



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

TESIS

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE
HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN
BIOMASA MICROALGAL ENCAPSULADA**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

PRESENTA

PEDRO EDUARDO CASTILLO DEL RÍO

DIRECTOR: DRA MARTHA PATRICIA GARCÍA CAMACHO

ASESOR: DR. JUAN CARLOS VÁZQUEZ LIRA

Ciudad de México

2017



**FES
ZARAGOZA**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNAM- Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL.

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente	Q.F.B Irma Alejandre Razo
Vocal	Dra. Martha Patricia García Camacho
Secretario	Dr. Juan Carlos Vázquez Lira
Suplente	Mtra. Ma. Isabel Garduño Posadas
Suplente	Q.F.B Chairel Ivonne Díaz Estrada

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 208 "Análisis de trazas" del edificio F2 y el anexo 3D del edificio A, de la Facultad de Química.

Dra. Martha Patricia García Camacho

Directora

Dr. Juan Carlos Vázquez Lira

Asesor

AGRADECIMIENTOS:

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por la formación profesional y los múltiples conocimientos adquiridos a lo largo de mi estancia académica.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) por el apoyo y la beca otorgada en el proyecto PAPIIT IT203214.

A la Facultad de Química de la UNAM por permitirme realizar la tesis en sus instalaciones y por el apoyo otorgado por el Programa de Apoyo a la Investigación y al Posgrado (PAIP).

A la Dra. Martha Patricia García Camacho por permitirme realizar este proyecto y por su asesoría durante la realización del proyecto.

A la M. en C. María del Rosario Covarrubias por su paciencia y apoyo durante cada etapa del proceso experimental.

A mis compañeros de laboratorio por su ayuda en momentos de apremio y el apoyo a lo largo de mi estancia en el laboratorio. Especialmente a Jahziel Sánchez Huesca por su amistad desde la licenciatura; siempre puedes contar conmigo, como sé que tú siempre estarás para mí.

DEDICATORIA:

A mis padres porque siempre han sabido ser para mí un bastión en mi vida, no solo me han brindado la oportunidad de tener una educación profesional, también me han formado como persona. Los amo y siempre estaré agradecido con ustedes.

A mi hermana por siempre estar conmigo y apoyarme durante toda mi vida. Toda mi confianza está en ti, sé que eres una persona realmente inteligente y que lograrás muchas más cosas importantes en tu vida. ¡Te amo!

A mi familia por su apoyo incondicional, por permitirme realizar una de muchas metas trazadas y por su amor constante. Mis abuelos que han sido como mis otros padres, tengo la dicha de amarlos y que ellos me amen a mí. A mi abuelo Pedro que siempre confió en mí y desde el cielo está presente en cada paso que doy. A mis tíos, primos y en general toda mi familia, solo me queda decirles que siempre los quiero a mi lado.

A mis amigos por brindarme momentos inolvidables, por sus palabras de aliento y su amistad que perdura. A todos aquellos que conocí desde hace tiempo y que aún siguen perteneciendo a mi vida, también a los que alguna vez pertenecieron y ahora no tenemos el contacto que quisiéramos. Especialmente a aquellos amigos que estoy seguro seguiré viendo: Axel, Jahziel, Bryan, Jorge, Daniel Medel, Daniel Cortés, Miguel, Fredy, Fátima y Elsa.

ÍNDICE

Abreviaturas.....	9
Índice de figuras	10
Índice de tablas	12
Resumen	13
Introducción.....	13
CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO.....	18
1.1. Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs)	18
1.1.1 Definición y propiedades	18
1.1.2 Fuentes de los HAPs.....	22
1.1.3 Toxicidad.....	25
1.1.4 HAPs en México.....	27
1.1.5 Remoción de los HAPs.....	29
1.2 Análisis de HAPs en muestras de agua	36
1.2.1 Análisis de HAPs	37
1.3 Cromatografía de líquidos de alta resolución	37
1.3.1 Parámetros cromatográficos.....	40
1.4 Extracción de HAPs de muestras complejas.....	42
1.4.1 Extracción en fase sólida (EFS)	44
1.4.2 Dispersión de matriz en fase sólida (DMFS).....	47
1.5 Generalidades sobre algas.....	50
1.5.1 <i>Selenastrum capricornutum</i>	53
1.5.2 <i>Scenedesmus acutus</i>	53
1.6 Inmovilización de células	54
1.6.1 Inmovilización de microalgas	56
1.6.2 Inmovilización pasiva	58
1.6.3 Inmovilización activa	59
1.6.3.1 Agentes floculantes.....	60
1.6.3.2 Fijación química.....	60
1.6.3.3 Atrapamiento en gel.....	60

1.6.4	Inmovilización en alginato	63
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....		66
HIPÓTESIS.....		66
OBJETIVOS		68
CAPÍTULO 2. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....		68
MATERIAL Y MÉTODOS		70
2.1	Equipos, materiales y reactivos.....	70
2.1.1	Equipos	70
2.1.2	Materiales.....	71
2.1.3	Reactivos/ Disolventes.....	72
2.1.3	Cepas y medios de cultivo	73
2.2	Procedimiento experimental.....	73
2.3	Implementación de la separación analítica.....	76
2.3.1	Soluciones estándar	77
2.3.2	Implementación de la separación cromatográfica	77
2.4	Validación del sistema cromatográfico	78
2.4.1	Linealidad del sistema.....	78
2.4.2	Precisión del sistema	78
2.4.3	Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC) del sistema..	79
2.5	Optimización de la extracción por DMFS.....	79
2.5.1	Acondicionamiento del adsorbente y obtención de la muestra.....	79
2.5.2	Dispersión de matriz en fase sólida.....	80
2.6	Manejo de microorganismos	82
2.6.1	Obtención de las muestras para DMFS	83
2.6.2	Curvas de crecimiento	84
2.6.3	Inmovilización/ <i>desinmovilización</i> de algas	85
2.6.4	Viabilidad celular: Resiembra	86
2.6.5	Conteo de células	86
2.7	Validación del método DMFS- CLAR-UV.....	88
2.7.1	Linealidad del método DMFS- CLAR-UV.....	88
2.7.2	Precisión del método DMFS- CLAR-UV	89
2.7.3	Límite de detección (L.D.) y límite de cuantificación (L.C.) del método DMFS- CLAR-UV.....	90

2.8	Bioensayos.....	90
2.8.1	Bioensayo (1) de exposición <i>S. capricornutum</i> con BaP	93
2.8.2	Bioensayo (2) de exposición <i>S. capricornutum</i> con mezcla BaP/BaA....	94
2.8.3	Bioensayo (3) de exposición <i>S. acutus</i> con mezcla BaP/BaA	94
2.8.4	Bioensayos (4) con doble número de células y mezcla de <i>S acutus/S capricornutum</i>	95
2.8.4.1	Preparación del doble de microalgas por cuenta	95
2.8.4.2	Mezcla de perlas de cada especie	96
2.8.5	Determinación de los HAPs en el alginato disuelto después de exposición	97
CAPÍTULO 3. Resultados y discusión de resultados		98
RESULTADOS.....		98
3.1	Implementación de la separación cromatográfica	98
3.2	Validación del sistema.....	100
3.2.1	Linealidad del sistema.....	100
3.2.2	Precisión/ límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC) del sistema	102
3.3	Optimización de la extracción de los HAPs por DMFS.....	103
3.4	Validación del método	104
3.4.1	Linealidad del método DMFS- CLAR-UV.....	104
3.4.2	Precisión del método DMFS- CLAR-UV	106
3.4.3	Límite de detección (L.D.) y límite de cuantificación (L.C.).....	107
3.5	Manejo de microorganismos	107
3.5.1	Crecimiento de microalgas.....	107
3.5.2	Viabilidad celular: Resiembra	109
3.5.3	Conteo de células	112
3.6	Bioensayos de exposición	115
3.6.1	Bioensayo 1. Exposición <i>S. capricornutum</i> inmovilizada con BaP	115
3.6.2	Bioensayo 2. Exposición de <i>S. capricornutum</i> inmovilizada con BaP/BaA en agua potable	116
3.6.3	Bioensayo 3. Exposición de <i>S. acutus</i> inmovilizada con BaP/BaA en agua potable.....	119
3.6.4	Bioensayo 4. Exposición con doble de células y mezcla de especies..	122
DISCUSIÓN		124

3.7 Comparación de bioensayos.....	124
3.7.1 Comparación de la sorción de BaA/ BaP por <i>S acutus</i> / <i>S. capricornutum</i> (bioensayos 2 y 3)	124
3.7.2 Comparación del efecto del doble de células y mezcla de especies para BaA/BaP por <i>S acutus</i> / <i>S. capricornutum</i> (bioensayo 4)	128
3.8 Determinación de los HAPs en el alginato disuelto después de exposición	132
CAPÍTULO 4. Conclusiones	134
PERSPECTIVAS	136
ANEXOS	137
Anexo I: Cromatograma de la disolución estándar de la mezcla BaA y BaP a 4 mg/L	137
Anexo II: Ensayos de dispersión de matriz en fase sólida	137
Anexo III: Bioensayos de exposición	139
BIBLIOGRAFÍA	150

Abreviaturas

ACN	Acetonitrilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
BaA	Benzo(a)antraceno
BaP	Benzo(a)pireno
CG	Cromatografía de gases
CH₄	Metano
CO₂	Dióxido de carbono
DMFS	Dispersión en fase sólida
EFL	Extracción por fase sólida
EFS	Extracción en fase sólida
ELL	Extracción líquido-líquido
ERO	Especies reactivas de oxígeno
H₂O	Agua
HAPs	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
HPLC	High performance liquid chromatography
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LMP	Límites Máximos Permisibles
MC	Máxima concentración
MeOH	Metanol
NOM	Norma Oficial Mexicana
POAs	Procesos de Oxidación Avanzadas
SEMARNAT	Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales
US-EPA	United States Environmental Protection Agency

Índice de figuras

Figura 1.1. Fuentes de los HAPs

Figura 1.2 Esquema de un equipo de HPLC

Figura 1.3 Pasos que componen la EFS

Figura 1.4. Etapas que componen la DMFS

Figura 1.5 Microfotografía de *S. capricornutum*

Figura 1.6 Cultivo de *S. acutus*. Fotografía tomada con aumento de 40x

Figura 1.7 Métodos para inmovilización de células viables

Figura 1.8. Estructura del alginato. El β -D-ácido manurónico indicado por la letra M y el α -L ácido gulurónico por la letra G

Figura 2.0. Esquema general de experimentación

Figura 2.1 Cromatógrafo Waters utilizado durante el proceso experimental

Figura 2.2 Metodología general de la dispersión de matriz en fase sólida

Figura 2.3 Mantenimiento de algas y agitación de medios de cultivo

Figura 2.4 Cultivo de *S. capricornutum* con absorbancia 1

Figura 2.5 Metodología general de la inmovilización y recuperación de la biomasa

Figura 2.6 Bioensayos realizados en el agitador orbital Thermo Scientific

Figura 3.1 Linealidad del sistema para BaA

Figura 3.2 Linealidad del sistema para BaP

Figura 3.3 Cantidad de BaA recuperada en función de la cantidad adicionada en la biomasa

Figura 3.4 Cantidad de BaP recuperada en función de la cantidad adicionada en la biomasa

Figura 3.5 Absorbancia de los cultivos de las algas a través del tiempo

Figura 3.6 Número de células/mL de cada alga a través del tiempo

Figura 3.7 . A. Tubos en los que se realizó la resiembra de *S. acutus*. B. Células de *S. acutus* observadas al microscopio con aumento de 40x.

Figura 3.8 Número de células presentes de *S. acutus* con y sin inmovilización

Figura 3.9 Número de células presentes de *S. capricornutum* con y sin inmovilización

Figura 4.0 Cantidad de BaP (ng) presente en biomasa de *S. capricornutum*

Figura 4.1 BaA presente en biomasa de *S. capricornutum* a través del tiempo

Figura 4.2 BaP presente en biomasa de *S. capricornutum* a través del tiempo

Figura 4.3 BaA presente en biomasa de *S. acutus* a través del tiempo

Figura 4.4 BaP presente en biomasa de *S. acutus* a través del tiempo

Figura 4.5 Sorción de BaA en ensayos de doble de células y mezcla de algas

Figura 4.6 Sorción de BaP en ensayos de doble de células y mezcla de algas

Figura 4.7 Sorción de BaA en biomasa por parte de ambas algas

Figura 4.8 Sorción de BaP en biomasa por parte de ambas algas

Figura 4.9 Cantidad de BaA encontrada en biomasa de *S. acutus* y *S. capricornutum*

Figura 5.0 Cantidad de BaP encontrada en biomasa de *S. acutus* y *S. capricornutum*

Figura 5.1 Comparación de los picos obtenidos por EFS para BaP con *S. capricornutum*

Figura 5.2 Comparación de los picos del BaP obtenidos por EFS del alginato disuelto con un estándar de 1 mg/L.

Índice de tablas

Tabla 1.1 Propiedades fisicoquímicas de los 16 HAPs principales

Tabla 1.2 Hidrocarburos que se analizan en base al producto contaminante

Tabla 1.3 Límites Máximos Permisibles para HAPs en suelo

Tabla 1.4 Ejemplos de hongos y algas que degradan HAPs (Doyle et al., 2008).

Tabla 1.5 Ventajas y limitaciones de células libres e inmovilizadas en el tratamiento de aguas residuales

Tabla 1.6 Comparación entre los diferentes métodos de inmovilización artificial de microorganismos

Tabla 2.1 Componentes para la preparación de medio Bristol. El volumen de solución “stock” para 1 L de cultivo

Tabla 2.2 Concentraciones de HAPs ($\mu\text{g}/\text{mg}$) añadidos a la biomasa (5 mg) y concentración esperada (mg/L) en el extracto de 1 mL

Tabla 3.1 Valores promedio de los parámetros evaluados para la eficiencia de la columna Gemini y los valores calculados para los analitos de interés. El número de platos teóricos (N) se indica por columna y por metro (N/m)

Tabla 3.2 Valores de repetibilidad (disolución 4 mg/L) y LD /LC obtenidos para la validación del sistema cromatográfico

Tabla 3.3 Repetibilidad obtenida en los distintos ensayos a una única concentración de 4 mg/L

Tabla 3.4 Repetibilidad, reproducibilidad, LD y LC obtenidos para la validación del método

Resumen

Se evaluó la capacidad de sorción de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), Benzo[a]antraceno (BaA) y Benzo[a]pireno (BaP por parte de microalgas inmovilizadas en cuentas de alginato de calcio. Se aplicó un método cromatográfico previamente desarrollado y validado para la cuantificación de hidrocarburos en cultivos de microalgas inmovilizadas en alginato expuestas a dichos contaminantes en agua. Se manejaron las especies *Scenedesmus acutus* y *Selenastrum capricornutum*, aislando a los analitos de la biomasa mediante la técnica de dispersión de matriz en fase sólida (DMFS) y analizando los extractos por cromatografía de líquidos de alta resolución con detección espectrofotométrica en el ultravioleta (CLAR-UV). Se realizaron diferentes bioensayos de exposición a los contaminantes en donde se observó que *S. capricornutum* sorbió la mayor cantidad de BaP y BaA a las 15 h y *S. acutus* lo hizo a las 24 h. Esta última retiene a los hidrocarburos a un mayor tiempo que la otra especie debido a que presenta una degradación más lenta.

Introducción

El uso de procedimientos biológicos para la degradación de compuestos potencialmente tóxicos constituye una alternativa práctica a las tecnologías tradicionales para remediar la contaminación. La efectividad de la biorremediación en la desintoxicación de productos químicos potencialmente peligrosos que contaminan el suelo y el agua es directamente proporcional a la estructura química de los contaminantes.

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son una clase importante de xenobióticos (sustancias ajenas o extrañas a la composición y metabolismo natural de los organismos vivos) que persisten principalmente en suelos y sedimentos, aunque también puede encontrarse en el aire y en el agua. Los HAPs son contaminantes persistentes que se forman como subproductos de combustibles fósiles y residuos del procesamiento del carbón. Son ubicuos como contaminantes de petróleo y carbón, y son particularmente de preocupación ambiental debido a sus propiedades tóxicas, mutagénicas y carcinogénicas. Debido a su persistencia en el medio ambiente y su genotoxicidad, muchos esfuerzos en la investigación han estado dirigidos a la remediación de sitios contaminados con HAPs. Estos pueden ser removidos de los lugares donde contaminan por medio de degradación microbiana; por la volatilización, la foto-oxidación, oxidación química y bioacumulación.

Los HAPs con cuatro y cinco anillos de benceno fusionados son más resistentes a la biodegradación que aquellos que sólo tienen dos o tres anillos. Su

carcinogenicidad y lipofilia resultan en un riesgo para la salud humana y para el medio ambiente. Un factor que limita su degradación es la pobre biodisponibilidad causado por su baja solubilidad en agua, una baja velocidad de disolución y la fuerte adsorción a la matriz del suelo.

Los hidrocarburos de 3 anillos predominan principalmente en la superficie de aguas y aceites, mientras que los HAPs de 4 anillos se encuentran en su mayoría en los sedimentos. Los HAPs no solo afectan la salud del ser humano, pueden ser un serio problema para ecosistemas acuáticos; un cuerpo de agua puede actuar como fuente de HAP en el medio ambiente. Los HAPs entran en un cuerpo de agua a través de la descarga de aguas residuales, deposición atmosférica (Franz et al; 1998) y otros medios, como fugas de petróleo crudo (Heemken et al; 1998). Los HAPs existen en varias formas en los sistemas acuáticos, incluyendo la fase libre disuelta, la fase ligada a la materia orgánica disuelta (DOM por sus siglas en inglés), la fase adsorbida a la materia en suspensión (SPM por sus siglas en inglés) y la fase asociada con los sedimentos superficiales. ¹

A pesar de la variedad de alternativas, el tratamiento utilizando microorganismos para remover los HAPs en sedimentos y cuerpos de agua constituye un método más económico que el uso de algún otro método físico o químico. El empleo de bacterias y hongos hoy está ampliamente estudiado, al grado de conocer las enzimas específicas que emplea cada uno de los microorganismos.

Para el caso de la biorremediación por microalgas existen pocos reportes en la literatura, aunque el uso de microalgas verdes para la remoción de HAPs de baja masa molar se conoce desde hace varios años, y sólo en años recientes se ha estudiado el uso de microalgas para la remoción de los HAPs de alta masa molar.

Entre las especies más utilizadas se encuentran *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus platydiscus*, *Scenedesmus quadricauda*, *Scenedesmus acutus*, *Selenastrum capricornutum*, *Skeletonema costatum* y *Nitzschia sp.*²

Cada una de estas especies presenta diferentes mecanismos de remoción, los cuales pueden consistir en bioacumulación (acumulación gradual de los hidrocarburos en los microorganismos) o en degradación (transformación de los hidrocarburos en sustancias menos tóxicas), los cuales dependen de la morfología, tamaño (radio de las células) y la concentración de las algas en el medio. La remoción y biodegradación de HAPs de bajo peso molecular mediante diversos tipos de microorganismos han sido ampliamente reportadas, así como algunas vías metabólicas bacterianas aeróbicas para determinados compuestos como naftaleno y antraceno (Peng et al., 2008). Por ejemplo, para el BaP, la degradación microbiológica se practica más con respecto a otras como la fotólisis o la volatilización.³

La inmovilización de las células pretende establecer ventajas con respecto a las células libres como: el aumento de la actividad metabólica y la producción de metabolitos, la protección contra sustancias tóxicas y el aumento de la estabilidad del plásmido de células encapsuladas en comparación a células libres⁴; el atrapamiento en geles permite un procedimiento de inmovilización suave (permeabilidad, toxicidad nula y transparencia de la matriz formada). La inmovilización con alginato de calcio se explica con el modelo de la caja de huevo, donde dos pares de dos unidades G consecutivas, cada par perteneciente a diferentes cadenas poliméricas, se "pegan" conjuntamente mediante la coordinación de un catión Ca^{2+} . El anillo de azúcar del ácido gulurónico está en la

conformación 1C_4 , y la cadena de polímero adopta una forma característica en zigzag.

En el presente trabajo se implementó y se re-validó una metodología analítica para la determinación de los HAPs de alta masa molar (BaA y BaP) en biomasa de dos diferentes especies de microalgas (*S. acutus* y *S. capricornutum*) que estuvieron encapsuladas en cuentas de alginato para su exposición a los contaminantes en agua potable. La técnica utilizada para el aislamiento de los analitos fue la DMFS y para el análisis de los extractos, la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) con detección espectrofotométrica UV. La metodología utilizada DMFS-CLAR-UV permitió la cuantificación de los dos HAPs en la biomasa microalgal encapsulada expuesta a los contaminantes a diferentes tiempos de incubación.

El trabajo realizado presenta un complemento a los trabajos realizados con anterioridad, los cuales han sido mayormente dirigidos a evaluar la remoción de los HAPs de medio de cultivo utilizando la técnica de extracción en fase sólida (EFS). La sorción que puedan presentar las algas inmovilizadas ante la mezcla de hidrocarburos mediante DMFS representa un apoyo a la alternativa que representa la degradación microbiana ante el problema ambiental provocado por los HAPs.

CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO

1.1. Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs)

1.1.1 Definición y propiedades

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos son sustancias lipofílicas, producto de la combustión incompleta de combustibles fósiles y son ubicuos en la naturaleza. Algunos de estos productos químicos son particularmente de preocupación ambiental debido a su potencial genotóxico y cancerígeno y su persistencia en el medio ambiente. En los últimos años, muchos investigadores han realizado investigaciones centradas en la biodegradación de los contaminantes. Los HAPs con cuatro y cinco anillos de benceno fusionados son más resistentes a la biodegradación que aquellos que sólo poseen dos o tres anillos. ¹

Los HAPs poseen una alta transferencia trófica y bioamplificación dentro de los ecosistemas debido a la naturaleza lipófila y la baja solubilidad en agua que disminuye con el peso molecular.

