (Figura 6). La especie más cercana fue *Micractinium reisseri*, con un bit score máximo de 1458, destacándose como la más similar a la secuencia analizada (Figura 7).



**Figura 6.** Especies homólogas con lineamientos significativos obtenidos en BLAST para la secuencia de genes 28S rRNA. Nota: Tomado de NCBI<sup>34</sup>.

**Micractinium reisseri 28S rRNA gene, strain YSW16**  
 Sequence ID: [HE863711.1](#) Length: 883 Number of Matches: 1

Range 1: 30 to 820 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1458 bits(789)	0.0	790/791(99%)	0/791(0%)	Plus/Minus
Query 1	GTCAGCACATCTACGAGCCTCCACCAGAGTTTCCTCTGGCTTCGCCCTGCTCAGGCATAG	60		
Sbjct 820	GTCAGCACATCTACGAGCCTCCACCAGAGTTTCCTCTGGCTTCGCCCTGCTCAGGCATAG	761		
Query 61	TTCACCATCTTTTCGGGTCCCAACAGGTATGCTCGTACTCGAACCTTTACAGAAGATCAT	120		
Sbjct 760	TTCACCATCTTTTCGGGTCCCAACAGGTATGCTCGTACTCGAACCTTTACAGAAGATCAT	701		
Query 121	GGTCGGTCGATGGTGCAGGCACAGGCCATCCACCAGTTAGTTTCTTGGCGCTTCATGGG	180		
Sbjct 700	GGTCGGTCGATGGTGCAGGCACAGGCCATCCACCAGTTAGTTTCTTGGCGCTTCATGGG	641		
Query 181	TTTGCCACCCACCAGCTCGCATAACATGTTAGACTCCTTGGTCCGTGTTCAAGACGGGCC	240		
Sbjct 640	TTTGCCACCCACCAGCTCGCATAACATGTTAGACTCCTTGGTCCGTGTTCAAGACGGGCC	581		
Query 241	GATTGAAGGCCTTCCGCCAGCATCTTGACGACGCAGTTCGCCGAGGGACTACAAGAGCGCC	300		
Sbjct 580	GATTGAAGGCCTTCCGCCAGCATCTTGACGACGCAGTTCGCCGAGGGACTACAAGAGCGCC	521		
Query 301	GTTACAGCCTCGGTGGGGAGGAGGCATAGCCGGGGTAACAATCCCCGGGGTTGTCCCGC	360		
Sbjct 520	GTTACAGCCTCGGTGGGGAGGAGGCATAGCCGGGGTAACAATCCCCGGGGTTGTCCCGC	461		
Query 361	CCCCCAACCCATGCTGACCAGCACCCAGCGCATTAGCCGACCGTTAGGCGGGCGTGTG	420		
Sbjct 460	CCCCCAACCCATGCTGACCAGCACCCAGCGCATTAGCCGACCGTTAGGCGGGCGTGTG	401		
Query 421	CCTGGGCGCACCCGTGGCCTCCAATCGCTTCCCTCTCAACAATTTCAAGCACTTTTTAAC	480		
Sbjct 400	CCTGGGCGCACCCGTGGCCTCCAATCGCTTCCCTCTCAACAATTTCAAGCACTTTTTAAC	341		
Query 481	TCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTTCCCTCACGGTACTTGTTCGCTATCGGTCTCCCG	540		
Sbjct 340	TCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTTCCCTCACGGTACTTGTTCGCTATCGGTCTCCCG	281		
Query 541	TCGGTATTTAGCCTTAGATGGGATTTACCACCTGCTTTGGGCTGCATTTCCAAACAACCC	600		
Sbjct 280	TCGGTATTTAGCCTTAGATGGGATTTACCACCTGCTTTGGGCTGCATTTCCAAACAACCC	221		
Query 601	GACTCTGGGAAAGCGCTTCGTGGGGCGAAGGCGGCCGGGCCAACGGGGTTCTCACCCCTC	660		
Sbjct 220	GACTCTGGGAAAGCGCTTCGTGGGGCGAAGGCGGCCGGGCCAACGGGGTTCTCACCCCTC	161		
Query 661	TCTGACGCCCTTTCCAGGGGACTTGGGCCCGGAGCTCCGCAGAAGGGCGTTCTCTAGAC	720		
Sbjct 160	TCTGACGCCCTTTCCAGGGGACTTGGGCCCGGAGCTCCGCAGAAGGGCGTTCTCTAGAC	101		
Query 721	TACAATTCGCCAGCCGGGGGCTGGAGATTTTCAAGCTGGGCTTTCCCGGTTCACTCGCC	780		
Sbjct 100	TACAATTCGCCAGCCGGGGGCTGGAGATTTTCAAGCTGGGCTTTCCCGGTTCACTCGCC	41		
Query 781	GTTACTAGGGG	791		
Sbjct 40	GTTACTAGSGG	30		