Los HAPs son un grupo de más de cien compuestos orgánicos conocidos por su toxicidad y persistencia medio ambiental. Sus propiedades fisicoquímicas están determinadas por su sistema de electrones pi conjugado, el cual depende de los anillos aromáticos y del peso molecular. Los HAPs con dos o tres anillos aromáticos condensados se consideran de bajo peso molecular, mientras que si poseen cuatro o más anillos aromáticos condensados son considerados de alto peso molecular. Los HAPs también pueden clasificarse como alternantes si su estructura se

compone enteramente de anillos de benceno, o no alternantes si cuatro, cinco o seis miembros no aromáticos están incluidos en su estructura. ⁵

Los HAPs con menores presiones de vapor están asociados con las partículas, mientras que aquellos con presiones de vapor mayores se encuentran en forma de vapor a temperatura ambiente en el aire. En general, la solubilidad de los PAHs disminuye y la hidrofobicidad aumenta con un aumento en el número de anillos de benceno asociados. La volatilidad disminuye a medida que el número de anillos aromáticos condensados aumenta.

Dieciséis HAPs se han incluido en la lista de contaminantes prioritarios para los Estados Unidos (US-EPA, 2008) por su potencial carcinogénico, efectos mutágenos y teratógenos en organismos, incluidos los humanos. Parece ser que su carácter carcinógeno y genotóxico está relacionado con la formación de epóxidos de diol unido covalentemente al ADN.

La tabla 1.1, adaptada de Bojes y Pope⁶ et al., 2009, presenta a los 16 HAPs listados por la US-EPA como prioritarios, incluyendo algunas de sus características físico-químicas como: estructura, peso molecular, solubilidad y presión de vapor. En este trabajo, se usaron el Benzo(a)pireno y Benzo(a)antraceno, los cuáles presentan 5 y 4 anillos en su estructura, respectivamente.

Tabla 1.1 Propiedades fisicoquímicas de los 16 HAPs principales

Compuesto	No.CAS	Estructura (número de anillos)	Peso molecular (g/mol)	Solubilidad (mg/l)	Presión de vapor
Benzo(a)antraceno (BaA)	[56-55-3]	4	228.29	0.011	1.54E-07
Criseno (Chr)	[218-01-9]	4	228.29	0.0015	7.80E-09
Pireno (Pyr)	[129-00-0]	4	202.26	0.132	4.25E-06
Benzo(a)pireno (BaP)	[50-32-8]	5	252.32	0.0038	4.89E-09
Benzo(b)fluoranteno (BbFL)	[205-99-2]	5	252.32	0.0015	8.06E-08
Benzo(k)fluoranteno (BkFL)	[207-08-9]	5	252.32	0.0008	9.59E-11
Dibenzo(a,h)antraceno (DBA)	[53-70-3]	6	278.35	0.0005	2.10E-11
Benzo(g,h,i)perileno (BghiP)	[191-24-2]	6	276.34	0.00026	1.00E-10
Indeno [1,2,3-cd]pireno (InP)	[193-39-5]	6	276.34	0.062	1.40E-10

Tabla 1.1 Propiedades fisicoquímicas de los 16 HAPs principales (continuación)

Compuesto	No.CAS	Estructura (número de anillos)	Peso molecular (g/mol)	Solubilidad (mg/ L)	Presión de vapor
Naftaleno (Nap)	[91-20-3]	2	128.17	31	8.89E-02
Acenafteno (AcP)	[83-32-9]	3	154.21	3.8	3.75E-03
Acenaftileno (AcPy)	[208-96-8]	3	152.20	16.1	2.90E-02
Antraceno (Ant)	[120-12-7]	3	178.23	0.045	2.55E-05
Fenantreno (Phe)	[85-01-8]	3	178.23	1.1	6.80E-04
Fluoreno (Flu)	[86-73-7]	3	166.22	1.9	3.24E-03
Fluoranteno (FL)	[206-44-0]	4	202.26	0.26	8.13E-06

1.1.2 Fuentes de los HAPs

Masivas cantidades de HAPs procedentes de diferentes actividades industriales como refinación del petróleo, la producción de coque, carbón y quema de gasolina, descarga de aguas residuales y derrame de petróleo, emisión vehicular, etc han entrado a nuestro entorno. Cada año, aproximadamente 9406 toneladas métricas de HAPs son producidas en Estados Unidos, Suecia y Noruega. Estos compuestos son persistentes y se acumulan en suelos, sedimentos y en la biota. ⁷

Los HAPs se encuentran en una amplia gama de ambientes, los cuales incluyen suelos, sedimentos, aguas subterráneas y la atmósfera. Se han detectado en las emisiones del motor, tabaco y en alimentos como las carnes ahumadas, pescado, verduras de hoja verde, grasas y aceite. En los ambientes acuáticos los HAPs tienden a adsorber partículas orgánicas y la mayoría de HAPS en estos ambientes se concentra en los sedimentos o está asociado a la presencia de sólidos suspendidos en aguas superficiales.

Los compuestos como los HAPs se generan durante la combustión incompleta de materiales que contienen carbón e hidrógeno, combustible de carbón, petróleo crudo, madera, gas y materiales orgánicos, tanto como: combustión del polipropileno y poliestireno, residuos comunes/industriales y neumáticos usados. El proceso de combustión es incompleto cuando la temperatura de combustión es baja y cuando no hay acceso para el aire. Las plantas industriales y calefacción constituyen la principal fuente de HAPs (51%), seguido por la incineración de materia orgánica y combustión al aire libre (28%), las industrias de aluminio, fundidoras de acero e ingeniería de gas (20%) y el transporte terrestre (0.9 %).⁸

Entre las fuentes naturales de HAPs, los incendios forestales y las erupciones volcánicas son de gran importancia.

Las fuentes antropogénicas de HAPs incluyen la combustión de combustibles fósiles, alquitrán, madera, basura, lubricantes y filtros de aceite. La persistencia de estos compuestos aumenta conforme aumenta su peso molecular. Esto ha llamado pronto la atención debido a su presencia en todos los componentes del medio ambiente, la resistencia a la biodegradación, su potencial bioacumulación y su actividad cancerígena. Los peligros asociados con los HAPs se pueden superar mediante el uso de métodos convencionales que implican la eliminación, alteración o aislamiento del contaminante. La biorremediación resulta ser la herramienta para transformar los compuestos en formas menos peligrosas o no peligrosas.³

Los HAPs se liberan a la atmósfera principalmente a través de emisiones gaseosas, pero también pueden ser descargados de los compartimientos del suelo y del agua mediante evaporación o resuspensión de partículas. Una vez en el ambiente, los HAPs están sujetos a un transporte de rango corto-largo. Se eliminan por deposición húmeda y seca sobre el agua, el suelo y vegetación; estos compuestos también pueden llegar a sistemas acuáticos a través de filtraciones naturales de aceites, por deposición atmosférica y/o a través de descargas accidentales o intencionales, principalmente de la extracción del petróleo, transporte y refinación.⁵ Las fuentes de donde provienen los HAPs y su interrelación se presentan en un esquema en la Figura 1.1.

Numerosos factores bióticos y abióticos afectan la degradación de los HAPs en medios tales como el suelo. El número de anillos aromáticos presentes y las

propiedades químicas de los HAPs tienen un mayor efecto en su destino ambiental; aquellos que poseen compuestos con mayor peso molecular persisten por más tiempo. A pesar que los factores abióticos como el pH, el contenido de humedad, los niveles de oxígeno y la disponibilidad de las nutrientes influenciada por la degradación de los HAPs, es claro que los procesos microbianos son en gran parte responsables de la mayor degradación. El metabolismo de los HAPs de bajo peso molecular es mejor entendido, con una considerable cantidad de información existente en la actualidad de las vías, enzimas y la genética de la degradación de los HAPs, particularmente las *pseudomonas*.⁹

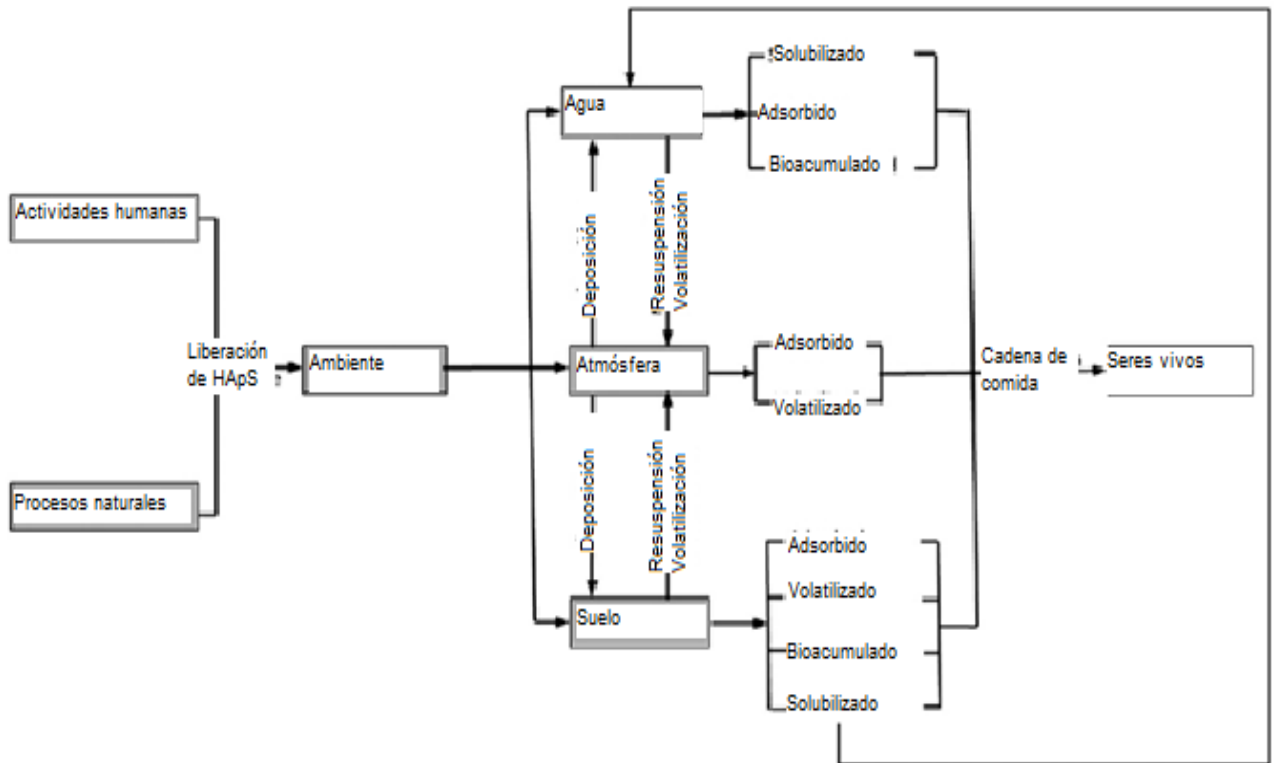


Figura 1.1 Fuentes de los HAPs. ⁹ (Rubio-Clemente et al., 2014)

1.1.3 Toxicidad

La toxicidad de los HAPs puede oscilar entre no tóxico hasta extremadamente tóxico para los seres humanos; muchos HAPs son mutagénicos (Mielzynska et al., 2006), carcinogénicos (Bostrom et al., 2002), y teratogénicos (Singh et al., 2008). Los HAPs se encuentran entre los compuestos orgánicos que causan mayores riesgos debido a sus propiedades cancerígenas (IARC, 1987), y genotóxicas (Kawanaka et al., 2004; Villalobos-Pietrini et al., 2007), asociadas a partículas atmosféricas de diferentes tamaños (Venkataraman et al., 1994, Allen et al., 2008) que pueden influir en su deposición en los pulmones humanos .¹⁰

Los HAPs presentes en el medio ambiente no son activos y son capaces de causar carcinogénesis solamente después de ser metabolizados y transformarse en compuestos carcinogénicos. El mecanismo de esta activación es conocido en los mamíferos; la primera fase de la transformación metabólica implica reacciones de oxidación catalizadas por enzimas de la familia del citocromo P 450 y la hidroxilación catalizada por la enzima epóxido hidrolasa. En la segunda fase ocurre una reacción de conjugación con el glutatión, cuyo único objetivo es facilitar la excreción.

Se cree que los HAPs son los principales compuestos causales de efectos sobre la salud por contaminantes del aire. Los HAPs generan diversos derivados, tanto en la atmósfera como en el cuerpo. Se sabe que los derivados de los HAPs tienen efectos particulares, como el estrés oxidativo y la alteración endocrina. Una evaluación exhaustiva de las toxicidades de los HAPs no es fácil, ya que existen numerosos derivados en la atmósfera, los cuales poseen diferentes toxicidades.

Es bien sabido que los derivados de los HAPs, como los HAPs hidroxilados y los HAPs quinonas se generan en la atmósfera a través de reacciones químicas con radicales nitrogenados (NO_3), radicales hidróxidos (OH) y luz ultravioleta. ¹¹

Estos derivados de HAPs también se generan en el cuerpo. Después de entrar en el cuerpo, los HAPs se unen a uno de los receptores nucleares, el receptor de hidrocarburo de arilo y luego inducen a las enzimas metabolizadoras del fármaco del citocromo P 450 como Cyp1a1, Cyp1a2 y Cyp1ab1 que metabolizan los HAPs en diversos derivados de HAPs.

Tras la irradiación con luz, los HAPs y todos los productos de fotoreacción de HAPs pueden absorber energía luminosa para alcanzar estados fotoexcitados que reaccionan con oxígeno molecular, agua y productos químicos coexistentes para producir especies reactivas de oxígeno (ERO) y otros intermedios reactivos, como HAPs oxigenados y radicales libres. Estos intermedios, incluyendo ERO, inducen la peroxidación de lípidos y daño al ADN, incluyendo rotura de la cadena de ADN oxidación a 8-oxo-2' \ beta-desoxiguanosina y aductos de ADN. Dado que estos parámetros toxicológicos están asociados con enfermedades relacionadas con la edad, incluido el cáncer, los HAPs ambientales expuestos simultáneamente a la luz solar pueden potencialmente causar daño a la piel humana, lo que lleva al envejecimiento y a los cánceres de piel. ¹²

A lo largo del tiempo, se han reportado evidencias del efecto de los HAPs en organismos vivos, especialmente humanos (Chen and Liao, 2006; Chiang et al., 2009; Delgado-Saborit et al., 2011; Guo et al., 2012; Okona- Mensah et al., 2005; Siddens et al., 2012; Straif et al., 2005; Wester et al., 2012; Xu et al., 2013), las

cuales provienen principalmente de estudios sobre trabajadores expuestos a mezclas que contienen estos contaminantes. Estos compuestos poliaromáticos se han asociado con diversos tipos de cáncer como: pulmón, vejiga, laringe, escroto, mama, esófago, próstata, riñón, piel y cáncer de páncreas. También son capaces de suprimir la inmunidad y se sospecha que son disruptores endócrinos. ⁸

El benzo[a]antraceno fue el primer hidrocarburo obtenido en estado químicamente puro. Posee un peso molecular de 228 g/mol, un punto de fusión de 162 °C y un punto de ebullición de 400°C. Es un compuesto carcinógeno y teratogénico de 4 anillos que posee un coeficiente de reparto de 5.47, lo que indica una alta afinidad hacia los lípidos.

El benzo[a]pireno es un compuesto de alto peso molecular altamente peligroso por su carcinogenicidad, teratogenicidad y toxicidad. Se trata de un HAP de 5 anillos, que tiene baja solubilidad y baja presión de vapor; su coeficiente de reparto octanol:agua es elevado (6.04), lo que sugiere que su preferencia por las fases no-acuosas. Se ha observado que el BaP se acumula en organismos marinos y plantas que podrían causar indirectamente exposición al ser humano, mediante la ingesta de alimentos.¹³

1.1.4 HAPs en México

En el caso de nuestro país, la Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012, “Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y lineamientos para el muestreo en la caracterización y especificaciones para la remediación.” establece los Límites Máximos Permisibles (LMP) de HAPs en suelo.

Las tablas 1.2 y 1.3 (SEMARNAT, 2013) indican los hidrocarburos que deberán analizarse en función del producto contaminante y los LMP para HAPs específicos en suelo.¹⁴

Por otro lado, la NMX-AA-146-SCFI-2008, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 26 de marzo de 2009, establece las condiciones de análisis de HAPs en suelo mediante cromatografía de gases/ espectrometría de masas o por cromatografía de alta resolución con detectores de fluorescencia y ultravioleta visible (UV-Vis). Los compuestos que se mencionan son los siguientes: Benzo[a]pireno; Dibenzo[a,h]antraceno; Benzo[a]antraceno; Benzo[b]fluoranteno; Benzo[k]fluoranteno e Indeno (1,2,3-cd)pireno.¹⁵

Tabla 1.2 Hidrocarburos que se analizan con base al producto contaminante.

Producto Contaminante	Hidrocarburos				
	Fracción pesada	Fracción media	HAP	Fracción ligera	BTEX
Mezcla de productos desconocidos derivados del petróleo	X	X	X	X	X
Petróleo crudo	X	X	X	X	X
Combustóleo	X		X		
Parafinas	X		X		
Petrolatos	X		X		
Aceites derivados del petróleo	X		X		
Gasóleo		X	X		
Diesel		X	X		
Turbosina		X	X		
Queroseno		X	X		
Mezcla de Creosona		X	X		

Tabla 1.3 Límites Máximos Permisibles para HAPs en suelo.

Hidrocarburos Específicos	Uso de suelo predominante (mg/Kg Base seca)			Método analítico
	Agrícola, forestal, pecuario y de conservación	Residencial y creativo	Industrial y comercial	
Benzo[a]pireno (BaP)	2	2	10	NMX-AA-141-SCFI-2008
Dibenzo[a,h]antraceno (DBA)	2	2	10	NMX-AA-141-SCFI-2008
Benzo[a]antraceno (BaA)	2	2	10	NMX-AA-141-SCFI-2008
Benzo[b]fluoranteno (BbFL)	2	2	10	NMX-AA-141-SCFI-2008
Benzo[k]fluoranteno (BkFL)	8	8	80	NMX-AA-141-SCFI-2008
Indeno[1,2,3-cd]pireno (InP)	2	2	10	NMX-AA-141-SCFI-2008

Los límites máximos permisibles dependerán del tipo de ambiente que se desee regular. La Agencia de Protección Ambiental de EUA (EPA, por sus siglas en inglés), por su parte, contempla sólo al BaP para muestras de agua potable, estableciendo un límite máximo de 0.0002 mg/ L (US-EPA 2009).

1.1.5 Remoción de los HAPs

Un factor que limita la degradación de los HAPs es la pobre biodisponibilidad, esto es causado por su baja solubilidad en agua, una baja velocidad de disolución y la fuerte adsorción a la matriz del suelo. Los HAPs de bajo peso molecular tienden a

ser más solubles y volátiles y tienen menos afinidad por las superficies, en relación con los de alto peso molecular. Algunos otros factores que también influyen son: el tipo de suelo, el contenido de humedad, la concentración de HAPs, las condiciones Redox, la toxicidad de los sedimentos, la temperatura, el pH, la presencia de microorganismos que los degraden, la disponibilidad de nutrientes inorgánicos, las propiedades fisicoquímicas de los HAPs, entre otros.¹

Los procesos convencionales de oxidación pueden eliminar los HAPs del agua con oxidantes como el ozono, el cloro y el permanganato de potasio. Sin embargo, durante el proceso de descontaminación pueden surgir algunos problemas, por ejemplo, el cloro se ha demostrado que reacciona con la materia orgánica natural en agua para producir hidrocarburos halogenados carcinógenos y mutágenos como trihalometanos y ácidos haloacéticos, conocidos como subproductos de la desinfección.

De los procesos químicos, los más utilizados para la remoción de HAPs son la ozonización y la fotólisis directa:

*Ozonización: La degradación ocurre por dos mecanismos: oxidación directa del compuesto objetivo por O_3 y la oxidación indirecta por radical hidroxilo de la transformación de O_3 a un pH básico.

*Fotólisis directa: La vía de degradación consiste en la absorción de luz por los HAPs, causando su excitación. Los HAPs excitados pueden: volver al estado fundamental, disipando así su energía o transformarse en un catión radical ($HAP^{\circ+}$) y un electrón solvatado.

Los procesos de oxidación avanzada (POAs) se refieren a varios métodos de oxidación químicos, cuya común característica es la producción de radicales hidroxilo. Los radicales hidroxilo son especies químicas altamente reactivas y no selectivas, capaces de atacar y destruir la mayor parte de moléculas orgánicas tóxicas y persistentes. Lo anterior se logra primordialmente por: adición de H a enlaces C-C o a anillos aromáticos, extracción de H de enlaces C-H, N-H o O-H y por reacciones de transferencia de electrones. Los POAs incluso pueden producir la mineralización total de las sustancias orgánicas y de iones inorgánicos tales como sulfato, cloro y amonio.⁵

En el caso del BaP, una serie de factores físicos, químicos, biológicos y ambientales influyen en su degradación. La degradación del BaP puede no ocurrir debido a la falta de nutrientes esenciales (como nitrógeno, fósforo y potasio) o sustratos de crecimiento, la disponibilidad del oxígeno o el pH. El BaP puede no ser accesible debido a su baja solubilidad en agua o puede encontrarse en una concentración en la cual resulte tóxico para hongos y algas. Además, pueden presentarse problemas cuando el BaP sea transportado a la célula, puede no ser un sustrato para las enzimas o puede no ser un inductor para el transporte apropiado o las enzimas que degradan.¹³

El uso de biorremediación para degradar productos químicos peligrosos es una alternativa práctica a las técnicas químicas y físicas utilizadas tradicionalmente. Los HAPs son una clase importante de xenobióticos que persisten en el medio ambiente. Son retirados de los lugares contaminados principalmente por degradación microbiana.¹

La biorremediación resulta ser la herramienta para transformar los compuestos a formas menos peligrosas/ no peligrosas. Los microorganismos que degradan HAPs pueden ser microalgas, bacterias u hongos. Se trata de la ruptura de compuestos orgánicos a través de la biotransformación en metabolitos menos complejos y a través de la mineralización en minerales inorgánicos, H₂O, CO₂ o CH₄. El grado y velocidad de biorremediación depende de diversos factores como pH, temperatura, oxígeno, población microbiana, grado de aclimatación, accesibilidad a los nutrientes, estructura química del compuesto, propiedades de transporte de células, entre otras.³

La biorremediación por microorganismos resulta más rentable que los procesos abióticos (que incluyen oxidación química y ultravioleta, la adsorción en adsorbentes tales como carbón activado y los filtros de tela). Los microorganismos generalmente eliminan contaminantes a través de la adsorción físico-química rápida y pasiva en las paredes celulares o de células de la superficie; similar a como ocurre en plantas superiores, los contaminantes se acumulan dentro de la célula por absorción activa y son degradadas a través de una serie de enzimas.⁷

La degradación de HAPs por microalgas ha sido menos estudiada que para bacterias y hongos. Los biotratamientos con microalgas son particularmente atractivos debido a las capacidades fotosintéticas de estos organismos, que los hace convertir la luz solar en biomasa útil e incorporando nutrientes como nitrógeno y fósforo. Palmer (1974) reconoce algunos géneros de microalgas que resultan ser muy útiles por su amplia distribución y su capacidad para la estabilización de

residuos, destacándose los siguientes: *Chlorella*, *Ankistrodesmus*, *Scenedesmus*, *Euglena*, *Chlamydomonas*, *Oscillatoria*, *Micractinium* y *Golenkinia*.

Las cianobacterias (algas verdes azules) y las microalgas eucariotas son capaces de biotransformar el naftaleno en el fenol más soluble en agua, el 1-naftol. *Scenedesmus obliquus* es capaz de utilizar ácidos sulfónicos del naftaleno como fuente de azufre para su biomasa liberando el anillo de carbono en el medio. Las algas podrían utilizar nitro y amino-sustituyentes, de amino naftalenos, y amino y nitrobenzoatos como fuentes de nitrógeno, y clorobenzoatos podrían ser deshalogenados y el cloruro que se acumula por las células. Hay pocos ejemplos de compuestos aromáticos que son degradados por las algas; se ha examinado el efecto del alga *Selenastrum capricornutum*, sobre el benzo pireno. Esta especie de algas usa un sistema de dioxigenasa para oxidar el compuesto a dihidrodioles cis que luego se convirtieron en conjugados de éster de sulfato y glucósido. La vía anaerobia para la descomposición del anillo aromático era diferente y bastante distinta de la vía aeróbica.

An-ping (2006) demostró la eficiencia de cuatro especies de algas (*Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus platydiscus*, *Scenedesmus quadricauda* y *Selenastrum capricornutum*) para remover fluoranteno y pireno. Los resultados arrojaron que *S. capricornutum* resultó ser la especie más efectiva para la remoción, mientras que *C. vulgaris* resultó ser la menos eficiente para remover y transformar dichos HAPs.¹⁶

Los microorganismos son muy sensibles a bajas concentraciones de contaminantes y responden rápidamente a perturbaciones ambientales. En la mayor parte de los estudios realizados sobre la degradación de HAPs por microorganismos, se han

utilizado cepas simples versátiles o se ha recurrido a construir un consorcio microbiano artificial que muestra capacidad de crecer con HAPs como única fuente de carbono, mediante la mezcla de varias cepas conocidas.¹⁷

Diversos microorganismos han sido encontrados para degradar HAPs como fuente de carbono y energía, como un medio para la reducción de la toxicidad del HAP y como sustratos co-metabólicos. La velocidad y el grado de degradación dependen del número de anillos de los HAPs. Han sido pocas las bacterias capaces de utilizar HAPs con cuatro o más anillos como fuente de carbono y energía. *Pseudomonas sp*, *Alcaligenes sp*, *Rhodococcus sp*, *Beijerinckia sp*, *Mycobacterium sp*, *Staphylococcus sp* y *Arthrobacter sp* son bacterias que pueden degradar completamente o co-metabolizar HAPs de mayor peso molecular, como el fluoranteno, pireno, fluoreno y benzo [a] antraceno.¹

La degradación bacteriana de los HAPs por bacterias procede primeramente por la oxidación de los HAPs a un catecol, que se hidroliza posteriormente a intermediarios de ácidos tricarbónicos. Las bacterias suelen incorporar dos moléculas de oxígeno en uno de los anillos de benceno a través de la acción de dioxigenasas intracelulares, formando un cis-dihidrodiol que se convierte posteriormente en un catecol. Una vez que el anillo hidroxilado inicial ha sido degradado, el segundo anillo es atacado de la misma manera.⁹

Al igual que con las bacterias, las vías de degradación de los HAPs con hongos han sido bien estudiadas. Los hongos no utilizan HAPs como su única fuente de carbono y energía, pero transforman HAPs co-metabólicamente para detoxificar productos químicos. Un grupo diverso de hongos ligninolíticos y no ligninolíticos son capaces

de oxidar a los HAPs. El citocromo P-450 monooxigenasas y las peroxidasas de lignina son los dos principales grupos de enzimas involucrados en el ataque inicial hacia los HAPs.¹

Algas procariotas y eucariotas han sido reportadas con la capacidad de oxidar HAPs a partir de intermediarios hidroxilados. Las cianobacterias emplean monooxigenasas para la oxidación de HAPs de bajo peso molecular, produciendo metabolitos similares a los de mamíferos y hongos. En contraste, la producción de cis-dihidrodiolés por el alga eucariota *Selenastrum capricornutum* creciente con la concentración de benzo[a]pireno indicó una dioxigenasa. La degradación de los HAPs es más extensa en condiciones aerobias, pero se sabe que también ocurre en cierta medida en ambientes anaeróbicos; en la tabla 1.4 se mencionan algunas de los hongos y algas que degradan a los HAPs.⁹

Tabla 1.4 Ejemplos de hongos y algas que degradan HAPs. ⁹

Fungi	Cyanobacteria and Algae
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	<i>Anabaena sp.</i>
<i>Pleurotus ostreatus</i>	<i>Aphanocapsa sp.</i>
<i>Penicillium spp.</i>	<i>Petalonia sp.</i>
<i>Phanerochaete sordida</i>	<i>Chorella sp.</i>
<i>Cunninghamella spp.,</i>	<i>Coccochloris sp.</i>
<i>Cunninghamella elegans</i>	<i>Nostoc sp.</i>
<i>Aspergillus spp.</i>	<i>Oscillatoria sp.</i>

1.2 Análisis de HAPs en muestras de agua

Existe una preocupación constante por el alcance perjudicial que pueden tener los HAPs en el medio acuoso, ya que muchos de ellos tienen potencial tóxico, mutagénico y/o carcinógeno (Samanta et al., 2002) y tienden a bioacumularse. Debido a sus propiedades hidrófobas, los HAPs tienden a absorberse fuertemente sobre las partículas y se asientan a través de la columna de agua a los sedimentos, que actúan como su repositorio primario en el medio marino (e.g., Latimer and Zheng, 2003; Lima et al., 2005). Los HAPs unidos a los sedimentos pueden representar un riesgo para los organismos que dependen de las redes alimenticias bentónicas.¹⁶

La preocupación por la determinación de HAPs en el agua, dulce es porque muchas masas de aguas naturales son usadas como agua potable después de su tratamiento, además de afectar a los ecosistemas. Muchas agencias ambientales han adoptado niveles muy bajos de HAPs para aguas potables y naturales. Por ejemplo, la United States Environmental Protection Agency (USEPA) ha propuesto un límite máximo de concentración (MC) de 0.2 µg/L para benzo[a]pireno en agua potable. Existen muchas fuentes de HAPs en el caso de las aguas naturales, las cuales incluyen: (a) escurrimiento urbano y rural, (b) derrame de petróleo durante el transporte, refinación y perforación de pozos de petróleo en alta mar, (c) aguas residuales de actividades industriales y (d) deposición atmosférica.

1.2.1 Análisis de HAPs

La determinación de HAPs en agua se realiza generalmente por técnicas cromatográficas después de la extracción de HAPs de las muestras. La detección por espectrometría en cromatografía de alta resolución acoplada a masas y la detección por cromatografía de líquidos acoplada con detector de UV-arreglo de diodos y/o fluorescencia suelen ser los métodos para realizar el análisis de los HAPs, después de su extracción de agua y otros medios.¹⁸

1.3 Cromatografía de líquidos de alta resolución

Según la International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), la cromatografía es un método físico de separación en el cual los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una de las cuales es estacionaria (fase estacionaria) mientras que la otra (la fase móvil) se mueve en una dirección definida. La cromatografía líquida puede llevarse a cabo tanto en una columna como en un plano. La cromatografía líquida moderna que utiliza generalmente partículas muy pequeñas y una presión de entrada relativamente alta se caracteriza a menudo por el término cromatografía líquida de alta resolución (o de alta presión) y el acrónimo HPLC (por sus siglas en inglés).¹⁹

Las principales ventajas que ofrece la cromatografía de líquidos de alta resolución son:

*Amplio espectro de aplicaciones

*Excelente capacidad de análisis de trazas

*Rapidez y adaptabilidad al análisis cuantitativo

*Variedad de mecanismos de operación

*Alta sensibilidad, exactitud, especificidad y precisión de los datos

*Potencial en la investigación y desarrollo

*Simplicidad en la metodología²⁰

Se requieren presiones de varios centenares de atmósferas para conseguir caudales razonables con los modernos empaquetados de cromatografía de líquidos, que constan de partículas de diámetro igual o inferior a $10\mu\text{m}$. Los componentes de un equipo de HPLC se muestran en la figura 1.2.

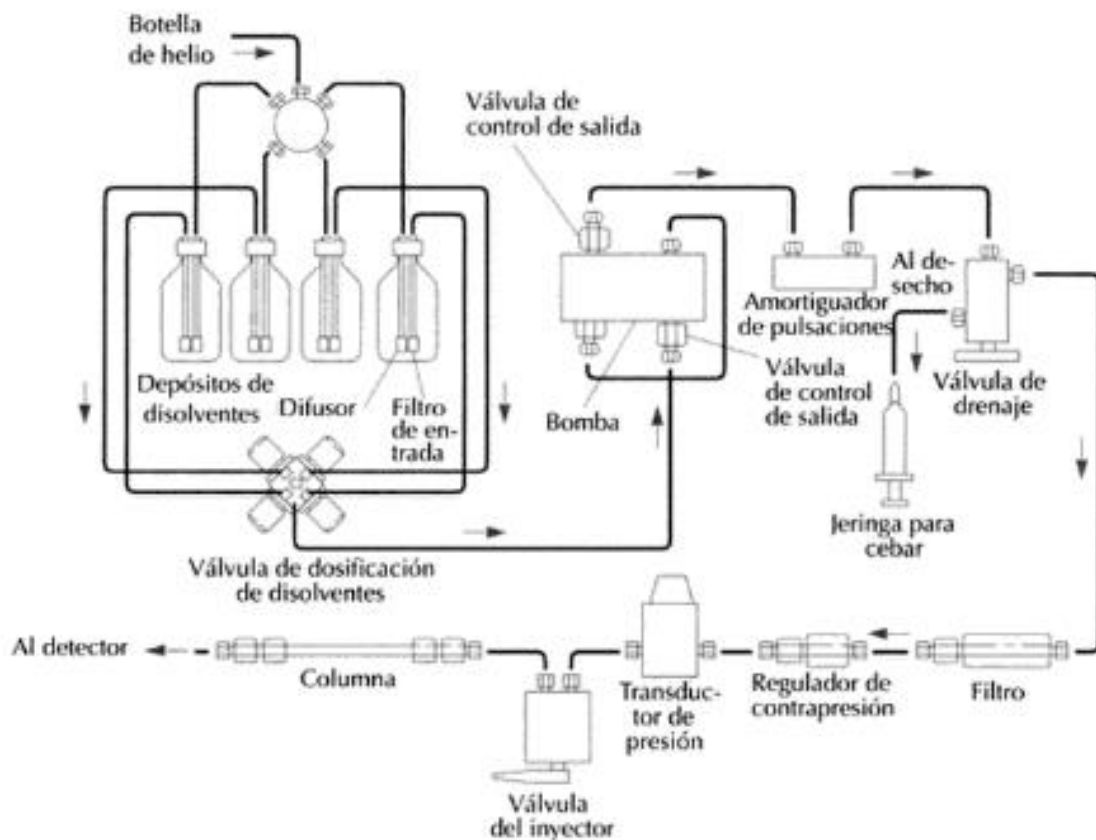


Figura 1.2 Esquema de un equipo de HPLC. (Perkin Elmer, Norwalk, CT)

La forma más sencilla de llevar a cabo una separación en cromatografía de líquidos es mediante la elución isocrática, es decir, utilizando un solo disolvente para hacer pasar los analitos a través de la columna. Sin embargo, a menudo se puede obtener un cromatograma más satisfactorio mediante la elución gradiente, que consiste en utilizar mezclas variables de dos (o más) disolventes de distinta polaridad. La relación de volúmenes de los dos disolventes se modifica, de acuerdo con un programa previamente establecido, unas veces de forma continua y otras veces de formas escalonada.

Se pueden distinguir dos tipos de cromatografía de reparto en función de las polaridades relativas de las fases móvil y estacionaria: normal e inversa. En la cromatografía de fase inversa, la fase estacionaria es no polar, a menudo hidrocarburos, y la fase móvil es un disolvente relativamente polar como agua, metanol y acetonitrilo; el componente más polar es el primero que se eluye, y al aumentar la polaridad de la fase móvil aumenta el tiempo de elución. Se estima que más de tres cuartas partes de las separaciones por HPLC se realizan en fase inversa, regularmente con empaquetado de octil u octodesiloxano.

La mayoría de las separaciones cromatográficas se logran gracias a la compatibilidad que tiene la polaridad del analito con la de la fase estacionaria; y usando luego una fase móvil de polaridad considerablemente diferente a la fase estacionaria.²¹

1.3.1 Parámetros cromatográficos

-Volumen muerto (V_0): Es el volumen que la fase móvil puede ocupar entre las partículas de la fase estacionaria y todos los espacios libres existentes en la columna, tuberías, uniones, etc.

-Volumen de retención (V_R): Es el volumen de fase móvil necesario para transportar la banda de soluto desde el punto de inyección a través de la columna, hasta el detector.²⁰

-Tiempo de retención (t_R): Es el tiempo en que transcurre entre una inyección de una muestra desde la columna hasta el detector.

-Tiempo muerto (t_m): Es el tiempo necesario para que una especie no retenida alcance el detector.

-La constante de equilibrio (K): Es la distribución de la especie A entre las dos fases se denomina constante de distribución o coeficiente de reparto y se define como:

$$K = C_S / C_M$$

Dónde C_S es la concentración molar del soluto en la fase estacionaria y C_M la concentración molar del soluto en la fase móvil.

-Factor de capacidad (k'): Es la relación del tiempo transcurrido en la fase estacionaria contra el tiempo transcurrido en la fase móvil. Matemáticamente se define como el cociente de los moles de un soluto en la fase estacionaria entre los moles en la fase móvil

$$k' = C_E * V_E / C_M * V_M$$

El factor de capacidad también puede ser calculado para cada pico con la siguiente ecuación:

$$k' = t_{R-t_0} / t_0$$

El primer componente eluído deberá tener un tiempo de retención del doble del tiempo muerto. Para una resolución óptima, k' debe estar en el intervalo entre 2 y 5.

-Eficiencia: Se expresa comúnmente como platos teóricos, una cantidad adimensional. El número de platos teóricos refleja el número de veces que el soluto se reparte entre las dos fases durante su paso a través de la columna. Entre mayor número de platos teóricos mayor será la eficiencia y habrá una mejor resolución. La eficiencia de un pico puede determinarse de la siguiente manera:

$$N = 5.54 [t_R / W_{1/2}]^2$$

Dónde $W_{1/2}$ es el ancho del pico medido a la mitad de la altura del mismo.

Algunas veces, los platos teóricos se expresan como platos por metro de columna, por lo que la altura equivalente a un plato teórico H está dada por:

$$H = L / N$$

Dónde L es la longitud de la columna y N el número de platos teóricos.

-Selectividad: La selectividad se refiere a la capacidad del método para distinguir las propiedades de los componentes a nivel molecular y que permite diferenciarlos. La selectividad (α) es equivalente a la retención relativa de los picos de la muestra y está dada por la siguiente expresión:

$$\alpha = k'_2 / k'_1 = V_2 / V_1$$

Dónde V_1 y V_2 son los volúmenes de retención, k'_1 y k'_2 son los factores de capacidad para los picos 1 y 2.

-Resolución: La resolución de una columna constituye una medida cuantitativa de su capacidad para separar dos solutos. Los parámetros que contribuyen en la resolución (R_s) de los picos son la selectividad (α), la eficiencia o número de platos teóricos (N) y el factor de retención k' .

$$R_s = \frac{(\alpha-1)}{4\alpha} \times \sqrt{N} \times \frac{k'}{1+k'}$$

Un valor de resolución de 1.5 o mayor entre dos picos asegura que los componentes de la muestra están bien separados.²¹

1.4 Extracción de HAPs de muestras complejas

Los procedimientos analíticos utilizados para la determinación de HAPs en muestras ambientales (agua, sedimento, biota y suelo) suelen implicar un número de pasos igualmente relevantes para el muestreo, preparación de la muestra, separación y detección de compuestos determinados, identificación, cuantificación y manejo de datos. El proceso analítico puede verse desperdiciado si se emplea un procedimiento de preparación de muestra inadecuado antes de que la muestra llegue al detector para su análisis cromatográfico. Lo anterior es especialmente importante en el análisis ambiental donde la complejidad de muchas matrices y las concentraciones bajas en las que los analitos de interés han de ser identificados y / o cuantificados (en presencia de muchos otros compuestos estrechamente relacionados) hacen obligatorio el tratamiento previo de la muestra. La preparación de la muestra suele ser un procedimiento de varios pasos.

El análisis de los HAPs en muestras ambientales requiere el uso de técnicas de extracción de analitos, que permiten la liberación de los analitos de la matriz sólida, con óptimo rendimiento y selectividad, utilizando un disolvente adecuado, de tal manera que muy pocas especies interferentes sean llevadas a la etapa de separación analítica. Los disolventes pueden ser líquidos orgánicos, fluidos supercríticos, líquidos presurizados o sobrecalentados.²²

La extracción con disolvente se realiza, en su forma más simple, añadiendo un diluyente individual (un solo disolvente o una mezcla de disolventes) a la muestra para extraer el fármaco o los analitos de interés. En otros casos, dos fases se requieren para dividir al analito y los componentes de la matriz para obtener una solución muestra compatible con la técnica de análisis. Las dos fases pueden ser líquidos como en la extracción líquido-líquido (ELL), una fase puede ser sólida y la otra líquida como en la extracción por fase sólida (EFS), o una fase puede ser un gas y el otro un líquido, como en la cromatografía de gases (CG).

La ELL representa una técnica clásica para preparación de muestras utilizada para extraer compuestos de interés, para eliminar o limpiar elementos de la matriz interferente, para preconcentrar analitos o para realizar un intercambio de disolventes para hacer la solución de muestra compatible con la técnica de análisis. La ELL utiliza dos fases líquidas inmiscibles para realizar una extracción y separación; las dos fases son típicamente una fase acuosa y una fase orgánica. El analito de interés debe tener mayor solubilidad en una de éstas fases que en la otra fase, ya que el analito se distribuirá entre ambas fases en base a su solubilidad relativa entre cada disolvente. Por su parte, en la EFS, el reparto de los analitos

ocurre entre un sólido y una fase líquida. Las muestras son expuestas a una fase adsorbente para la retención de los analitos de interés para aumentar su concentración o eliminar las posibles interferencias de la matriz. La EFS puede realizarse en modo de fase inversa (FI-EFS), modo de fase normal (FN-EFS) o modo de intercambio de iones (II-EFS). La elección del modo de operación EFS es el primer paso para el desarrollo del método y se determina basándose en las características del analito y de la matriz; en particular la polaridad, el pKa y la solubilidad.²³

1.4.1 Extracción en fase sólida (EFS)

Un método por EFS se compone siempre de tres a cuatro pasos sucesivos, como se indica en la figura 1.3.

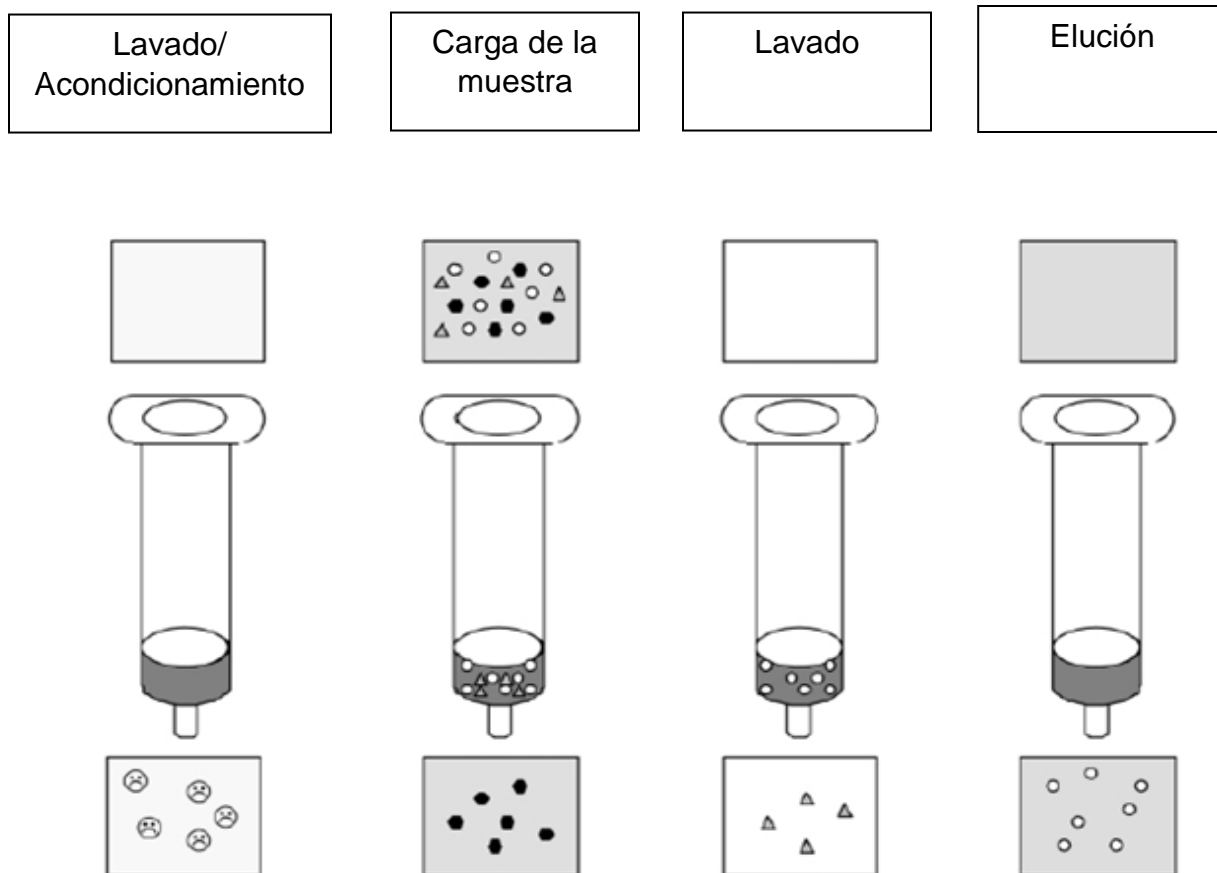


Figura 1.3 Pasos que componen la EFS.²⁴

La extracción en fase sólida (EFS) es una técnica de extracción que utiliza una fase sólida y una fase líquida para aislar uno o un tipo de analito de una solución. Normalmente se usa para limpiar una muestra antes de usar un método analítico cromatográfico u otro método analítico para cuantificar la cantidad de analito (s) en la muestra.²⁴ El procedimiento general consiste en cargar una solución en la fase de EFS, eliminar los componentes no deseados de la muestra y luego recuperar los analitos deseados con otro disolvente. Los métodos por extracción en fase sólida usan el mismo tipo de fases estacionarias que las que se usan en columnas de cromatografía líquida. La fase estacionaria está contenida en una columna de vidrio

o de plástico por encima de una frita o lana de vidrio. La columna puede tener un frit encima de la fase estacionaria y también puede tener una llave de paso para controlar el flujo de disolvente a través de la columna.²⁵

La selección de un sorbente apropiado para la extracción en EFS depende de la comprensión del mecanismo (s) de interacción entre el sorbente y el analito de interés. Esta comprensión a su vez depende del conocimiento de las propiedades hidrófobas, polares e ionógenas tanto del soluto como del sorbente. Los mecanismos de retención más comunes en EFS se basan en fuerzas de van der Waals ("interacciones no-polares"), enlace de hidrógeno, fuerzas de dipolo-dipolo (interacciones "polares") e interacciones catión-anión (interacciones iónicas).