**Figura 7.** Alineamiento molecular de la secuencia 28S rRNA analizada y *Micractinium reisseri*. Nota: Tomado de NCBI<sup>34</sup>.

### Estandarización y validación del método de cuantificación de hidrocarburos aromáticos BTEX por cromatografía de gases FID

Para determinar las condiciones óptimas para el análisis de hidrocarburos BTEX mediante GC-FID, se probaron diversas configuraciones cromatográficas basadas en estudios previos que empleaban el estándar BTEX. Finalmente, se seleccionó la configuración propuesta por Sidisky L.35, incorporando algunas modificaciones, las cuales se detallan en la Tabla 2.

**Tabla 2:** Condiciones cromatográficas para la evaluación de hidrocarburos aromáticos.

Parámetro	Valor	Unidad
Tiempo	25	min
Vol. Inyección	1	uL
Modo Inyección	-	Split
Presión	190	kPa
T° inyección	250	°C
T° detector	250	°C
T° columna	40	°C
Flujo de Aire	40	ml/min
Flujo de Hidrógeno	40	ml/min
Gas carreador	Helio	
Flujo Gas carreador	30	ml/min

Se realizó una corrida cromatográfica utilizando la solución certificada de BTEX de Merck Peruana S.A. y, posteriormente, se analizaron los mismos hidrocarburos aromáticos de forma individual. Se observó que los tiempos de retención de los compuestos individuales fueron similares a los obtenidos con la solución BTEX certificada, como se detalla en la Tabla 3.

Los resultados presentados en la Tabla 3 muestran una comparación de los tiempos de retención obtenidos en los cromatogramas de la solución certificada BTEX y la solución BTEX preparada en el laboratorio. La identificación de cada compuesto asociado a los picos observados en los cromatogramas se realizó tras múltiples análisis de cada componente, empleando soluciones preparadas con compuestos puros de grado GC. Estos compuestos serán utilizados en las pruebas de biodepuración.

Se observó que, de los 7 picos registrados, 5 correspondieron a tiempos de retención similares a los obtenidos con la solución certificada BTEX, por lo que se consideraron válidos. Los dos tiempos de retención restantes, que no coincidieron, se atribuyeron al solvente utilizado: metanol en la solución estándar y diclorometano en la solución preparada en el laboratorio.

**Tabla 3.** Comparación de los tiempos de retención (minutos) de los hidrocarburos en el cromatograma del material certificado BTEX y la solución BTEX preparada en el laboratorio.