Primeramente, el sorbente sólido debe acondicionarse usando un disolvente apropiado, seguido por aplicación del mismo disolvente que el disolvente de la muestra. Este paso es crucial, ya que permite el humedecimiento del material de relleno y la solvatación de los grupos funcionales. Además, elimina posibles impurezas contenidas inicialmente en el sorbente/envase y permite eliminar el aire presente en los intersticios del empaque y llenar el volumen vacío con disolvente. Típicamente, para el sorbente de fase inversa (tal como sílice unida a octadecilsilano), se utiliza frecuentemente metanol, seguido de agua o tampón acuoso cuyo pH y fuerza iónica son similares a los de la muestra. Debe tenerse cuidado de no permitir que el sorbente sólido se seque entre el acondicionador y las etapas de tratamiento de la muestra, de lo contrario los analitos no serán retenidos eficientemente y se obtendrán recuperaciones deficientes.

El segundo paso es el paso de la muestra a través del sorbente sólido. La muestra puede aplicarse a la columna por gravedad, bombeo, aspiración por vacío o por un sistema automatizado. El flujo de la muestra a través del sorbente debe ser lo suficientemente bajo como para permitir una retención eficiente de los analitos, y suficientemente alto para evitar una duración excesiva. En esta etapa, los analitos se concentran en el sorbente.

El tercer paso (opcional) consiste en el lavado del sorbente sólido con un disolvente apropiado, con una baja fuerza de elución, para eliminar los componentes de la matriz que han sido retenidos por el sorbente sólido, sin desplazar los analitos. Un secado también puede ser aconsejable, especialmente para matrices acuosas, para eliminar las trazas de agua del sorbente sólido.

Finalmente, la etapa final consiste en la elución de los analitos de interés por un disolvente apropiado, sin eliminar los componentes de matriz retenidos. El volumen del disolvente debe ser ajustado de modo que se consiga la recuperación cuantitativa de los analitos con posterior dilución baja. Además, el flujo debe ajustarse correctamente para garantizar una buena elución.²⁴

1.4.2 Dispersión de matriz en fase sólida (DMFS)

Aunque muchos fluidos biológicos, tales como orina o plasma sanguíneo o suero, se pueden aplicar directamente a las columnas de EFS, la mayoría de las demás muestras no son directamente aplicables a la EFS, particularmente los sólidos y semisólidos que se derivan de orígenes biológicos. La DMFS es una técnica de extracción con creciente aceptación para el aislamiento de compuestos orgánicos

de muestras sólidas, semisólidas y viscosas. Esta técnica implica el molido de una porción de la muestra con un material sólido abrasivo, típicamente un adsorbente como los usados en EFS. El proceso de molienda rompe la estructura de la muestra y la dispersa sobre la superficie del material extractor (por la aparición de fuerzas de cizallamiento y molienda), y como un disolvente “unido” que ayuda a lograr la disgregación y dispersión completa de la muestra. La mezcla muestra/adsorbente se empaqueta entonces en un tubo de EFS con frit, y finalmente los analitos se desorben selectivamente con un disolvente apropiado.

En muchos ensayos, la pureza de los extractos finales de DMFS se mejora mediante la extracción subsiguiente, muchas a menudo por EFS, o simplemente mediante el empaquetamiento de una capa sorbente extra en el fondo del tubo DMFS. Esta técnica también reduce el consumo de muestras y disolventes, y no necesita instrumentación especial. Por otra parte, la DMFS es muy adecuada para los procedimientos a pequeña escala.

Esta técnica ha demostrado ser eficiente y algo genérica para el aislamiento de una amplia gama de fármacos, pesticidas, constituyentes naturales y otros compuestos de una amplia variedad de muestras complejas de plantas y animales.²⁶ La selectividad y eficiencia de la DMFS depende principalmente del adsorbente y disolvente extractivo utilizado. También influyen factores como el estado físico y origen de la muestra, las concentraciones y propiedades relativas (como polaridad y estabilidad química) de los analitos y las posibles interferencias.²⁷ En cuanto a los adsorbentes, en la mayoría de los métodos se utilizan fases como la C18, y C8 para

la dispersión y retención de analitos lipófilos (fase inversa); también se utilizan sílice y alúmina (fase normal).²⁸

La DMFS elimina la mayoría de las complicaciones de realizar extracciones clásicas líquido-líquido y / o de la fase sólida de muestras sólidas y semisólidas, particularmente muestras biológicas complejas. De hecho, todas las formas clásicas de cromatografía líquida requieren que la muestra se aplique en estado solubilizado a la cabeza de la columna. Las diferencias más significativas entre la aplicación de DMFS a muestras sólidas y líquidas tiene que ver con: las interacciones analito-muestra (más fuertes para este último) y el nivel generalmente más alto de interferencias potenciales en matrices sólidas.

Los pasos para realizar una DMFS se presentan en la figura 1.4. Primeramente, se coloca una muestra en un mortero de vidrio o de ágata, que contiene un material de soporte sólido apropiado u otro material sólido, tal como sílice (C18). El soporte sólido y la muestra se mezclan manualmente juntos usando un pilón de vidrio o de ágata, un paso que toma aproximadamente 30 s.

Después, el material mezclado se transfiere y se envasa en una columna adecuada para conducir una secuencia de elución con disolventes de fuerza creciente. La longitud total de la columna consiste en componentes de muestra mezclados y su distribución en la fase enlazada y soporte, produciendo una nueva fase que presenta un carácter único para el fraccionamiento de la muestra.²⁶ Las principales ventajas que presenta esa técnica son la simplicidad y los bajos costos dado la reducción del uso de disolventes; por otra parte, presenta algunos inconvenientes, entre los cuales se encuentran la necesidad de manipulación, el gran número de

variables a optimizar y la gran dificultad que representa el optimizar el procedimiento. El futuro de la DMFS estará determinado por la probabilidad de idear un funcionamiento reproducible; aún existen ciertos parámetros para la mejora de la técnica: que las variables del proceso de extracción DMFS son numerosas, su optimización podría resultar una tarea larga y difícil.²⁹

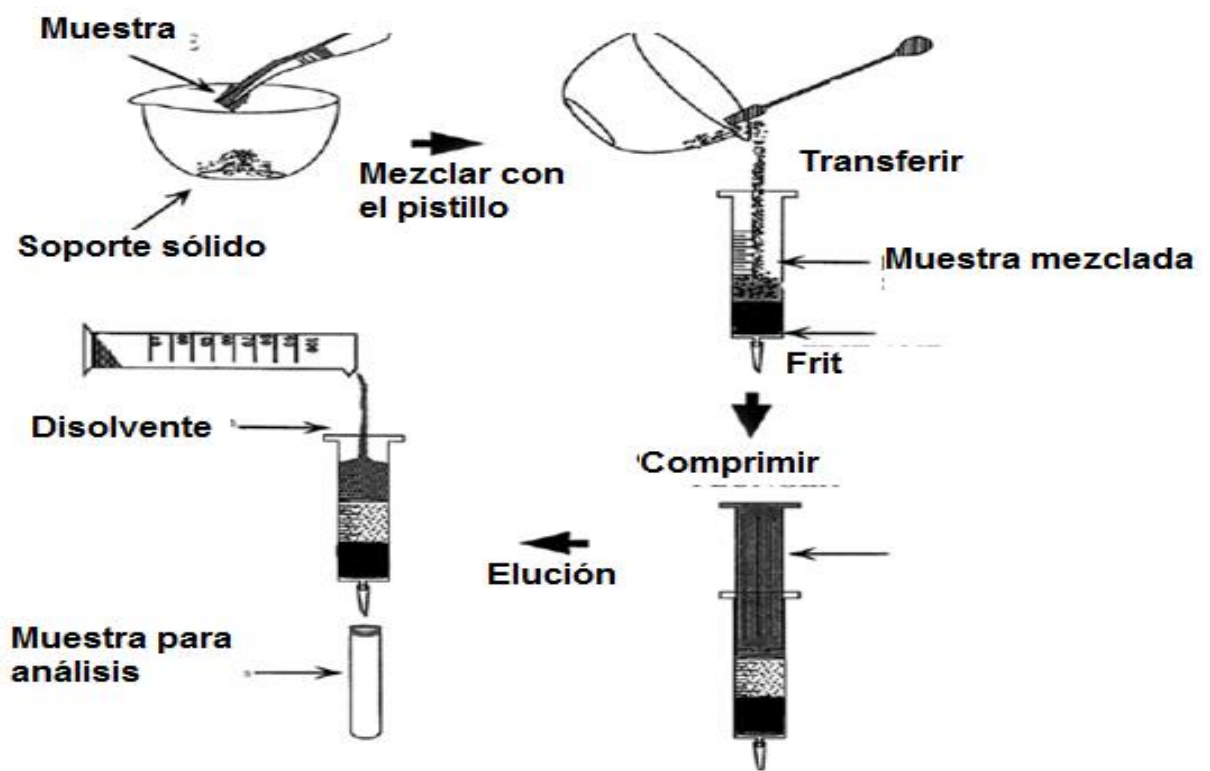


Figura 1.4. Etapas que componen la DMFS.²⁶

1.5 Generalidades sobre algas

Las algas son organismos muy simples que contienen clorofila (Bold y Wynne et al., 1985), compuestos de una célula o agrupados en colonias o como organismos con muchas células, a veces colaborando juntos como tejidos simples. Varían

enormemente de tamaño - unicelulares de 3-10 micras a gigantes kelps de hasta 70 m de largo y crecen hasta 50 cm por día (Hillison et al., 1977). Estos organismos se consideran plantas talófilas (no poseen raíz, tallo y hojas), no desarrollan embriones y son capaces de generar su propio alimento.³⁰ Las algas se encuentran en todas partes en la tierra: en el mar, ríos y lagos, en el suelo y las paredes, en animales y plantas (como simbioses-socios que colaboran juntos).¹

La organización celular que presentan las algas, con excepción de los representantes de las algas verde azules, es de tipo eucariótica, es decir, presentan núcleo delimitado por una doble membrana, mitocondrias, cloroplastos, retículo endoplásmico, complejo de Golgi y lisosomas. En contraste, las algas verde-azules, presentan una organización celular de tipo procariótica; no tienen organelos celulares y su ADN se encuentra en una sola molécula circular en el citoplasma.

Las algas, con excepción de las algas verde azules y las algas rojas, presentan en algún momento de su ciclo de vida estructuras de locomoción denominadas flagelos. En los diferentes grupos de algas, estos órganos varían tanto en número como en forma. Sin embargo, típicamente presentan dos flagelos o múltiplos de dos, que pueden ser isocontos, anisocontos o heterocontos.

Las algas son organismos principalmente autótrofos (fotoautótrofos o quimioautótrofos). La fotosíntesis es su principal vía de nutrición, sin embargo, existen grupos que presentan también una forma de nutrición heterótrofa (osmotrófica, fagotrófica o saprobiótica). Algunos organismos presentan un tipo de nutrición mezclada de autotrofia y heterotrofia, la cual se denomina mixotrofia, y a

los organismos que la presentan se les denomina mixótrofos. Las algas pueden reproducirse por dos vías, la asexual, que en el caso de las algas verde azules es típicamente fisión binaria y en otras algas unicelulares es mitosis, y la sexual en donde podemos observar oogamia, isogamia o anisogamia.³²

Durante décadas, las microalgas han demostrado ser capaces de producir una gran variedad de metabolitos secundarios útiles (Lebeau y Robert, 2006; Moreno-Garrido et al., 2008) y son potencialmente útiles como agentes de tratamiento para aguas residuales.³³

Los sistemas de algas pueden tratar las aguas residuales humanas (Shelef et al., 1980; Mohamed, 1994; Ibraheem, 1998), desechos de ganado (Lincoln y Hill, 1980), desechos agroindustriales (Zaid-Iso, 1990, Ma et al. 1990, Phang, 1990, 1991) y residuos industriales (Kaplan et al., 1988). Asimismo, las microalgas son muy eficaces en la purificación de los desechos mediante la producción de oxígeno y la eliminación de metales pesados y xenobióticos.

Además, los sistemas de microalgas se han utilizado para el tratamiento de otros desechos como el efluente de la pocilga (De Pauw et al., 1980, Martin et al., 1985a, y Pouliot et al., 1986), el efluente de las fábricas de procesamiento de alimentos (Rodrigues y Oliveira, 1987) y otros desechos agrícolas (Phang y Ong, 1988). Además, se siguen desarrollando los sistemas basados en algas para la eliminación de minerales tóxicos como plomo, cadmio, mercurio, escandio, el estaño, el arsénico y el bromo (Soeder et al., 1978, Kaplan et al., 1988, Gerhardt et al., 1991, Hammouda et al., 1995, Cai-XiaoHua et al., 1995).³⁴

1.5.1 *Selenastrum capricornutum*

Selenastrum capricornutum es un alga verde unicelular en forma de media luna, que se ubica de forma ubicua y que se cultiva fácilmente en agua dulce, y representa un modelo ideal para pruebas comunes de toxicidad estándar y la investigación de pigmentos fotosintéticos después de la exposición a la radiación.³⁵ *S. capricornutum* tiene un volumen aproximado de entre 40 y 60 μm^3 , que puede encontrarse en sistemas acuáticos epicontinentales eutróficos u oligotróficos. Comúnmente también se le conoce como *Pseudokirchneriella subcapitata*. Una imagen del alga *S. capricornutum* se presenta en la figura 1.5.³⁶

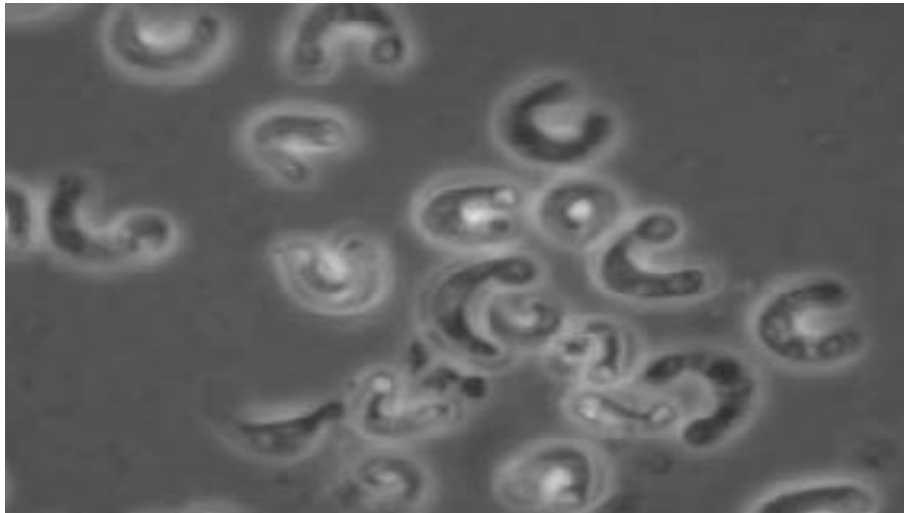


Figura 1.5 Microfotografía de *S. capricornutum*.³⁶

1.5.2 *Scenedesmus acutus*

Entre las microalgas verdes, *Scenedesmus sp.* ha sido ampliamente estudiado como un organismo prometedor para ser empleado con fines biotecnológicos, principalmente la producción de biocombustibles y la biorremediación.³⁷

S. acutus, también conocida como *S. obliquus*, es una microalga dulceacuícola de forma elipsoide u ovoide, que se caracteriza por formar grupos de más de dos células. Tiene dimensiones promedio de 12 μm de largo y 5.9 μm de ancho. *Scenedesmus* es un género es un frecuentemente estudiado por su potencial como materia prima para producir biodisel, se reproduce en aguas ricas en nutrientes, especialmente con alto contenido de nitrógeno, como ríos, arroyos, lagunas, lagos y aguas estacionales.³⁸ Una imagen del alga *S. acutus* se presenta en la figura 1.6.



Figura 1.6 Cultivo de *S.acutus*. Fotografía tomada con aumento de 40x (imagen propia)

1.6 Inmovilización de células

La tecnología de la inmovilización se ha utilizado extensamente en fermentaciones comerciales con biorreactores para la producción de compuestos útiles como aminoácidos, ácidos orgánicos, antibióticos, esteroides y enzimas utilizando células inmovilizadas. La inmovilización es un término general que describe muchas formas

diferentes de fijación o atrapamiento celular. Estas diferentes formas incluyen floculación, adsorción sobre superficies, unión covalente a portadores, reticulación de células, encapsulación en un polímero-gel y atrapamiento en una matriz, tal y como se muestra en la figura 1.7.

Un método que ha surgido como exitoso en el laboratorio y útil en aplicaciones comerciales es la encapsulación de células en una matriz gel-polímero. Los resultados de estudios de biorreactores han demostrado que las células encapsuladas tienen ventajas sobre las células libres en numerosas condiciones. Por ejemplo, el aumento de la actividad metabólica y la producción de metabolitos, la protección contra sustancias tóxicas y el aumento de la estabilidad del plásmido de células encapsuladas en comparación a células libres.⁴

Una célula inmovilizada se define como una célula viva que, por medios naturales o artificiales, se impide moverse (independientemente de su localización original) a todas las partes de una fase acuosa de un sistema.³³ También se puede definir como “el confinamiento o localización de células intactas en una región determinada del espacio con preservación de alguna actividad catalítica deseada”.³⁹

La inmovilización de microorganismos a un material de lecho se puede dividir en dos procesos principales de inmovilización: (1) la autoadherencia de microorganismos al material de lecho, que se define como “crecimiento unido”, (2) Inmovilización de microorganismos al material de cama.⁴⁰

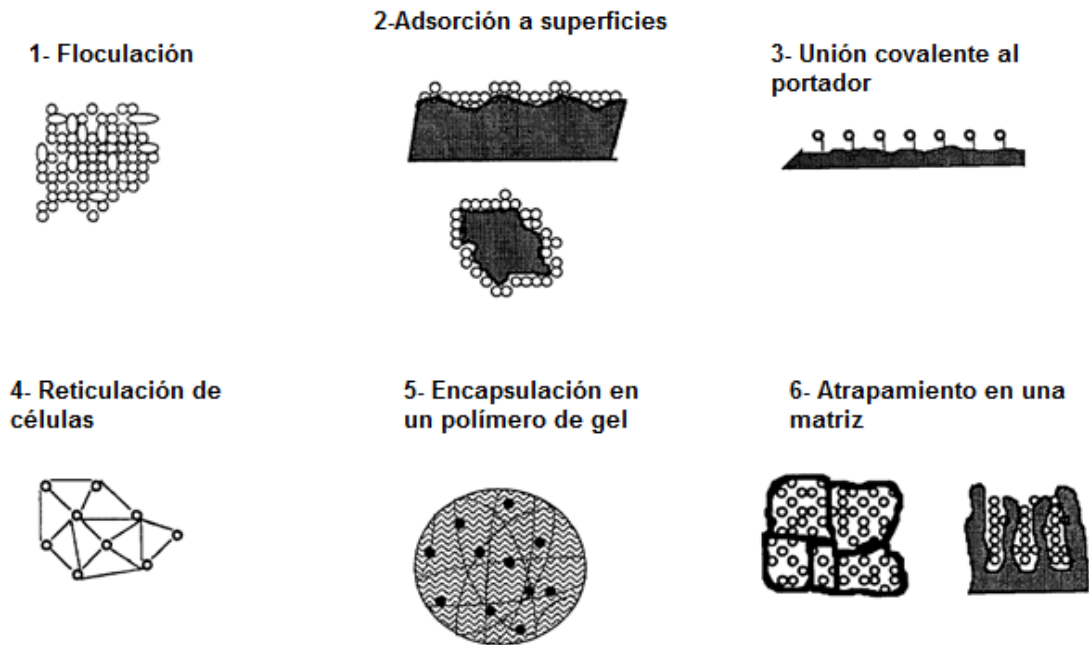


Figura 1.7 Métodos para inmovilización de células viables.⁴

1.6.1 Inmovilización de microalgas

El cultivo de microalgas para fines de tratamiento de aguas residuales puede realizarse en sistemas de células suspendidas o inmovilizadas. Para un cultivo eficaz y un correcto proceso de remediación, algunos parámetros, como la luz, la temperatura, el pH, el suministro de nutrientes y la mezcla deben ser cuidadosamente controlados.⁴¹ En la tabla 1.5 se presentan las ventajas/limitaciones de usar células libres o inmovilizadas en el tratamiento de aguas.

Tabla 1.5 Ventajas y limitaciones de células libres e inmovilizadas en el tratamiento de aguas residuales .⁴¹

Sistemas de cultivo	Ventajas	Limitaciones
Células suspendidas	<ul style="list-style-type: none"> *Ampliamente estudiado y optimizado *Se pueden procesar mayores volúmenes de agua residual *Aplicable en operaciones a gran escala 	<ul style="list-style-type: none"> * La recolección de microalgas antes de la eliminación de las aguas residuales tratadas es necesaria
Células inmovilizadas	<ul style="list-style-type: none"> *La recolección de microalgas antes de la eliminación de las aguas residuales es más simple *Los cultivos envejecidos se encuentran más protegidos ante la fotoinhibición *La matriz confiere células de mayor resistencia ante ambientes hostiles como la salinidad, la toxicidad de metales y el pH 	<ul style="list-style-type: none"> *Altos costos asociados a la matriz polimérica *Se puede dar limitación por falta de luz *Aplicable solo para pequeñas operaciones y escala piloto

La mayoría de las técnicas generales de inmovilización de microorganismos pueden ser fácilmente modificadas y aplicadas a microalgas, tomando en cuenta se trata de microorganismos fotosintéticos que requieren luz. El método más comúnmente utilizado es la inmovilización (encapsulación) en polímeros. Los microorganismos se inmovilizan (atrapan) vivos dentro del polímero porque sus poros son más pequeños que los microorganismos, mientras que el fluido fluye a través de él y sostiene su metabolismo y crecimiento eventual.⁴⁰

La inmovilización de las microalgas para el tratamiento de aguas residuales se basa en el principio de mantener las células vivas dentro de una matriz de gel

metabólicamente activa durante el mayor tiempo posible, tiempo durante el cual tienen una movilidad muy limitada. Después de la absorción de los contaminantes por las microalgas, las aguas más limpias se difunden de los polímeros y se recogen y reutilizan y el proceso se repite durante varios ciclos. En consecuencia, muchos polímeros pueden cumplir este requisito. Los principales problemas con cualquiera de ellos son (1) la eficiencia del sistema para eliminar los contaminantes; (2) costo del polímero; (3) costo del proceso de inmovilización.³³

Hay ciertas propiedades que debe cumplir una matriz para ser ideal en su uso para inmovilización: debe ser no tóxica, fototransparente, estabilidad en medio de crecimiento, retención de biomasa y resistencia a la disrupción debida al crecimiento celular.⁴²

1.6.2 Inmovilización pasiva

Muchos microorganismos (incluyendo algunos grupos de microalgas) tienen una tendencia natural a unirse a las superficies y crecer en ellas (Robinson et al., 1986). Esta característica puede explotarse para inmovilizar células en portadores de diferentes tipos (Codd et al., 1987). Normalmente, estos procesos son fácilmente reversibles y la contaminación de efluentes con células desatascadas es inevitable. Los materiales adsorbentes (portadores) para inmovilización pasiva pueden ser naturales o sintéticos.

Akhtar et al. 2004 utilizaron biomasa de esponja de loofa para inmovilizar células de *Chlorella sorokiniana*, para eliminar el níquel (II) de soluciones acuosas. Liu et al. 1998 compararon la capacidad de adsorción de cubos de esponja de loofa y cubos

de poliuretano, y no encontraron diferencias en las células libres de plantas (*Coffea arabica*). Un problema en el diseño de la investigación involucrando la esponja loofa es la repetibilidad. La estructura del esqueleto de los frutos varía de una planta a otra en función de las condiciones de cultivo: cada esponja de loofa tiene una estructura diferente (Liu et al., 1998). En cualquier caso, para fines industriales o comerciales, la inmovilización pasiva de células de algas en esponjas de loofa parece ser un campo muy prometedor.

Los materiales sintéticos también son ampliamente utilizados en experimentos que implican inmovilización pasiva. Urrutia et al. 1995 inmovilizaron células de *Scenedesmus obliquus* en polivinilo y poliuretano para eliminar el nitrato del agua. La supervivencia de las células adsorbidas se comparó con células atrapadas (células inmovilizadas por inmovilización "activa"), mezclando células concentradas con uno de los pre-polímeros. El crecimiento celular es más alto para las células adsorbidas que el medido para las células atrapadas, posiblemente debido a la toxicidad de los prepolímeros (aunque estos autores informaron que no se encontraron efectos tóxicos debido a la presencia residual de reactivos prepolímeros). Yamaguchi et al. 1999 consiguió una notable degradación de hidrocarburos por la microalga hidrofóbica incolora *Prototheca zopfii*, adsorbida en cubitos de 8 mm de espuma de poliuretano en un reactor de burbujas.

1.6.3 Inmovilización activa

En cuanto a las técnicas de inmovilización activa, debe distinguirse el uso de agentes floculantes, la fijación química y el atrapamiento de gel.

1.6.3.1 Agentes floculantes

Los agentes floculantes se utilizaron principalmente para evitar la tediosa y costosa centrifugación cuando se pretende que las algas se eliminen de un medio líquido. Entre los floculantes de uso común, el quitosano ha sido el más ampliamente empleado. El quitosano es un amino polisacárido lineal que presenta grupos amino con carga positiva, proporcionando propiedades muy interesantes para adsorber partículas cargadas negativamente y se demuestra que es útil para un gran número de especies de microalgas (Lubia'n et al., 1989). Esta sustancia es biodegradable y, por tanto, puede utilizarse en la recolección de algas con fines nutricionales.

1.6.3.2 Fijación química

La unión química presenta algunas grandes desventajas cuando se pretende inmovilizar las células vivas, ya que la interacción química (principalmente debido a la unión covalente, reticulación -con participación de glutaraldehído, por ejemplo- o resinas fotorreticulables) causa daños en la superficie celular y reduce drásticamente la viabilidad de las células. La atracción de iones no es tan perjudicial para los organismos vivos, pero la eficacia de esta técnica depende del pH y la fuerza iónica de los medios circundantes. Es necesario recordar que el pH en el medio inmediato de una microalga viva puede alcanzar valores muy altos en la luz, debido al metabolismo fotosintético.

1.6.3.3 *Atrapamiento en gel*

Este método es la técnica más utilizada para la inmovilización de algas. Siguiendo a Codd (1987), el atrapamiento de gel puede realizarse mediante el uso de

polímeros sintéticos (acrilamida, resinas fotorreticulables, poliuretanos), proteínas (gelatina, colágeno o clara de huevo) o polisacáridos naturales (agares, carragenanos o alginatos) .⁴³ En este tipo de inmovilización, se permite que las células penetren en la matriz porosa hasta que su movilidad se obstruya por la presencia de otras células o el material poroso se forme dentro de un cultivo de células. Se basa en la inclusión de células dentro de una red rígida para evitar que las células se difundan en el medio circundante, al mismo tiempo que permiten la transferencia de masa de nutrientes y metabolitos. El crecimiento celular en la matriz porosa depende de las limitaciones de difusión impuestas por la porosidad del material y posteriormente por el impacto de la acumulación de biomasa.³⁹

El atrapamiento en polímeros presenta algunas ventajas, Estos incluyen el logro de una alta concentración de biomasa viable, alta resistencia a compuestos tóxicos dentro del fluido tratado, la posibilidad de poder inmovilizar junto con diferentes especies de microorganismos separados físicamente entre sí, una mayor estabilidad del plásmido dentro de microorganismos en el caso de la ingeniería genética.⁴⁰ En la tabla 1.6 se presenta una comparación entre los diferentes tipos de inmovilizaciones artificiales.

Tabla 1.6 Comparación entre los diferentes métodos de inmovilización artificial de microorganismos.⁴⁰

	Restricción en la difusión	Concentración de biomasa	Problemas de toxicidad	Estabilidad mecánica	Complejidad de la aplicación
Micro encapsulación	Relativamente bajo	Alto	Sufre de toxicidad severa	Baja, las cápsulas tienden a romperse	Complejo
Separación de membrana	La contaminación puede causar severas restricciones de difusión	Alto	No	Alto	Complejo
Separación covalente	No	Bajo	Sufre de toxicidad severa	Alto	Sencilla
Atrapamiento dentro de polímeros	Relativamente alto, varía con el tipo de material del polímero	Alto	Problemas de toxicidad moderados	Varía con el tipo de polímero	Sencilla

El procedimiento general de atrapar microorganismos dentro de perlas de polímero consiste en suspender los microorganismos dentro de una solución líquida que contiene monómeros de macromolécula. El siguiente paso es gelificar la solución para que los microorganismos queden atrapados dentro de la matriz. La gelificación de la solución se crea mediante el enlace de las macromoléculas entre sí y mediante esta formación de una red tridimensional polimérica. La gelificación de las macromoléculas puede realizarse mediante una diversidad de métodos físicos o químicos, dependiendo de la naturaleza de los monómeros utilizados. Estos métodos incluyen la reducción o elevación de la temperatura, la gelificación

ionotrópica de macromoléculas con cationes di- y multivalentes y otras reacciones químicas o fotoquímicas diferentes.⁴⁰

Los tipos de alginato y, en general la concentración celular inicial, parecen ser muy importantes en la densidad celular máxima que se puede alcanzar en cultivos inmovilizados: a mayor densidad celular inicial, mayor densidad celular final.⁴³

1.6.4 Inmovilización en alginato

La producción comercial actual de alginatos se basa enteramente en las fuentes de algas. Los alginatos se producen en algas marrones en la matriz intracelular como geles que contienen iones de sodio, calcio, magnesio, estroncio y bario, de manera que la composición de contracción está determinada por el equilibrio de intercambio iónico con agua de mar. La afinidad de los alginatos hacia los iones divalentes disminuye en el orden siguiente: Pb > Cu > Cd > Ba > Sr > Ca > Co, Ni, Zn > Mn.⁴⁴

Los principales geles naturales utilizados para la inmovilización de microorganismos son alginato y x-carragenano, derivados de algas o algas marinas, los cuáles se estabilizan con Ca^{2+} y K^{+} , respectivamente. El alginato consiste en grupos D-manurónico y ácido L-gulurónico y la relación entre estos grupos determina la resistencia del gel, tal y cómo se indica en su estructura presentada en la figura 1.8. Los grupos ácido gulurónico reaccionan con Ca^{2+} y por lo tanto la resistencia del gel aumenta con una cantidad creciente de los grupos ácido gulurónico en el polímero, dependiendo de las algas y la parte de las especies utilizadas (hoja, stipe, Martinsen et al., 1989, Smidsrod y Skj ~ k-Braek, 1990). En general, estos geles permiten un procedimiento de inmovilización suave (permeabilidad, toxicidad nula y

transparencia de la matriz formada), que permite que la mayoría de las células puedan sobrevivir a la inmovilización (Van Ginkel et al., 1983, Tramper y Grootjen, 1986, Lewandowski et al., 1987).⁴⁵

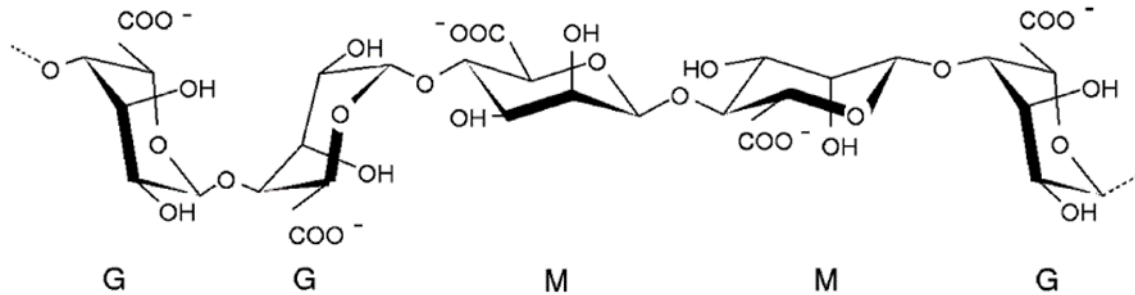


Figura 1.8. Estructura del alginato. El β -D-ácido manurónico indicado por la letra M y el α -L-ácido gulurónico por la letra G.

Los alginatos se usan en la industria como viscosificantes, estabilizadores y formadores de gel, formadores de película o aglutinantes de agua (Ertesva^og y Valla, 1998). El polímero es soluble en agua fría y forma geles termoestables. La gelificación de sales monovalentes de este polisacárido (normalmente Na-alginato) disuelto en agua se produce cuando se mezclan gotitas de una mezcla de células (o enzimas) y sales alginato monovalentes con una solución que contiene iones formadores de gel.⁴³ La formación de gel está ligada a interacciones específicas y fuertes entre largos tramos de unidades G y cationes divalentes tales como Ca^{2+} o Sr^{2+} . La importancia de las unidades G en este proceso se resalta por el hecho de que la resistencia del gel está directamente relacionada con el contenido total de unidades G y la longitud media del bloque G en el polímero gelificante.

En el modelo generalmente aceptado, denominado modelo de caja de huevo, 10 cationes divalentes promueven la asociación de pares de cadenas poliméricas y la

formación de zonas de unión estables. La asociación esquemática huevo-caja entre las unidades G fue propuesta por Grant, dos pares de dos unidades G consecutivas, cada par perteneciente a diferentes cadenas poliméricas, se "pegan" conjuntamente mediante la coordinación de un catión Ca^{2+} . El anillo de azúcar del ácido gulurónico está en la conformación ${}^1\text{C}_4$, y la cadena de polímero adopta una forma característica en zigzag.

Se ha propuesto que esta forma crea cavidades en forma de bolsillo en las que los cationes Ca^{2+} pueden acomodarse fácilmente. Existe una proporción de 4: 1 entre las unidades G y los cationes Ca^{2+} en los geles de alginato de Ca. Esto encaja bien con el modelo de caja de huevo en el cual las interacciones mediadas Ca específicas implican solamente dos cadenas poliméricas, y en el estado de gel las zonas de unión no muestran un orden de largo alcance.⁴⁶

La formación de gel es un proceso muy rápido. Cuando se pretende re-disolver el gel, se pueden usar medios con citrato de sodio (Hertzberg y Jensen, 1989) o fosfato (hexametáfosfato): los cationes de calcio pueden ser secuestrados por aniones solubles o pueden ser sustituidos en la matriz por cationes monovalentes para desestabilizar la estructura. El Na-alginato no se disuelve apropiadamente en agua marina o salada.⁴³

Se han realizado diversos estudios inmovilizando algas para la remoción de contaminantes en agua. La inmovilización también mejora la remoción de nutrientes (Mallick 2002, Tam y Wong 2000, Jiménez-Pérez et al., 2004). Lau et al. 1997 inmovilizaron *Chlorella vulgaris* en carragenano y alginato para tratar aguas residuales domésticas primarias. Las células libres e inmovilizadas eliminaron

aproximadamente 95% y 50% de amonio y 99% y 50% de fosfatos de las aguas residuales en 3 días. Fierro et al. 2008 inmovilizó células de *Scenedesmus sp.* en quitosano. Las células de vida libre eliminaron el 20% y el 30% de nitratos y fosfatos en 36 h, mientras que las células inmovilizadas eliminaron el 70% de nitrato y 94% de fosfato dentro de las 12 h del tratamiento.⁴⁷

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Desde la revolución industrial se ha creado un legado de contaminación ambiental en pro de una mejor calidad de vida para la gente. Sin embargo, a medida que las economías mundiales evolucionaban, cada vez más sitios se veían afectados con subproductos de procesos industriales, por lo que requería de protección, legislación y supervisión más eficaz. Entonces, uno de los retos de las sociedades pos-industriales fue el desarrollo eficaz de estrategias para la rehabilitación de entornos contaminados. Muchas estrategias han sido propuestas para contrarrestar estos problemas, incluyendo enfoques físicos y químicos tales como la incineración o el lavado del suelo. La Agencia Protectora del Medio Ambiente de los Estados Unidos (US-EPA por sus siglas en inglés) estimó que un promedio de 294 000 sitios contaminados requiere remediación en los próximos 25 años, a un costo aproximado de 209 mil millones de dólares (US EPA, 2004). En la actualidad es muy probable que esta cifra ha aumentado.⁵

Por su parte, la industria petrolera en México causa aproximadamente 114 derrames anuales al ambiente, lo que ha causado una gran extensión de territorio contaminado con hidrocarburos del petróleo. Las emergencias más graves y

grandes relacionadas con derrames de petróleo en territorio mexicano se encuentran en los estados colindantes con el Golfo de México, como: Campeche, Veracruz, Chiapas, Tabasco y Tamaulipas. El manejo inadecuado y/o abandono de los residuos peligrosos ha causado un alto impacto ambiental y en la salud de la población.

Por lo tanto, ante el creciente y constante incremento en contaminantes, principalmente mutagénicos y cancerígenos en el medio ambiente, se requiere encontrar métodos prácticos, económicos y eficientes que nos brinden una alternativa para erradicar este problema. El empleo de un método microbiológico para la retención de HAPs es un tema innovador y realmente poco estudiado, por lo que se pretende determinar si esta sería una alternativa viable para suplir a los procedimientos químicos y físicos que regularmente se utilizan para este propósito.⁹

Los HAPs son contaminantes persistentes y ubicuos que se encuentran en el agua, se acumulan en sedimentos, suelos e incluso en la biota. Debido a su persistencia, toxicidad, bioacumulación y carcinogenicidad, los HAPs en agua y agua residual deben de ser erradicados. Cada año, aproximadamente 9406 toneladas métricas de HAPs son producidas en los Estados Unidos, Suecia y Noruega.⁴⁸

El desarrollo de un método para la biorremediación de los HAPs va de la mano con distintas disciplinas como la química orgánica, la química analítica y la microbiología. Para el desarrollo se tienen que tomar en cuenta las características fisicoquímicas que hacen a estos compuestos tan perdurables en el medio a pesar de los esfuerzos realizados para su reducción.⁴⁹ La preservación del medio ambiente es un tema que debe ocuparnos como sociedad, ya que como es sabido

por todos, nuestro ecosistema se encuentra cada vez más afectado por los desechos, principalmente de industrias como la petrolera, farmacéutica y de alimentos. El uso de la biotecnología ambiental representa una solución para la remediación de ecosistemas contaminados.⁵¹ Por todo lo anterior, en el presente trabajo se pretende contribuir a la creación de un método de biorremediación investigando acerca del comportamiento de dos especies de microalgas en la remoción de los HAPs de un medio acuoso.

HIPÓTESIS

A pesar de que las algas serán inmovilizadas en cuentas de alginato, éstas lograrán captar a los contaminantes para lograr una reducción gradual a través del tiempo de HAPs presentes en agua potable.

OBJETIVOS

General

- Evaluar la capacidad de las microalgas *Selenastrum capricornutum* y *Scenedesmus acutus* inmovilizadas en cuentas de alginato para retener al Benzo(a)Pireno y Benzo(a)Antraceno en agua potable fortificada con la mezcla de los compuestos mediante el uso de un método analítico basado en Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS) y Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con Detección UV.

Particulares

- Determinar las condiciones de crecimiento de microalgas en medios de cultivo nutritivo.
- Re-validar la metodología basada en DMFS para la extracción de BaP y BaA remanentes en los componentes de los cultivos con microalgas inmovilizadas (biomasa) y cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a un detector UV.
- Realizar ensayos de exposición en agua potable con *S. acutus* y *S. capricornutum* inmovilizadas en cuentas de alginato de calcio para evaluar la sorción de BaP y BaA en mezcla, bajo condiciones de agitación, temperatura y luz controladas.
- Comparar la capacidad de sorción de cada alga frente a los hidrocarburos en medio acuoso y la capacidad de sorción de *S. capricornutum* frente a BaP en medio de cultivo.
- Comprobar que se mantiene una viabilidad celular antes y después de la inmovilización.

CAPÍTULO 2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Equipos, materiales y reactivos

2.1.1 Equipos

- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución 2998 (WATERS), con dos bombas, cuyos componentes son:
 - Software de control y procesamiento de datos Eurochrom, edición V 3.05.
 - Bucle de inyección de 20 µL
 - Calentador de columna TC- 50 (EPPENDORF)
 - Precolumna de 20 x 2 mm, empacada con adsorbente Nucleosil 100-5 C18, 5 µm (MACHEREY- NAGEL)
 - Columna analítica Gemini de 150 x 4.6 mm, empacada con fase inversa C18 tamaño de partícula 5 µm (PHENOMENEX)
- Detector espectrofotométrico UV de arreglo de diodos 2998 (WATERS)
- Baño de ultrasonido modelo 1510, para desgasificación de la fase móvil (BRANSON)
- Balanza analítica AV 114 C (OHAUS)
- Autoclave eléctrica 2540EL (TUTTNAUER)
- Agitador orbital 2309 UPN (THERMO SCIENTIFIC)
- Agitador con controlador de temperatura SI-600 R (JEIOTECH)
- Microscopio óptico USA (NATIONAL OPTICAL)
- Parrilla con agitación magnética (DAIGGER)

- Centrifuga 225 (THERMOFISHER SCIENTIFIC)
- Campana de flujo laminar 11231 BBC86 (BIOBASE)
- Bomba peristáltica Multiflow (LAMBDA)
- Espectrofotómetro Spectronic Genesys 5 (THERMOSCIENTIFIC)

2.1.2 Materiales

- Lámparas fluorescentes de 14 watts (OSRAM)
- Lámpara con foco de luz amarilla 20 watts (OSRAM)
- Sílice C-18 supelclean de 45 μm de diámetro de partícula (SUPELCO)
- Asa bacteriológica
- Tubos de ensayo
- Mecheros Bunsen
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Celdas de plástico para espectrofotómetro
- Sistema de esterilización aséptico Sterifil con porta filtros de 47 mm (MILLIPORE)
- Filtros de nitrocelulosa estériles de tamaño de poro de 0.22 μm y 47 mm de diámetro para el sistema Sterifil (MILLIPORE)
- Matraces Erlenmeyer 50, 125, 250 y 300 mL
- Matraces Volumétricos 25 y 100 mL
- Jeringas con émbolo y conectores
- Cartuchos 1 y 6 mL

- Frascos Wheaton 125, 250 y 1000 mL
- Probetas 10, 25 y 50 mL
- Pipeta graduada 5 mL
- Frites 1 mL
- Viales ámbar 1.5 mL
- Tubos para centrífuga 15 mL
- Pipetas Pasteur plástico
- Micropipetas 25 µL- 250µL TRANSFERPETTE
- Morteros y pistilo de ágata
- Perilla de seguridad
- Cámara de conteo Neubauer

2.1.3 Reactivos/ Disolventes

- Estándar de Benzo[a]antraceno y Benzo[a]pireno, pureza >99 %
(CHEMSERVICE)
- Cloruro de calcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (SIGMA-ALDRICH)
- Alginato de sodio (SIGMA-ALDRICH)
- Citrato de sodio (SIGMA-ALDRICH)
- Metanol grado HPLC (JT Baker)
- Acetonitrilo grado HPLC (JT Baker)
- Peptona proteasa (MCD Lab)
- Agar bacteriológico (MCD Lab)
- Agua destilada

- Alcohol etílico

2.1.3 Cepas y medios de cultivo

- Microorganismos *Selenastrum capricornutum* y *Scenedesmus acutus*, cepas adquiridas de la colección de cultivos de algas de la Universidad de Austin, Texas (UTEX, EUA).
- Medio Bristol: nitrato de sodio (NaNO_3), cloruro de calcio (CaCl_2), sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), fosfato dibásico de potasio (Na_2HPO_4), cloruro de sodio (NaCl). (JT BAKER). La composición del medio Bristol se indica en la tabla 2.1, al cual se le adicionó peptona al 1%.