SOLUCIÓN CERTIFICADA BTEX	SOLUCION BTEX 1000 PPM	COMPUESTO*
-	0,709	
0,985	0,985	Benceno
1,606	1,608	Tolueno
3,007	3,012	
3,091	3,098	Xilenos
3,850	3,858	
6,765	-	
6,954	-	
-	9,436	Etilbenceno

### Validación del método de análisis de hidrocarburos aromáticos BTEX

Para validar el método de GC-FID para la detección de compuestos BTEX, se evaluaron varios parámetros basados en investigaciones previas<sup>42-45</sup> utilizando el método de estándar externo (46). Las soluciones de concentración conocida fueron preparadas en el laboratorio, y se analizaron los siguientes criterios: linealidad, selectividad, precisión y concentración mínima detectable (CMD), cuyos resultados se presentan en la Tabla 4.

**Tabla 4:** Evaluación de la linealidad para hidrocarburos aromáticos y su CMD

COMPUESTO	Ecuación de la recta	R <sup>2</sup>	CMD en ppm
Benceno	$y = 227,02x + 50,444$	0,9956	0,40
Tolueno	$y = 247,23x - 12,275$	0,9956	1,73
Etilbenceno	$y = 163,56x - 61,055$	0,9976	4,72
Xileno 1	$y = 29,154x - 29,069$	0,9838	7,28
Xileno 2	$y = 132,53x + 6,7029$	0,9970	2,51
Xileno 3	$y = 37,187x + 14,609$	0,9955	1,43

### Evaluación de la capacidad de biodepuración de hidrocarburos aromáticos (BTEX) por *Parachlorella kessleri* a diferentes concentraciones y proporciones de BTEX (g) por UFC de *P. kessleri*

Se prepararon muestras de los hidrocarburos BTEX a tres diferentes concentraciones (10, 20 y 30 ppm) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se trabajó al 5 y 10% de volumen de fase orgánica respecto a la fase acuosa (60 mL). La fase acuosa constó de un cultivo de *P. kessleri* y medio BBM. Los resultados de la biodepuración se muestran en la tabla 5.

**Tabla 5:** Porcentaje de biodepuración de *P. Kessleri* a tres diferentes concentraciones de HC BTEX y 2 niveles de volumen (%) de fase orgánica/volumen de fase acuosa

Concentración en ppm de HC BTEX en CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	10		20		30							
	% (vol, fase orgánica/ vol, fase acuosa)		% (vol, fase orgánica/ vol, fase acuosa)		% (vol, fase orgánica/ vol, fase acuosa)							
	5	10	5	10	5	10						
	Prom	s	Prom	s	Prom	s	Prom	s	Prom	s	Prom	s
<b>Benceno</b>	77,2	4,3	40,8	51,5	46,1	7,6	95,6	4,2	75,0	5,0	93,6	7,3
<b>Tolueno</b>	58,2	5,0	31,6	37,6	34,6	4,3	41,8	3,4	73,4	11,8	78,1	3,6
<b>Etilbenceno</b>	35,1	20,3	27,7	10,5	19,1	12,2	78,4	6,2	23,2	1,9	66,0	6,7
<b>Xileno 1</b>	21,9	5,2	13,6	11,8	12,7	1,2	30,7	1,4	32,1	4,2	51,3	2,6
<b>Xileno 2</b>	64,2	3,4	33,8	43,0	38,4	6,5	73,3	7,7	66,1	10,8	73,7	4,3
<b>Xileno 3</b>	24,3	3,2	13,8	14,9	14,3	0,8	20,4	11,4	15,7	3,4	46,6	1,3

Prom: promedio de dos mediciones y s indica la desviación estándar de estas mediciones.

## CONCLUSIONES

Las características microscópicas, estructurales y macroscópicas del organismo estudiado confirman su pertenencia a la división Chlorophyta. La caracterización molecular validó que la microalga pertenece específicamente a la familia *Chlorellaceae*. El análisis del perfil genético de la región 18S rRNA, comúnmente utilizada para la identificación de microalgas, mostró homología con las especies *Parachlorella kessleri*, *Masaia oloidia* y *Dictyosphaerium sp.*. Por su parte, el análisis de la región 28S rRNA, una secuencia más extensa utilizada principalmente para eucariotas, reveló homología con *Micractinium reisseri*. Estas similitudes genéticas respaldan que cualquiera de las especies mencionadas podría ser una denominación taxonómica válida.

La cinética de crecimiento de *Parachlorella kessleri* evidenció su rápido desarrollo, con una velocidad específica de crecimiento de  $\mu = 0,0230 \text{ h}^{-1}$  y un tiempo de generación de  $G = 30,15 \text{ h}$ , características que la hacen particularmente adecuada para su cultivo y aplicación como agente biorremediador en aguas dulces.

Además, se determinó que *Parachlorella kessleri* es altamente eficiente en la biorremediación de hidrocarburos aromáticos BTEX. En un periodo de 5 días, bajo condiciones ambientales y sin aireación, logró remover el 95,6 % de benceno, 78,1 % de tolueno, 78,4 % de etilbenceno, y 51,3 %, 73,7 % y 46,6 % de los isómeros de xileno.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se llevó a cabo con el financiamiento del Vice-Rectorado de Investigación de la Universidad Católica de Santa María, Resolución 25260-R-2018.

## REFERENCIAS

1. Tezcan Demirel Y, Yati I, Donmez R, Bulbul Sonmez H. Clean-up of oily liquids, fuels and organic solvents from the contaminated water fields using poly(propylene glycol) based organogels. *Chemical Engineering Journal* 2017;312:126–35. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.11.124>.
2. Principles and practices for petroleum contaminated soils / edited by Edward J. Calabrese, Paul T. Kostecki. Lewis Publishers; 1993.
3. Jung D, Kim J-A, Park M-S, Yim UH, Choi K. Human health and ecological assessment programs for Hebei Spirit oil spill accident of 2007: Status, lessons, and future challenges. *Chemosphere* 2017;173:180–9. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.153>.
4. Moreira ITA, Oliveira OMC, Triguís JA, dos Santos AMP, Queiroz AFS, Martins CMS, et al. Phytoremediation using *Rizophora mangle* L. in mangrove sediments contaminated by persistent total petroleum hydrocarbons (TPH's). *Microchemical Journal* 2011;99:376–82. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2011.06.011>.
5. Prince RC. Crude Oil Releases to the Environment: Natural Fate and Remediation Options. Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences, Elsevier; 2014. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.09112-0>.
6. Borowitzka, M.A. High-value products from microalgae — their development and commercialisation. *Journal of Applied Phycology* 2013;25:743-756. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-9983-9>
7. Mata TM, Martins AA, Caetano NidiaS. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 2010;14:217–32. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>.
8. Milic J, Beskoski V, Ilic M, Ali S, Gojgic-Cvijovic G, Vrvic M. Bioremediation of soil heavily contaminated with crude oil and its products: Composition of the microbial consortium. *Journal of the Serbian Chemical Society* 2009;74:455–60. <https://doi.org/10.2298/JSC0904455M>.
9. Premnath N, Mohanrasu K, Guru Raj Rao R, Dinesh GH, Prakash GS, Ananthi V, et al. A crucial review on polycyclic aromatic Hydrocarbons - Environmental occurrence and strategies for microbial degradation. *Chemosphere* 2021;280:130608.