2.2 Procedimiento experimental

Un diagrama de la metodología que se llevó a cabo durante el proceso experimental se presenta en la figura 2.0.

Diagrama de metodología analítica

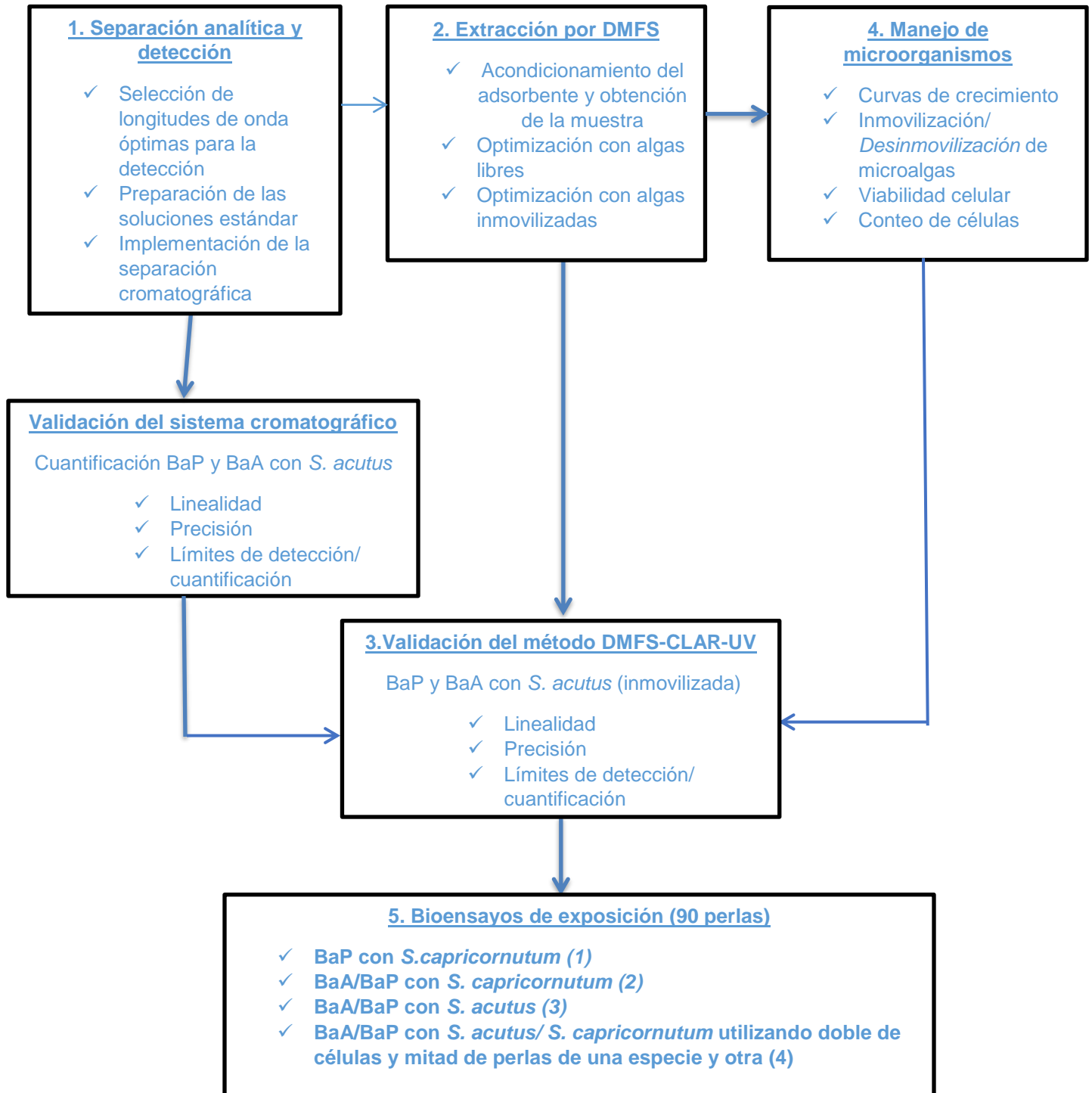


Figura 2.0. Esquema general de experimentación

Se trató de un estudio experimental-longitudinal-retrospectivo. En este caso se habla de un estudio experimental ya que desde un inicio se plantearon los factores de estudio y se controlaron de forma deliberada bajo ciertas condiciones para su análisis posterior (se seguía un plan previamente desarrollado en un anteproyecto). Algunas de las ventajas que implica el desarrollo de un estudio experimental es que se tiene un mayor “control” sobre las posibles respuestas arrojadas por las variables y se tiene una mejor evidencia de causa-efecto.

Un estudio retrospectivo implica que se puede establecer una secuencia temporal entre las variables a estudiar, a diferencia de los estudios transversales, que examinan la respuesta (s) de una variable en un solo momento del tiempo. El estudio también se considera retrospectivo ya que el diseño de éste se realizó también con ayuda de estudios posteriores, es decir, se analizaron resultados anteriores encontrados para la remoción de HAPs con algas y a partir de ellos se planteó un plan de trabajo. La población objetivo en este estudio fueron las microalgas y los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) ya que lo que se pretendía inicialmente era continuar con estudios previos de biorremoción de contaminantes.

La población muestreada fueron *S. capricornutum*/*S. acutus* (algas) y BaA/BaP (HAPs). Las especies de algas fueron elegidas ya que se tenían registros de su capacidad de sorción/ remoción y los tiempos en que ocurrían. Los HAPs elegidos también fueron tomados en cuenta porque habían sido utilizados en estudios previos y por su mayor facilidad de remoción/sorción debido a sus múltiples anillos presentes en su estructura.

Las principales variables dependientes presentes a lo largo del estudio (ensayos de exposición) fueron las algas/HAPs utilizados, los tiempos de exposición, las condiciones de luz, temperatura y agitación.

La variable dependiente a estudiar era la sorción del hidrocarburo por parte del alga (determinado por la presencia o ausencia de HAPs en biomasa), lo cual era medido a través de la cromatografía líquidos de alta resolución.

La técnica utilizada para el tratamiento de las muestras fue la dispersión de matriz en fase sólida y para el análisis de resultados se utilizó el análisis estadístico de un factor (ANOVA) para cada tiempo.

2.3 Implementación de la separación analítica

El cromatógrafo de líquidos Waters utilizados durante el proceso experimental es mostrado en la figura 2.1.



Figura 2.1 Cromatógrafo Waters utilizado durante el proceso experimental (imagen propia)

2.3.1 Soluciones estándar

Se preparó una solución estándar que contenía a los dos HAPs en mezcla: BaA y BaP, a una concentración de 25.36 mg/L y 25.06 mg/L respectivamente, utilizando metanol como disolvente. La solución estándar con la mezcla de hidrocarburos se preparó a partir de soluciones que contenían a cada HAP, por separado. La disolución estándar de la mezcla de HAPs se utilizó para realizar la validación y los bioensayos, excepto en el caso del bioensayo de *S. capricornutum* con BaP, en el cuál se utilizó una disolución de BaP solo a una concentración de 91.4 mg/L. Todas las soluciones y muestras se almacenaron en viales ámbar, a una temperatura de 4 °C, con el fin de evitar que los líquidos se volatizaran.

2.3.2 Implementación de la separación cromatográfica

Eficiencia de la separación cromatográfica

Santiago León, 2016⁴⁸ había establecido en su trabajo las condiciones para la optimización de la separación cromatográfica de los analitos de interés (la fase móvil que se utilizó fue metanol al 95% con agua 5%, utilizando un flujo isocrático de 1 mL/min; la columna analítica Gemini de 150 x 4.6 mm, empacada con fase inversa C18 tamaño de partícula 5 µm y una precolumna de 20 x 2 mm, empacada con adsorbente Nucleosil 100-5 C18, 5 µm).

Para la determinación de los parámetros: resolución (R_s), factor de capacidad (k') número de platos teóricos (N) y selectividad (α), se evaluó la eficiencia de la columna utilizando los siguientes compuestos modelo: Naftaleno a 11 mg/L y Antraceno a 2.5 mg/L con una fase móvil 80% metanol y 20% de agua. Una

disolución de NaNO_3 a 100 mg/L se usó para la evaluación del tiempo muerto. Se realizaron tres réplicas.

Parámetros cromatográficos de los analitos de interés

Se calcularon los mismos parámetros cromatográficos mencionados en el punto anterior para el caso de los analitos de interés: BaA y BaP (4 mg/L). Se utilizó la misma columna analítica Gemini y una fase móvil con metanol al 95% y agua 5%, Las longitudes de onda máximas elegidas fueron de 285.5 nm para B[a]A y 295 nm para B[a]P.

2.4 Validación del sistema cromatográfico

2.4.1 Linealidad del sistema

Se construyó una curva de 7 niveles de concentración, por triplicado. Se prepararon disoluciones de la mezcla de ambos hidrocarburos B[a]P y B[a]A en las siguientes concentraciones: 0.0625, 0.125, 0.25, 1, 2, 4 y 6 mg/L. La curva se construyó mediante la integración de las áreas de los picos obtenidos en los cromatogramas, graficándose área vs concentración. Se utilizaron las condiciones isocráticas previamente mencionadas. Se llevó a cabo una regresión lineal, se obtuvo el valor del coeficiente de determinación r^2 , y con este parámetro se evaluó la linealidad.

2.4.2 Precisión del sistema

Se evaluó la repetibilidad (variación entre determinaciones independientes, bajo las mismas condiciones como parámetro para determinar la precisión del sistema. Para su determinación, se inyectaron por quintuplicado disoluciones estándar de B[a]A y

B[a]P a 4 mg/L. La repetibilidad se evaluó con el C.V. de las áreas obtenidas durante un mismo día de experimentación. Se calculó el % CV con la siguiente ecuación:

$$\%CV = (\sigma/x) * 100$$

Donde x es la media de las áreas obtenidas y σ es la desviación estándar.

2.4.3 Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC) del sistema

Para la determinación de los límites de detección y cuantificación se elaboraron curvas de calibración de cada uno de los compuestos, tanto de BaA y BaP. Se inyectaron disoluciones con cinco concentraciones por triplicado: 1.0, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 mg/L. Los límites fueron estimados mediante las siguientes fórmulas:

$$LD = (3.3 * S_{y/x}) / b_1$$

$$LC = (10 * S_{y/x}) / b_1$$

$S_{y/x}$ representa la desviación estándar de la regresión y b_1 es la pendiente de la curva de calibración.

2.5 Optimización de la extracción por DMFS

2.5.1 Acondicionamiento del adsorbente y obtención de la muestra

Acondicionamiento del adsorbente: Previo a realizar el procedimiento de DMFS, la fase estacionaria C 18 se acondicionó con metanol en una relación de 5 mL/ g de fase estacionaria. Se empacó el adsorbente en cartuchos más grandes que los usados para la extracción de los HAPs para así meter una mayor cantidad de fase a acondicionar, después de aplicado el metanol se dejó secar el adsorbente

mediante vacío. Este paso tiene como fin alinear las cadenas hidrocarbonadas que se encuentran unidas al disolvente para favorecer la interacción de los analitos.

2.5.2 Dispersión de matriz en fase sólida

Para realizar la dispersión de matriz en fase sólida se siguió la metodología previamente señalada para la extracción de HAPs de la biomasa proveniente de cultivos sin inmovilización.⁵¹ En el manejo de la biomasa proveniente de las cuentas de alginato, se incluyó un paso previo, el cual consiste en disolver las cuentas de alginato con una disolución de citrato de sodio al 10% con el objetivo de liberar las microalgas y después ponerlas a secar en portaobjetos durante un día. Las referencias mencionan que de un cultivo de 15 mL de cultivo líquido de crecimiento a absorbancia 1 se obtienen 5 mg de biomasa microalgal seca, la cual es adicionada con el HAP/ HAPs a determinar. Por lo tanto, en este trabajo se dopó la muestra con cantidad conocida de 4 µg de cada HAP en el caso de la optimización del método y en el caso de los bioensayos esta misma cantidad se agregó a los cultivos con las microalgas en las perlas. Posteriormente, la biomasa microalgal seca fue mezclada con 100 mg de sílice C18 (previamente acondicionada) y dispersada en un mortero de ágata con pistilo, hasta que la mezcla sea homogénea. Posteriormente se empacó la mezcla homogénea en un cartucho de 1 mL que contenía un frit, y después se realizó una secuencia de lavados que consistió en:

-5 mL de agua destilada

-5 mL de ACN al 20%

- 1.5 mL de ACN al 40%

Finalmente, se eluyó a los HAPs con 1 mL ACN al 90 % para recolectar la fracción de interés o extracto, la cual se analizó por CLAR. En la Figura 2.2 se ilustra este procedimiento.

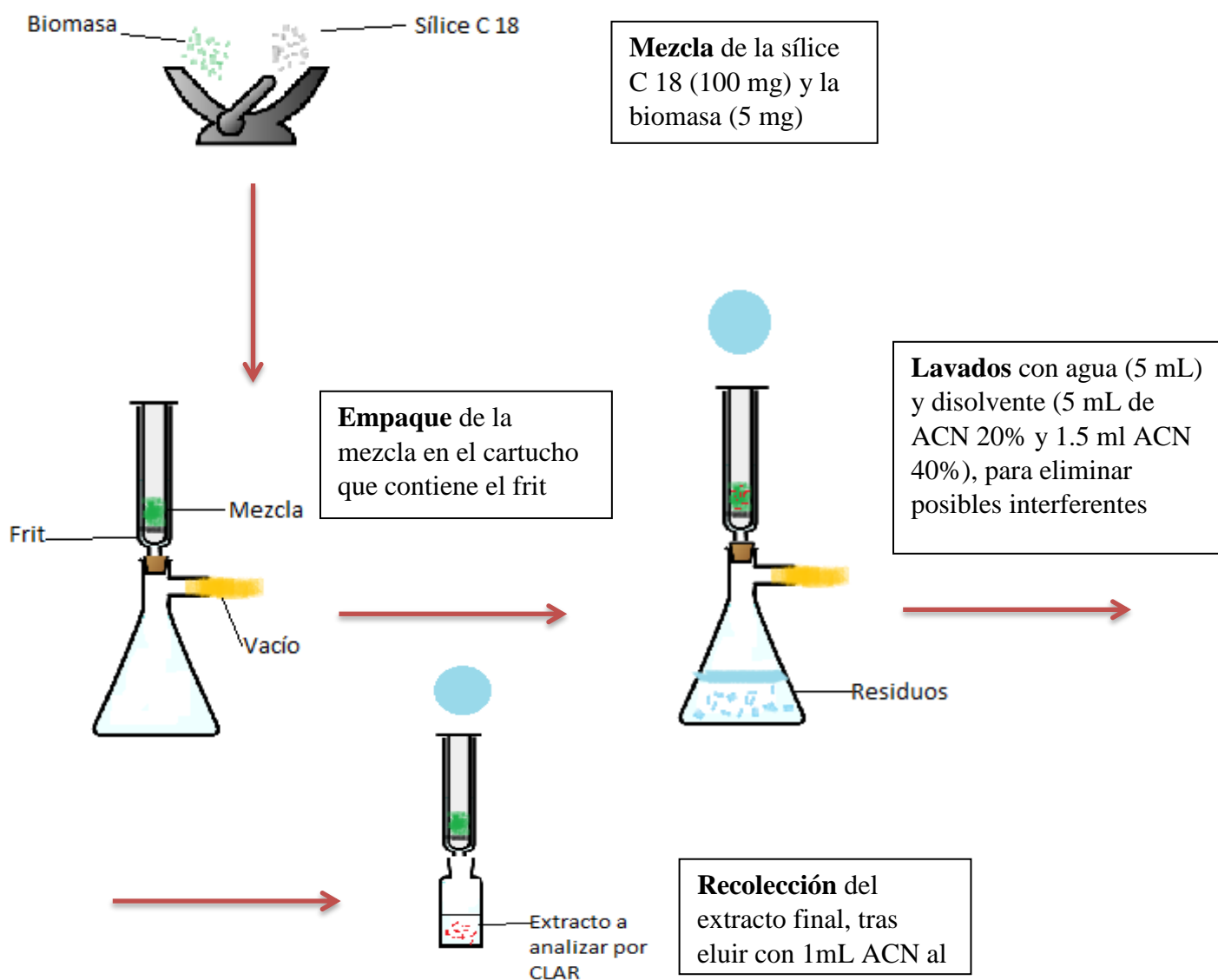


Figura 2.2 Metodología general de la dispersión de matriz en fase sólida

Con la metodología de extracción descrita se realizaron triplicados para evaluar el recobro y su reproducibilidad en algas libres y algas inmovilizadas. El C.V se obtuvo

a partir de las áreas obtenidas tras analizar los extractos por CLAR. Se utilizó la siguiente ecuación para determinar el valor del recobro:

$$\% \text{Recobro} = (\text{Área del extracto}) / (\text{Área del estándar}) * 100$$

2.6 Manejo de microorganismos

Para el trabajo microbiológico se utilizó medio Bristol (preparación en tabla 2.1) con agar y proteasa para hacer cultivos de conservación de las algas en medio sólido (tubos) y cultivos de crecimiento con medio Bristol y proteasa en medio líquido (matraces), los cuáles fueron esterilizados previamente al inóculo de las microalgas en la autoclave (121 °, 30 minutos). Posteriormente, los cultivos líquidos se dejaron en crecimiento con agitación constante, temperatura ambiente y con iluminación en ciclos luz/oscuridad de 16/8 hrs. Los cultivos sólidos se crecieron con exposición a la luz en ciclos luz/oscuridad de 16/8 hrs.

Posteriormente, con ayuda de un asa bacteriológica y en condiciones estériles, se transfirieron las microalgas a un medio líquido, y se hicieron desarrollar allí hasta que su absorbancia alcanzara el valor de 1. Un valor de absorbancia 1 equivale a 4.5×10^6 células/mL para *S. capricornutum* y 4×10^6 células/mL para *S. acutus*.³⁸

Se utilizaron los cultivos de *S. capricornutum* y *S. acutus* al alcanzar un valor de 1 de absorbancia, lo cual fue monitoreado con ayuda del espectrofotómetro a una longitud de onda de 685 nm (longitud de onda de máxima absorción de la clorofila). Los cultivos líquidos se agitaron constantemente a lo largo del día como se indicó anteriormente. Los cultivos en el agitador se presentan en la figura 2.3



Figura 2.3 Mantenimiento de algas y agitación de medios de cultivo (imagen propia)

Tabla 2.1 Componentes para la preparación de medio Bristol. El volumen de solución “stock” para 1 L de cultivo(UTEX, 1949).

Componente	Concentración de la disolución <i>stock</i>	Concentración final en 1 L de cultivo (mM)
NaNO ₃	10 g/400 mL	2.94
Componente	Concentración de la disolución <i>stock</i>	Concentración final en 1 L de cultivo (mM)
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1 g/400 mL	0.17
MgSO ₄ ·7H ₂ O	3 g/400 mL	0.30
K ₂ HPO ₄	3 g/400 mL	0.43
KH ₂ PO ₄	7 g/400 mL	1.29
NaCl	1 g/400 mL	0.43

2.6.1 Obtención de las muestras para DMFS

La obtención de la muestra se realizó mediante la separación del medio líquido y la biomasa por medio de la centrifugación a 3900 rpm durante 20 minutos de 15 mL

del cultivo a una absorbancia de 1, medición que se puede relacionar a un número de células de entre 4.5×10^6 células/mL para la microalga *S. capricornutum* y 4.0×10^6 células/mL para *S. acutus*. En el caso de algas inmobilizadas se utilizan muestras provenientes de cuentas con microalgas, las cuales se separan por decantación y *desinmovilizando*, como se explica más adelante.

2.6.2 Curvas de crecimiento

Se construyeron curvas de crecimiento de cada alga, con el objetivo de monitorear el crecimiento de éstas por día y tener una idea de cuánto tiempo se necesitaba para que los cultivos alcanzaran el 1 de absorbancia en el espectrofotómetro. Se construyó una curva A vs. tiempo a 685 nm. La apariencia de un cultivo de crecimiento con absorbancia 1 se presenta en la figura 2.4.