- <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130608>.
10. Fuentes S, Méndez V, Aguila P, Seeger M. Bioremediation of petroleum hydrocarbons: catabolic genes, microbial communities, and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2014;98:4781–94. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-014-5684-9>.
  11. Salgot M, Folch M. Wastewater treatment and water reuse. *Current Opinion in Environmental Science & Health* 2018;2:64–74. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coesh.2018.03.005>.
  12. Yu XZ, Wu SC, Wu FY, Wong MH. Enhanced dissipation of PAHs from soil using mycorrhizal ryegrass and PAH-degrading bacteria. *Journal of Hazardous Materials* 2011;186:1206–17. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.11.116>.
  13. Xu Y, Lu M. Bioremediation of crude oil-contaminated soil: Comparison of different biostimulation and bioaugmentation treatments. *Journal of Hazardous Materials* 2010;183:395–401. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.07.038>.
  14. Rawat I, Ranjith Kumar R, Mutanda T, Bux F. Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy* 2011;88:3411–24. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.11.025>.
  15. Dubey S, Chen C-W, Haldar D, Tambat VS, Kumar P, Tiwari A, et al. Advancement in algal bioremediation for organic, inorganic, and emerging pollutants. *Environmental Pollution* 2023;317:120840. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120840>.
  16. Choudhary P, Prajapati SK, Malik A. Screening native microalgal consortia for biomass production and nutrient removal from rural wastewaters for bioenergy applications. *Ecological Engineering* 2016;91:221–30. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2015.11.056>.
  17. Prajapati SK, Choudhary P, Malik A, Vijay VK. Algae mediated treatment and bioenergy generation process for handling liquid and solid waste from dairy cattle farm. *Bioresource Technology* 2014;167:260–8. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.06.038>.
  18. Park JBK, Craggs RJ, Shilton AN. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresource Technology* 2011;102:35–42. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.158>.
  19. El-Sheekh MM, Hamouda RA, Nizam AA. Biodegradation of crude oil by *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella vulgaris* growing under heterotrophic conditions. *International Biodeterioration & Biodegradation* 2013;82:67–72. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.12.015>.
  20. Gondi R, Kavitha S, Yukesh Kannah R, Parthiba Karthikeyan O, Kumar G, Kumar Tyagi V, et al. Algal-based system for removal of emerging pollutants from wastewater: A review. *Bioresource Technology* 2022;344:126245. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126245>.
  21. Ñañez KB, Rios Ramirez KD, Cordeiro de Oliveira OM, Reyes CY, Andrade Moreira ÍT. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from produced water using the microalgae *Chlorella vulgaris* cultivated in mixotrophic and heterotrophic conditions. *Chemosphere* 2024;356:141931. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.141931>.

22. Bischoff HW, Bold HC. *Phycological Studies IV. Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species.* University of Texas, 1963.
23. Band Schmidt CJ. *Métodos y Herramientas Analíticas en la Evaluación de la Biomasa Microalgal.* In: Arredondo Vega BO, Voltolina D (eds). Departamento de Plancton y Ecología Marina., 2017, pp. 3–4.
24. Arredondo BO, Voltolina D. *Métodos y Herramientas Analíticas en la Evaluación de la Biomasa Microalgal.* In: Arredondo Vega BO, Voltolina D (eds). Laboratorio de Biotecnología de Microalgas., 2017, pp. 21–29.
25. Thermo Fisher Scientific Inc. Thermo Fisher. [En línea]; 2024 [accesado en Octubre 2024]. Disponible en:  
<https://www.thermofisher.com/pe/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/molecular-spectroscopy/uv-vis-spectrophotometry/software.html>
26. Cho C, Nam K, Seo YH, et al. Study of Optical Configurations for Multiple Enhancement of Microalgal Biomass Production. *Scientific Reports*; (9). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38118-w>.
27. Zuliani L, Frison N, Jelic A, et al. Microalgae Cultivation on Anaerobic Digestate of Municipal Wastewater, Sewage Sludge and Agro-Waste. *International Journal of Molecular Sciences.* 2016; (17): 1692. <https://doi.org/10.3390/ijms17101692>.
28. Tear CJY, Lim C, Wu J, et al. Accumulated lipids rather than the rigid cell walls impede the extraction of genetic materials for effective colony PCRs in *Chlorella vulgaris*. *Microbial Cell Factories*; (12). <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-106>.
29. Duong VT, Ahmed F, Thomas-Hall SR, et al. High Protein- and High Lipid-Producing Microalgae from Northern Australia as Potential Feedstock for Animal Feed and Biodiesel. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*; (3). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00053>.
30. Lim DKY, Garg S, Timmins M, et al. Isolation and Evaluation of Oil-Producing Microalgae from Subtropical Coastal and Brackish Waters. *PLoS ONE.* 2012; (7): e40751. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040751>.
31. Sonnenberg R, Nolte AW, Tautz D. An evaluation of LSU rDNA D1-D2 sequences for their use in species identification. *Frontiers in Zoology*; (4). <https://doi.org/10.1186/1742-9994-4-6>.
32. Abou-Shanab RAI, Matter IA, Kim S-N, et al. Characterization and identification of lipid-producing microalgae species isolated from a freshwater lake. *Biomass and Bioenergy.* 2011; (35): 3079–3085. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.04.021>.
33. Medina-Cabrera EV. *Investigation and Optimization of Exopolysaccharide (EPS) Production by Microalgae.* Phdthesis, Technische Universität München.
34. Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, et al. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics.* 2009; (10). <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>.
35. Leonard M, Sidisky, Buchana MD. *Mixing Water and Gas: The Quantitative Measurement of Water by Gas Chromatography Using Ionic Liquid Capillary Columns.* Chromatography Today.
36. Pratt R. Influence of auxins on the growth of *Chlorella vulgaris*. *American Journal of Botany.* 1938; (25): 498–501. <https://doi.org/10.2307/2436677>.
37. Beijerinck MW. *Culturversuche mit Zoochlorellen, Lichen-Engonidien und Anderen Niederen Algen I-III.* *Botanische Zeitung* 1890; (48): 726–740.