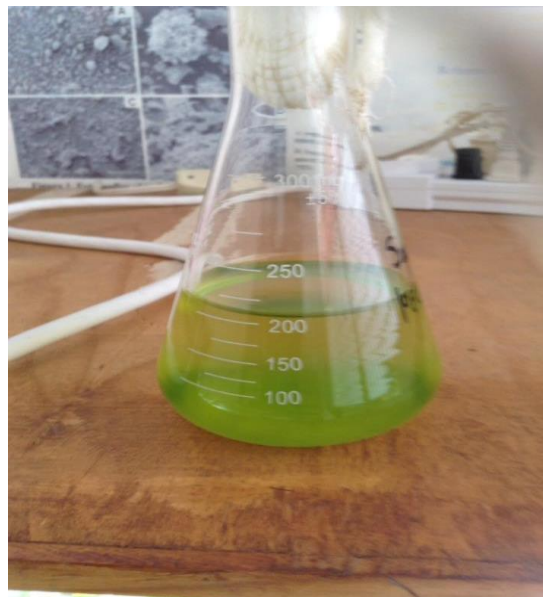


Figura 2.4 Cultivo de *S. capricornutum* con absorbancia 1 (imagen propia)

2.6.3 Inmovilización/*desinmovilización* de algas

Inmovilización del número normal de células

La inmovilización de las algas en cuentas se logró utilizando alginato. Para ello, se tomaron 15 mL de medios de cultivo que contenían al alga de interés en absorbancia 1 con 4.5×10^6 células/mL para la microalga *S. capricornutum* y 4.0×10^6 células/mL para *S. acutus*. Se centrifugó a 3,900 rpm durante 15 minutos para obtener el “botón” de biomasa, el cual se resuspendió en 2 mL de sobrenadante; estos 2 mL de medio con microalgas se mezclaron con 4 mL de una solución de alginato de sodio al 3%. Se agitó y se goteó todo el líquido en un matraz, que contenía 20 mL de una solución de CaCl_2 al 1%. El goteo debió ser constante y sin dejar formar burbujas de aire, las cuales podían afectar las formas de las perlas; así se obtuvieron cerca de 90 perlas por cada matraz. Las perlas se dejaron en 15 mL de medio Bristol o agua potable, dependiendo el caso. De esta manera se obtuvieron cuentas con $[4.5 \times 10^6 \times 15] / 90 = 7.5 \times 10^5$ células por cuenta para *S. capricornutum* y $[4 \times 10^6 \times 15] / 90 = 6.6 \times 10^5$ células por cuenta para *S. acutus*. Estos valores se consideraron como el número normal de células por cuenta.

Desinmovilización

La biomasa que se encontró en las cuentas se recuperó con ayuda de una solución de citrato de sodio al 10%, primero para efectuar la optimización del método y después de los bioensayos de exposición. Las perlas obtenidas mediante inmovilización que se encontraban en matraces se transfirieron a tubos de centrifuga, donde se les adicionó el citrato de sodio para disolver el alginato y liberar

a las células; posteriormente, se agitó y se centrifugó durante 15 minutos a 3,900 rpm para obtener un “botón” de biomasa.⁵² Finalmente se desechó el líquido sobrenadante y el “botón” de biomasa se resuspendió con medio Bristol, se colocó en un portaobjetos limpio y se dejó secar para su posterior uso en DMFS.

2.6.4 Viabilidad celular: Resiembra

Para comprobar que las células seguían creciendo aún después de inmovilizarlas en las cuentas de alginato, se utilizaron 15 mL de medio que contenía al alga *S. acutus* (al ser el alga que más rápido crece) en absorbancia 1. El alga se inmovilizó en cuentas de alginato, se incubaron en medio Bristol en exposición a luz para permitir su crecimiento, durante 24 horas. Posteriormente, las cuentas de alginato se deshicieron con ayuda de una disolución citrato de sodio al 10 %; la disolución obtenida se centrifugó para obtener un “botón” de biomasa en el fondo del tubo para centrifuga. Este “botón” se utilizó para hacer una resiembra en un tubo de vidrio que contenía agar y peptona (medio sólido), ideales para el crecimiento de las algas. El tubo se incubó a T ambiente con lámparas fluorescentes y observó durante dos semanas, con el fin de comprobar el crecimiento del alga después de la resiembra.

2.6.5 Conteo de células

Se realizó un conteo de células por cámara de Neubauer, para seguir el crecimiento de las microalgas y saber cuantitativamente como lo hacían después de inmovilizarlas, como una prueba adicional a la viabilidad celular. Para lo anterior se utilizaron dos cultivos de *S. capricornutum* y dos de *S. acutus* con absorbancia 1 para realizar el conteo antes de inmovilizar las células y después de

desinmovilizarlas. El conteo se realizó en una cámara de Neubauer, la cual es una cámara de contaje para observar al microscopio; en ésta se colocó un volumen de medio con algas, de aproximadamente 0.5 mL, por capilaridad entre un cubreobjetos calibrado y la cámara. Para el conteo de las microalgas se tomaron en cuenta los 5 cuadros diagonales de la cuadrícula y para el caso de las microalgas que se encontraban en las líneas divisorias, sólo se consideraron las que se encontraban sobre la línea derecha e inferior de cada cuadrante. El número de cuadros totales de la cámara es 400 y el número de cuadros que se contabilizaron fueron 80 (contenidos en 5 cuadros grandes diagonales). Una vez contabilizadas las células se procedió a graficar el número de células/ mL que había de cada alga en cada tubo, a través del tiempo. El número de células/ mL se estableció con una fórmula que se menciona más adelante en este escrito.

Una vez realizado el conteo de las microalgas, se procedió a inmovilizarlas como se mencionó anteriormente y una vez formadas las perlas, se dejaron en los matraces con agua potable y en iluminación con lámparas fluorescentes con periodos de luz/oscuridad de 16/8 horas durante 24 y 72 horas. Una vez cumplido el tiempo establecido, se *desinmovilizaban* las cuentas con alginato de sodio al 10% y se obtuvo un “botón” tras centrifugar a 3900 rpm. Se resuspendió el “botón” y se tomaba muestra para realizar el mismo procedimiento de conteo en la cámara. El procedimiento anterior se realizó por duplicado para cada alga.

2.7 Validación del método DMFS- CLAR-UV

2.7.1 Linealidad del método DMFS- CLAR-UV

La evaluación de la linealidad del método se llevó a cabo con el alga *S. acutus* y la solución *stock* que contenía a los dos HAPS para fortificar a los 5 mg de biomasa seca con cantidades superiores e inferiores a los 4 µg.

Se trabajó con una concentración base de 4 mg/L (simulando un extracto con 100% de recuperación) ya que corresponde a la concentración esperada en los extractos provenientes de los bioensayos de exposición si se recuperan los 4 µg en 1 mL del extracto acetonitrílico. Se tomó una concentración de 6 mg/L, por encima de la concentración base y cuatro por debajo de 0.2, 0.5, 1 y 2 mg/L para construir la curva de calibración. Las concentraciones de HAPs adicionadas (µg/mg de biomasa) y esperadas en el extracto de 1 mL (mg/L) que se utilizaron para la curva de calibración se mencionan en la tabla 2.2.

Tabla 2.2 Concentraciones de HAPs (µg/mg) añadidos a la biomasa (5 mg) y concentración esperada (mg/L) en el extracto de 1 mL

Concentración de HAPs adicionadas en la biomasa (µg/mg)	Concentración esperada en el extracto (mg/L)
0.04	0.2
0.10	0.5
0.19	1
0.36	2

0.75	4
1.14	6

Se siguió la metodología descrita anteriormente para DMFS y posteriormente se realizó una curva por triplicado (una por cada HAP), graficando los μg de hidrocarburo recuperados en función de los μg adicionados para obtener el recobro global con la pendiente y r^2 como parámetro de linealidad.

Los μg adicionados al medio se calcularon mediante la siguiente fórmula:

$$\mu\text{g adicionados} = \frac{\text{Volumen de alícuota } (\mu\text{L}) * \text{Concentración solución } \textit{stock} \text{ (ng}/\mu\text{L)}}{1000}$$

Los μg recuperados se determinaron por:

$$\mu\text{g recuperados} = \frac{\text{Área del extracto}}{\text{Área del estándar}} \times \mu\text{g adicionados}$$

2.7.2 Precisión del método DMFS- CLAR-UV

Se trabajó durante tres días y se fortificaron 5 mg de biomasa con 4 μg de cada HAPs, lo cual corresponde a 4 mg/L en el extracto, considerando una recuperación del 100%. Por lo tanto, se dopó la biomasa con 158 μL de la disolución *stock*. Para evaluar la repetibilidad del método se realizaron tres réplicas con el fin de obtener el C.V de las áreas por día. Para evaluar la reproducibilidad se tomaron en cuenta las tres réplicas realizadas en cada uno de los tres días de experimentación. Se tomó el promedio de las áreas obtenidas por día y se obtuvo el C.V., como ya se había señalado con anterioridad.

2.7.3 Límite de detección (L.D.) y límite de cuantificación (L.C.) del método DMFS- CLAR-UV

Para la determinación de los límites se construyó una curva con algunas de las concentraciones utilizadas para linealidad: 0.2, 0.5, 1 y 2 µg de HAP en biomasa. Se realizaron tres réplicas por concentración y se graficó la concentración (µg hidrocarburo/mg de biomasa) contra las áreas resultantes; se calcularon los límites utilizando la desviación estándar de la regresión y con las siguientes ecuaciones:

$$LD = (3.3 \cdot S_y/x) / b_1$$

$$LC = (10 \cdot S_y/x) / b_1$$

2.8 Bioensayos

Se realizaron 4 tipos diferentes de bioensayos de exposición con las perlas sumergidas en 15 mL de agua potable adicionada con 4 µg de cada HAP (266 µg/L):

- 1- Bioensayo de exposición *S. capricornutum* con BaP (número normal de células)
- 2- Bioensayo de exposición *S. capricornutum* con mezcla BaP/BaA (número normal de células)
- 3- Bioensayo de exposición *S. acutus* con mezcla BaP/BaA (número normal de células)
- 4- Bioensayos con doble número de células para cada especie y combinación *S. acutus/S. capricornutum* con mezcla BaP/BaA con número normal de células.

Las exposiciones se realizaron colocando 90 perlas en 15 mL de agua potable, excepto en el bioensayo de *S. capricornutum* con BaP, donde se utilizó medio Bristol para exponer las perlas.

Para obtener el número de microalgas que había en cada perla se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{Microalga/perla} = \frac{\# \text{ de microalgas}}{\text{mL}} * \frac{\text{Volumen de alícuota (mL)}}{\# \text{ de perlas}}$$

Para *S. capricornutum* el número de microalgas por perla resultó ser 7.5×10^5

Para *S. acutus* el número de microalgas por perla resultó ser 6.6×10^5

La biomasa se inmovilizó y recuperó como se indica en la figura 2.5.

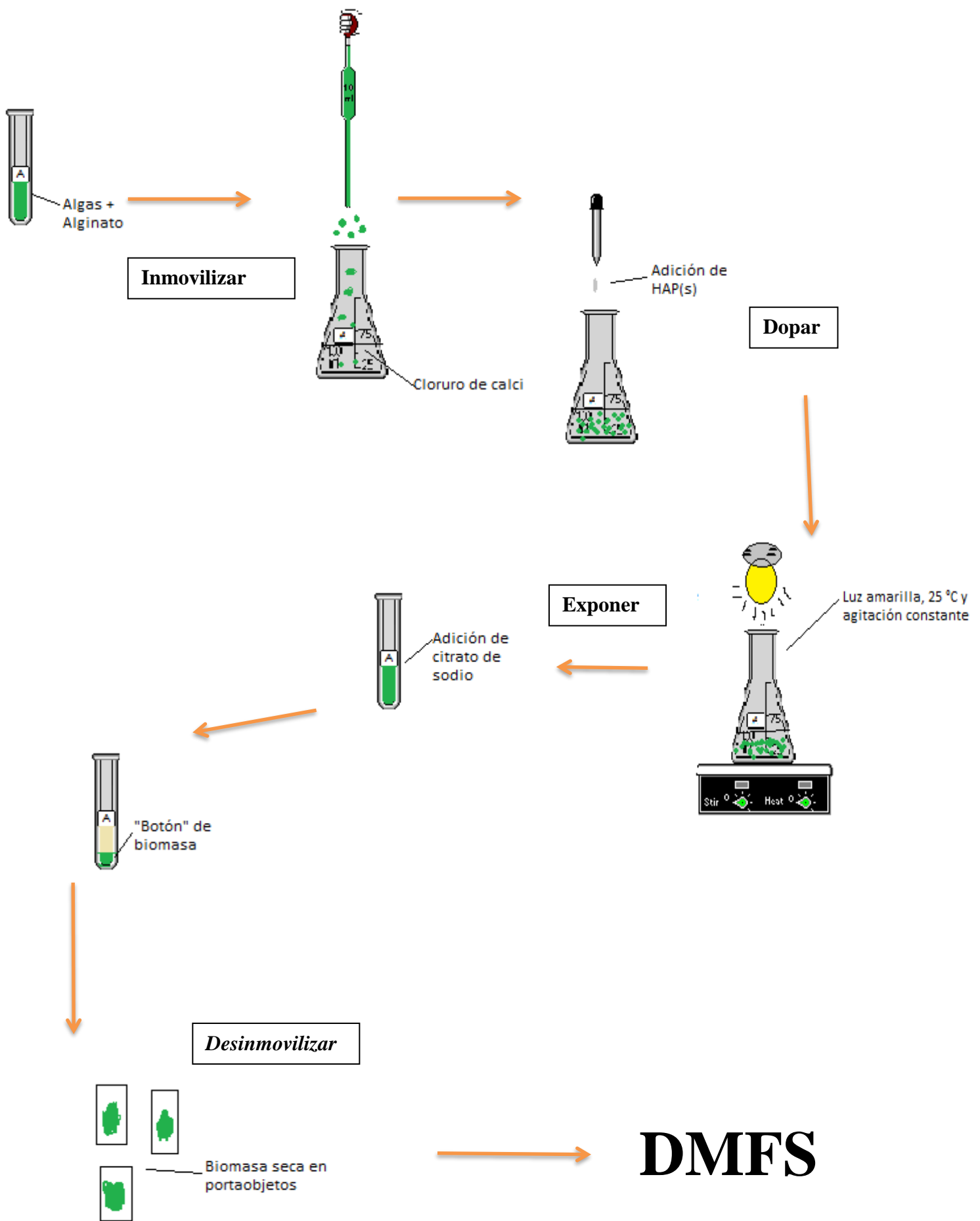


Figura 2.5 Metodología general de la inmovilización y recuperación de la biomasa

2.8.1 Bioensayo (1) de exposición *S. capricornutum* con BaP

Primeramente, se llevó a cabo el bioensayo de *S. capricornutum* con el hidrocarburo BaP solo para tener una idea de cómo las microalgas removían al hidrocarburo más pesado de los que se manejaron a través del tiempo. Se inmovilizó el alga en cuentas de alginato (90 perlas por matraz) y se expuso en 15 mL de agua potable adicionada con 4 µg de del hidrocarburo (se utilizó una solución *stock* de 91.4 mg/L del hidrocarburo de interés y se tomaron alícuotas de 44 µL). Se usaron 7 tiempos de incubación: 1.5, 3, 6, 9, 15, 24 y 48 h, cada uno con su respectivo blanco, el cual consistió en matraces con perlas de alginato y 15 mL de agua potable sin la adición de hidrocarburo para tener un control de interferentes de la matriz en la experimentación y se expusieron utilizando luz amarilla, a 25 °C y agitación constante de 50 rpm. Se realizaron tres réplicas por tiempo y una vez transcurrido el tiempo de exposición, las cuentas se *desinmovilizaron* con una solución de citrato de sodio al 10% y posteriormente se trató la biomasa por DMFS; los extractos se analizaron por CLAR-UV. También se realizaron “controles de sorción” con exposición de las cuentas sin microalgas para determinar la retención del hidrocarburo en el alginato.

Al final se graficó la cantidad de BaP (ng) recuperada a través del tiempo para obtener una curva que indicara el tiempo en el que se presentaba la mayor remoción del hidrocarburo. Los extractos de los blancos se analizaron para observar si existían interferentes provenientes de la matriz.

2.8.2 Bioensayo (2) de exposición *S. capricornutum* con mezcla BaP/BaA

En el segundo bioensayo realizado, el alga *S. capricornutum* se dejó en exposición con 4 µg de cada uno de los hidrocarburos BaA y BaP, que se encontraban en mezcla. Se inmovilizó el alga en cuentas de alginato (90 perlas por matraz). Se usaron 5 tiempos de incubación: 1.5, 3, 6, 15 y 24 h, cada uno con su respectivo blanco, el cual consistió en formar perlas de alginato sin la adición de hidrocarburo para tener un control en la matriz y se expusieron utilizando luz amarilla, a 25 °C y agitación constante de 50 rpm. Se realizaron tres réplicas por tiempo y una vez transcurrido el tiempo de exposición, las cuentas se *desinmovilizaron* con 10 mL de una solución de citrato de sodio al 10% y posteriormente se trató la biomasa por DMFS; los extractos se analizaron por CLAR- UV.

Al final se graficó la cantidad de BaP y BaA remanente (ng) a través del tiempo para obtener una curva que indicara el tiempo en el que se presentaba la mayor sorción de cada hidrocarburo por parte del alga.

2.8.3 Bioensayo (3) de exposición *S. acutus* con mezcla BaP/BaA

En el tercer bioensayo realizado, el alga *S. acutus* se dejó en exposición con 4 µg de cada uno de los hidrocarburos BaA y BaP, que se encontraban en mezcla. Se usaron 5 tiempos de exposición: 3, 6, 15, 24 y 48 h, cada uno con su respectivo blanco y se expusieron utilizando luz amarilla, a 25 °C y agitación constante de 50 rpm. Se realizaron tres réplicas por tiempo y una vez transcurrido el tiempo de exposición, las cuentas se *desinmovilizaron* con 10 mL una solución de citrato de

sodio al 10% y posteriormente se trató la biomasa por DMFS; los extractos se analizaron por CLAR- UV.

Al final se graficó la cantidad remanente de BaP y BaA (ng) a través del tiempo para obtener una curva que indicara el tiempo en el que se presentaba la mayor remoción de cada hidrocarburo por parte del alga.

2.8.4 Bioensayos (4) con doble número de células y mezcla de *S acutus*/*S capricornutum*

En estos últimos tres ensayos se realizaron exposiciones con: modificación de la cantidad de microalgas por cuenta al doble (Bioensayo 4a. 1.5×10^6 microalgas/cuenta para *S. capricornutum* y 4b. 1.3×10^6 microalgas/cuenta para *S. acutus*); también un bioensayo 4c. mezcla con el número normal de células de las perlas de cada especie (proporción 50:50), con 45/45 perlas de alginato. La preparación de estas cuentas con el doble de células y mezcla de especies se detalla en las siguientes secciones:

2.8.4.1 Preparación del doble de microalgas por cuenta

Se tomaron dos alícuotas de 15 mL del mismo cultivo con absorbancia de 1, las cuales se centrifugaron por separado durante 15 minutos a 3900 rpm, y los “botones” de biomasa se resuspendieron en 1 mL de sobrenadante. Se juntaron ambos sobrenadantes con biomasa en un solo tubo y después se siguió la misma metodología utilizada para la inmovilización.

Para *S. capricornutum* el número de microalgas se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{Microalgas/ perla} = \frac{\# \text{ de microalgas}}{\text{mL}} * \frac{\text{Volumen de alícuota (mL)}}{\# \text{ de perlas}}$$

El volumen de la alícuota se multiplica por dos y resulta ser:

$$\text{Microalgas/perla} = \frac{4.5 \times 10^6 \text{ microalgas}}{1 \text{ mL}} * \frac{2 \times 15 \text{ mL}}{90 \text{ perlas}} = 1.5 \times 10^6 \text{ microalgas/perla}$$

Para *S. acutus* el número de microalgas se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{Microalgas/ perla} = \frac{\# \text{ de microalgas}}{\text{mL}} * \frac{\text{Volumen de alícuota (mL)}}{\# \text{ de perlas}}$$

El volumen de la alícuota se multiplica por dos y resulta ser:

$$\text{Microalgas/perla} = \frac{4 \times 10^6 \text{ microalgas}}{1 \text{ mL}} * \frac{2 \times 15 \text{ mL}}{90 \text{ perlas}} = 1.3 \times 10^6 \text{ microalgas/perla}$$

2.8.4.2 Mezcla de perlas de cada especie

Se trabajó con 90 perlas totales, pero haciendo una mezcla de ambas especies de algas. Se siguió el mismo procedimiento señalado para la inmovilización hasta el punto de la preparación de la disolución de alginato-microalgas; se tenían 90 perlas de cada especie, pero solo se utilizaron 45 de cada una por bioensayo. Por lo anterior, cada cuenta tenía el mismo número de células (número normal de células) descrito en la sección 2.6: 7.5×10^5 células por cuenta para *S. capricornutum* y 6.6×10^5 células por cuenta para *S. acutus*. Como la proporción de especies que se eligió fue 50:50 se colocaron 45 perlas de cada especie, preparadas por separado,

para tener 90 perlas totales. Con este número de células se manejó el bioensayo 4c.

Al final se comparó la remoción de cada especie de microalga utilizando el doble de células (bioensayos 4a y 4b) y la presencia de las dos algas en mezcla con número normal de células (bioensayo 4c) con respecto a los bioensayos previamente mencionados en este trabajo en los que se utilizó el número de células normal por microalga (bioensayos 1-3). Se realizaron gráficas de barras para observar el hidrocarburo presente (ng) en cada tiempo. Los matraces en exposición en el agitador orbital se muestran en la figura 2.6



Figura 2.6 Bioensayos realizados en el agitador orbital Thermo Scientific (imagen propia)

2.8.5 Determinación de los HAPs en el alginato disuelto después de exposición

Se analizaron a los HAPs remanentes en el alginato disuelto (después de disolver las cuentas con citrato y centrifugar) con el objetivo de comprobar si en el alginato

se encontraba algún rastro de hidrocarburo y saber qué diferencia había con cuentas disueltas que no contenía microalgas (cuentas solas expuestas o controles de sorción) y cuentas disueltas que si contenían a las microalgas (bioensayos de exposición). Se analizaron 3 muestras: control de 48 h, bioensayo de 24 h y bioensayo de 48 h, Para este estudio se manejó la técnica de Extracción en Fase Sólida con un método previamente desarrollado en el laboratorio para la extracción de HAPs en medio líquido de cultivo², el cual fue optimizado para el alginato disuelto en citrato. El cambio con respecto al método previo consistió en quitar la adición de isopropanol a la muestra antes de cargarla al cartucho de extracción. Se comparó la respuesta de los HAPs en este extracto contra un estándar de 1 mg/L para así poder ver las diferencias que existían entre los picos cromatográfico, ya que el extracto fue de 4 mL de acetonitrilo (recuperación 100 % dado $4 \mu\text{g} / 4 \text{ mL}$ que equivale a 1 mg/L).