38. Kuhl A, Lorenzen H. Chapter 10 Handling and Culturing of *Chlorella*. In: *Methods in Cell Biology* Volume 1. Elsevier, 1964, pp. 159–187. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)62092-0](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)62092-0).
39. Solymosi K. Plastid Structure, Diversification and Interconversions I. *Algae. Current Chemical Biology*. 2013; (6): 167–186. <http://dx.doi.org/10.2174/2212796811206030002>.
40. Ilavarasi A, Mubarakali D, Praveenkum R, et al. Optimization of Various Growth Media to Freshwater Microalgae for Biomass Production. *Biotechnology(Faisalabad)*. 2011; (10): 540–545. <https://doi.org/10.3923/biotech.2011.540.545>.
41. Burrell RobertE, Inniss WilliamE, Mayfield ColinI. Development of an optimal heterotrophic growth medium for *Chlorella vulgaris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*; (20). <https://doi.org/10.1007/BF00250641>.
42. Dórea HS, Bispo JRL, Aragão KAS, et al. Analysis of BTEX, PAHs and metals in the oilfield produced water in the State of Sergipe, Brazil. *Microchemical Journal*. 2007; (85): 234–238. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2006.06.002>.
43. Parra I, Chávez G, Luciani Y, et al. Optimización de un sistema purga y trampa/cromatografía de gases para la determinación de hidrocarburos aromáticos volátiles (BTEX) en agua. *Ciencia (Maracaibo)*. 2004; (12): 205–214.
44. Assadi Y, Ahmadi F, Hossieni MRM. Determination of BTEX Compounds by Dispersive Liquid–Liquid Microextraction with GC–FID. *Chromatographia*. 2010; (71): 1137–1141. <https://doi.org/10.1365/s10337-010-1616-8>.
45. Sarafraz-Yazdi A, Amiri AH, Es'haghi Z. Separation and determination of benzene, toluene, ethylbenzene and o-xylene compounds in water using directly suspended droplet microextraction coupled with gas chromatography-flame ionization detector. *Talanta*. 2009; (78): 936–941. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.12.069>.
46. Natangelo M, Tavazzi S, Benfenati E. Evaluation of solid phase microextraction–gas chromatography in the analysis of some pesticides with different mass spectrometric techniques: Application to environmental waters and food samples. *Analytical Letters*. 2002; (35): 327–338. <https://doi.org/10.1081/AL-120002533>.