CAPÍTULO 3. Resultados y discusión de resultados

RESULTADOS

3.1 Implementación de la separación cromatográfica

Evaluación de la eficiencia de la columna

Los valores promedio obtenidos de los parámetros cromatográficos para la evaluación de la eficiencia de la columna analítica Gemini de 150 x 4.6 mm, empacada con fase inversa C18 con tamaño de partícula de 5 μm , se muestran en la tabla 3.1. El valor de resolución (R_s) obtenido fue de 6.8 para el antraceno y el naftaleno y es un indicio de que existe una adecuada separación de los picos, ya

que se encuentra por encima del valor de 1.5, el cual indica una buena separación. El factor de capacidad (k') en una separación cromatográfica señala la relación del tiempo transcurrido en la fase estacionaria contra el tiempo transcurrido en la fase móvil; en este caso el valor obtenido es de 3.60 para antraceno y 1.71 para naftaleno. Para tener una resolución óptima, el factor de capacidad debe tener un valor de entre 1 y 5, por lo que los valores obtenidos se encuentran dentro de dicho rango. El número de platos teóricos (N) es una cantidad adimensional que hace referencia a la eficiencia del sistema cromatográfico e indica el número de veces que el soluto se reparte entre la fase estacionaria y la fase móvil. Los valores encontrados en este caso fueron 2,753.044 para antraceno y 2,753.736 para naftaleno; entre mayor sean los valores habrá mejor eficiencia, ya que para obtener una buena repartición entre ambas fases N tiene que ser mayor a 2000.²¹

Parámetros cromatográficos de los analitos de interés

Los parámetros cromatográficos calculados para los compuestos de interés BaA y BaP con la misma columna y fase móvil se incluyen también en la tabla 3.1. En el anexo I se presenta un cromatograma tipo de una disolución estándar de la mezcla de BaA y BaP con las condiciones cromatográficas utilizadas. Se obtuvo una resolución adecuada con valores mayores a 1.5.

Tabla 3.1 Valores promedio de los parámetros evaluados para la eficiencia de la columna Gemini y los valores calculados para los analitos de interés.

Compuesto	Rs	A	k'	N	N/m	Wb (s)	tr (s)
Antraceno*	6.80	2.11	3.60	2,753.04	18353.62	32.15	7.03
Naftaleno*			1.71	2,753.73	18358.24	18.92	4.14
BaP**	3.92	1.47	2.19	4555.98	30373.18	17.33	4.87
BaA**			1.50	3635.12	24234.10	15.17	3.81

El número de platos teóricos (N) se indica por columna y por metro (N/m)

*Se utilizó una fase móvil de metanol 80% y agua 20%

**Se utilizó una fase móvil de metanol 95% y agua 5%

3.2 Validación del sistema

3.2.1 Linealidad del sistema

La linealidad se evaluó con la respuesta (área del pico cromatográfico) que se obtenía dependiendo de la concentración de las disoluciones estándar, las cuáles originalmente eran 2, 4 y 6 mg/L, y se incluyeron las concentraciones que se utilizarían para los límites de detección y cuantificación: 0.0625, 0.125, 0.25, 1 mg/L para agrandar el intervalo. En la figura 3.1 y 3.2 se muestran los valores obtenidos

de r^2 , los cuales fueron de 0.9994 para el caso del BaA y de 0.9954 para el BaP. Estos valores, según USEPA, indican que dentro de ese rango de concentraciones el comportamiento es lineal, ya que el valor de r^2 es mayor a 0.99.⁵³ Lo anterior corroboró lo realizado previamente en otro trabajo.⁴⁸

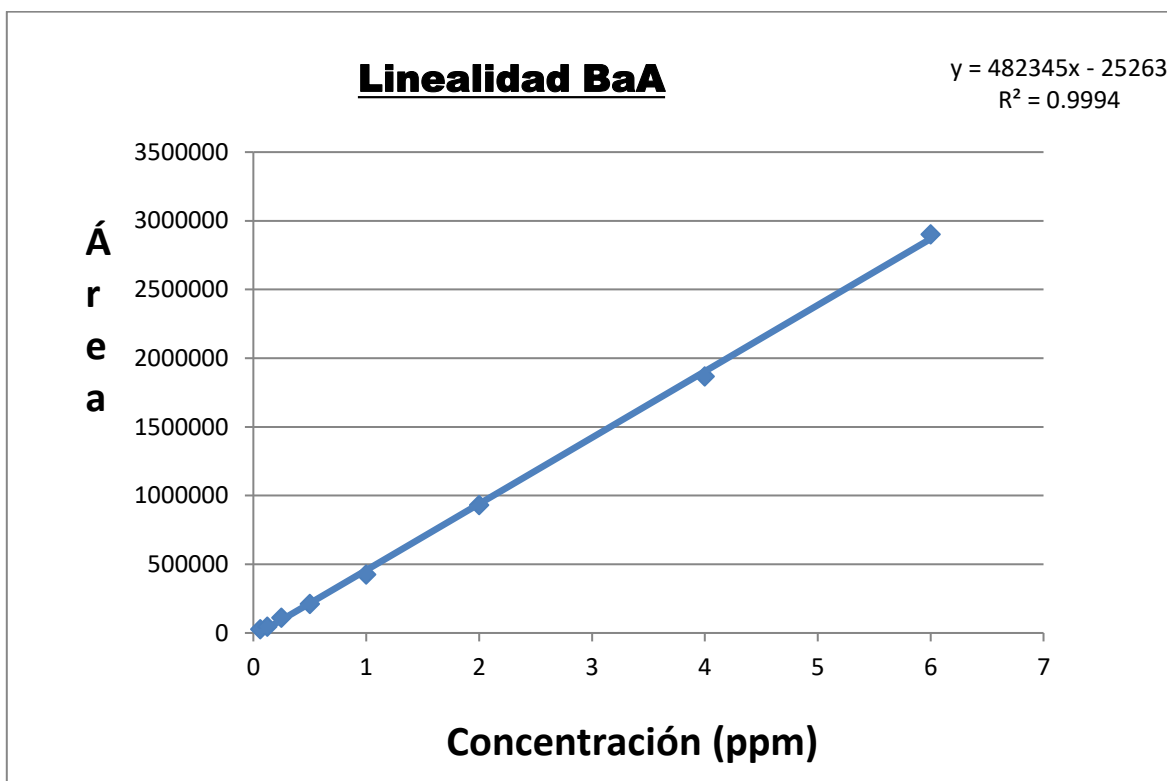


Figura 3.1 Linealidad del sistema para BaA

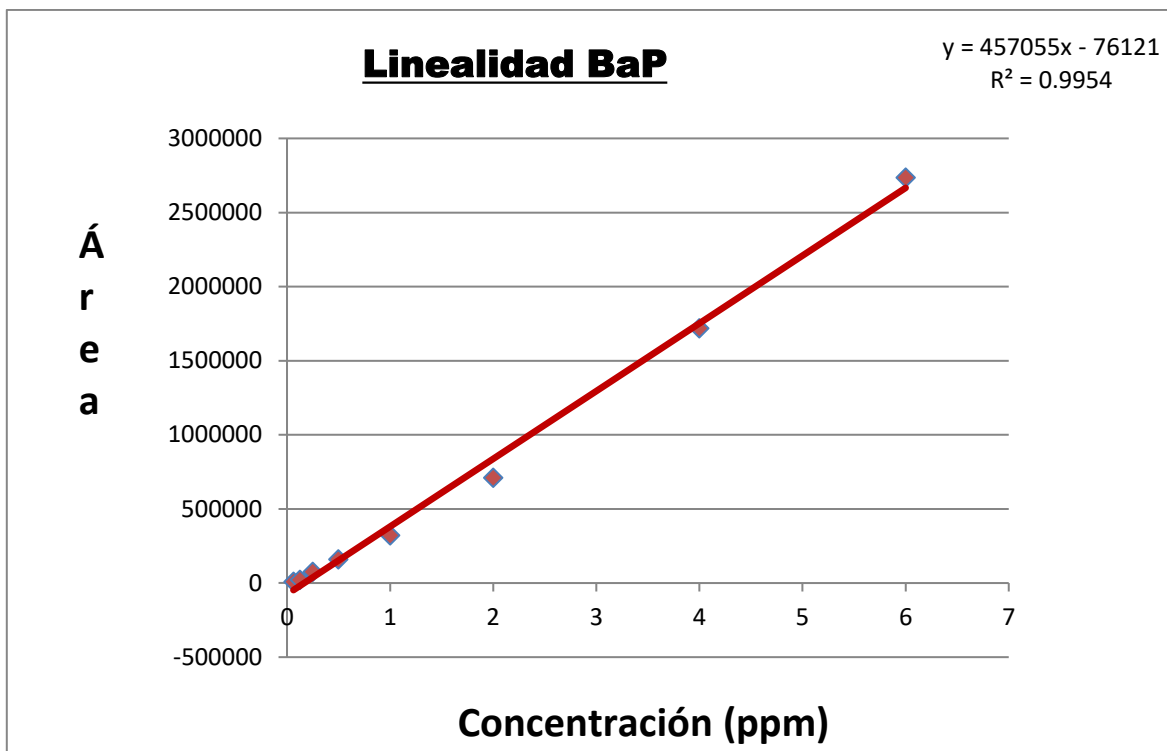


Figura 3.2 Linealidad del sistema para BaP

3.2.2 Precisión/ límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC) del sistema

En la tabla 3.2 se presentan los coeficientes de variación obtenidos en el estudio de la precisión del sistema, los cuales resultaron ser menores al 10%, por lo que se puede concluir que el sistema es repetible.⁵³

El LD y el LC se obtuvieron a partir de una curva que incluía las siguientes concentraciones: 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 y 1 mg/L; los valores obtenidos también se presentan en la tabla 3.2 El LD resultó ser de 0.05 mg/L para BaA y 0.06 mg/L para BaP, este valor indica la concentración más baja que puede ser detectada por el sistema. El LC resultó ser de 0.14 mg/L para BaA y 0.17 mg/L para BaP, este valor representa la concentración más baja que puede ser cuantificada con precisión/exactitud por el sistema.

Tabla 3.2 Valores de repetibilidad (disolución 4 mg/L) y LD /LC obtenidos para la validación del sistema cromatográfico.

Compuesto	L.D. (mg/L)	L.C. (mg/L)	C.V (%)
BaA	0.05	0.14	1.73
BaP	0.06	0.17	3.23

3.3 Optimización de la extracción de los HAPs por DMFS

Para la optimización del método de extracción, primeramente, se trabajó sin biomasa, dopando la sílice C 18 directamente con 4 µg de HAPs con la solución estándar. Se calcularon los recobros y se obtuvieron los coeficientes de variación que fueron de 1.08% para BaA y 1.99% para BaP, resultaron ser menores a 10%, por lo que fue repetible el ensayo. El % de recobro fue ligeramente mayor para el BaP. Estos resultados se muestran en la tabla 3.3.

Después se trabajó con biomasa obtenida a partir del alga *S. acutus*. Los coeficientes de variación obtenidos fueron de 5.23% para BaA y 3.85% de BaP, los cuales también resultaron menores al 10 %, por lo que se logró repetibilidad en estos ensayos; lo anterior también se indica en la tabla 3.3. El % de recobro de ambos hidrocarburos fue menor al obtenido en los ensayos sin biomasa, lo cual se debe a la presencia de la matriz, ya que existe una mayor interacción entre los HAPs y la matriz/ adsorbente, lo que complica la elución de estos.

El último paso de la optimización del método de extracción fue trabajar con algas que fueron inmobilizadas/*desinmovilizadas*, utilizando el alga *S. acutus*. Los coeficientes de variación obtenidos fueron de 7.95% para BaA y 8.36% para BaP,

los cuales resultaron menores al 10%; estos resultados también se incluyen en la tabla 3.3. Los % de recobro resultaron mayores y muy similares entre los hidrocarburos, lo cual podría deberse a que las cuentas de alginato permiten un contacto más directo entre los hidrocarburos y las algas; la inmovilización causa un incremento de la biomasa microalgal. Al obtener los coeficientes requeridos se procedió a realizar la linealidad del método.

Tabla 3.3 Repetibilidad obtenida en los distintos ensayos a una única concentración de 4 mg/L

Compuesto	Condiciones	C.V (%)	% Recobro
BaA	Sin biomasa/Algas libres	1.08	77
BaP		1.99	80
BaA	Algas libres	5.23	59
BaP		3.85	62
BaA	Algas inmovilizadas	7.95	81
BaP		8.36	81

3.4 Validación del método

3.4.1 Linealidad del método DMFS- CLAR-UV

Se evaluó la linealidad del método utilizando el alga *S. acutus*, en un rango de concentración de 0.04 – 1.20 µg/ mg de biomasa. En la figura 3.3 se puede observar la gráfica de la cantidad de BaA recuperada (µg) contra la cantidad adicionada (µg). Se obtuvo un coeficiente de determinación (r^2) de 0.9992, lo cual indica que el

método es lineal dentro del intervalo de concentraciones con el que se trabajó. El recobro global obtenido en el caso del BaA fue de 82.11 %, lo cual se determinó con la ecuación de la recta (pendiente x 100).

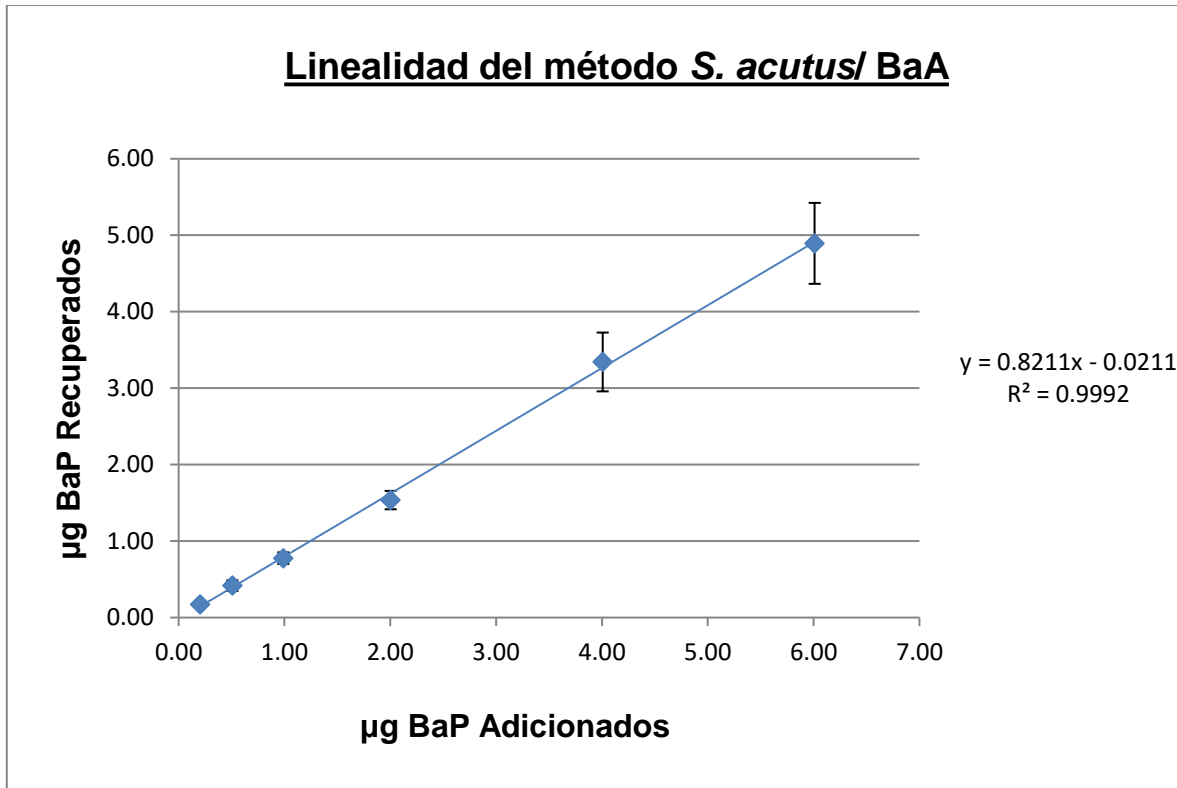


Figura 3.3 Cantidad de BaA recuperada en función de la cantidad adicionada en la biomasa

La gráfica de la cantidad de BaP recuperada (μg) en función de la cantidad adicionada (μg) se presenta en la figura 3.4, donde también se puede observar que se obtuvo un coeficiente de determinación (r^2) de 0.9989, lo cual indica que el método es lineal dentro del intervalo de concentraciones con el que se trabajó. El recobro global obtenido en el caso del BaP fue de 82.26 % (pendiente x 100), lo cual se determinó con la ecuación de la recta.

El recobro que se obtuvo para ambos hidrocarburos con esta metodología fue muy similar y se encuentra dentro del rango estipulado por la Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura para la validación de métodos fisicoquímicos (en este caso, contaminantes en agua), el cual es de 70-110%.

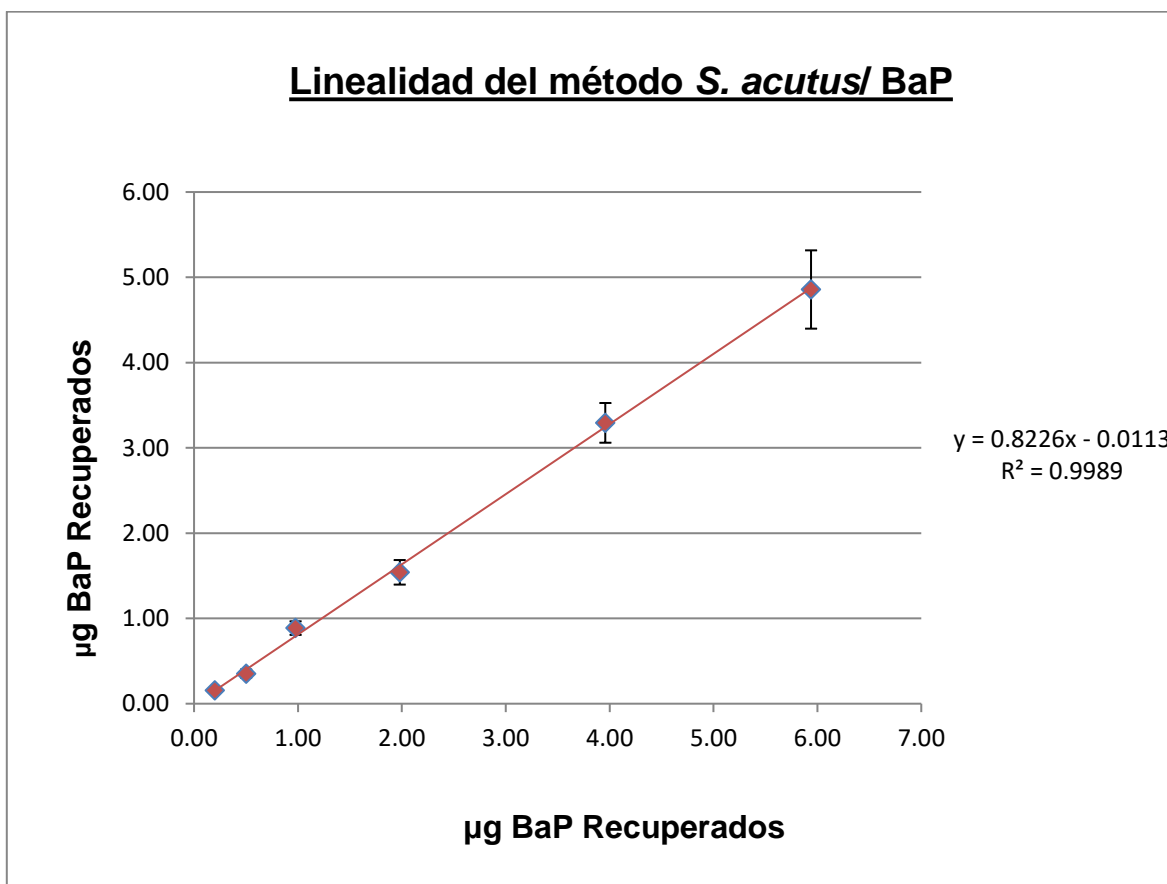


Figura 3.4 Cantidad de BaP recuperada en función de la cantidad adicionada en la biomasa

3.4.2 Precisión del método DMFS- CLAR-UV

Se evaluó la repetibilidad (mismo día) y reproducibilidad (días distintos) con ambos hidrocarburos. Los coeficientes de variación obtenidos se muestran en la tabla 3.4, donde se puede observar que los valores de repetibilidad y reproducibilidad son muy parecidos entre cada hidrocarburo. En el caso de la repetibilidad, los valores se

encuentran por debajo del 10% en las determinaciones. La reproducibilidad obtenida es ligeramente mayor a 10%, lo cual puede explicarse por los factores que pueden variar entre días: preparación de estándares, temperatura, humedad, humectación de la biomasa, etc.

3.4.3 Límite de detección (L.D.) y límite de cuantificación (L.C.)

Los límites del método se determinaron utilizando las siguientes concentraciones: 0.04, 0.1, 0.2 y 0.40 µg/ mg; los valores obtenidos también se muestran en la tabla 3.4. Se construyó una curva con cada concentración por triplicado y con las áreas resultantes se calcularon los límites utilizando la desviación estándar de la regresión. Se utilizaron las siguientes ecuaciones;

$$LD = (3.3 * S_y/x) / b_1$$

$$LC = (10 * S_y/x) / b_1$$

Tabla 3.4 Repetibilidad, reproducibilidad, LD y LC obtenidos para la validación del método

Compuesto	L.D. (µg/mg)	L.C. (µg/mg)	Repetibilidad (% C.V.)	Reproducibilidad (%C.V.)
BaA	0.04	0.11	7.85	10.41
BaP	0.04	0.11	7.34	10.38

3.5 Manejo de microorganismos

3.5.1 Crecimiento de microalgas

Las absorbancias de las microalgas fueron monitoreadas constantemente para asegurar que alcanzaran el valor de 1 y no lo sobrepasaran. El cultivo y manejo de las microalgas se llevó a cabo en un área especial que se mantuvo en condiciones

de esterilidad.⁴⁹ En la figura 3.5 se observa la curva del crecimiento de *S. acutus* y *S. capricornutum* a través de los días, hasta que alcanzan el valor de 1 de absorbancia; *S. acutus* resulta ser el alga que alcanzó dicho valor en menor tiempo, ya que aproximadamente le tomó 14 días. *S. capricornutum* es un alga que crece a un ritmo más lento y alcanzó el 1 de absorbancia a los 20 días, casi una semana después en comparación a *S. acutus*.

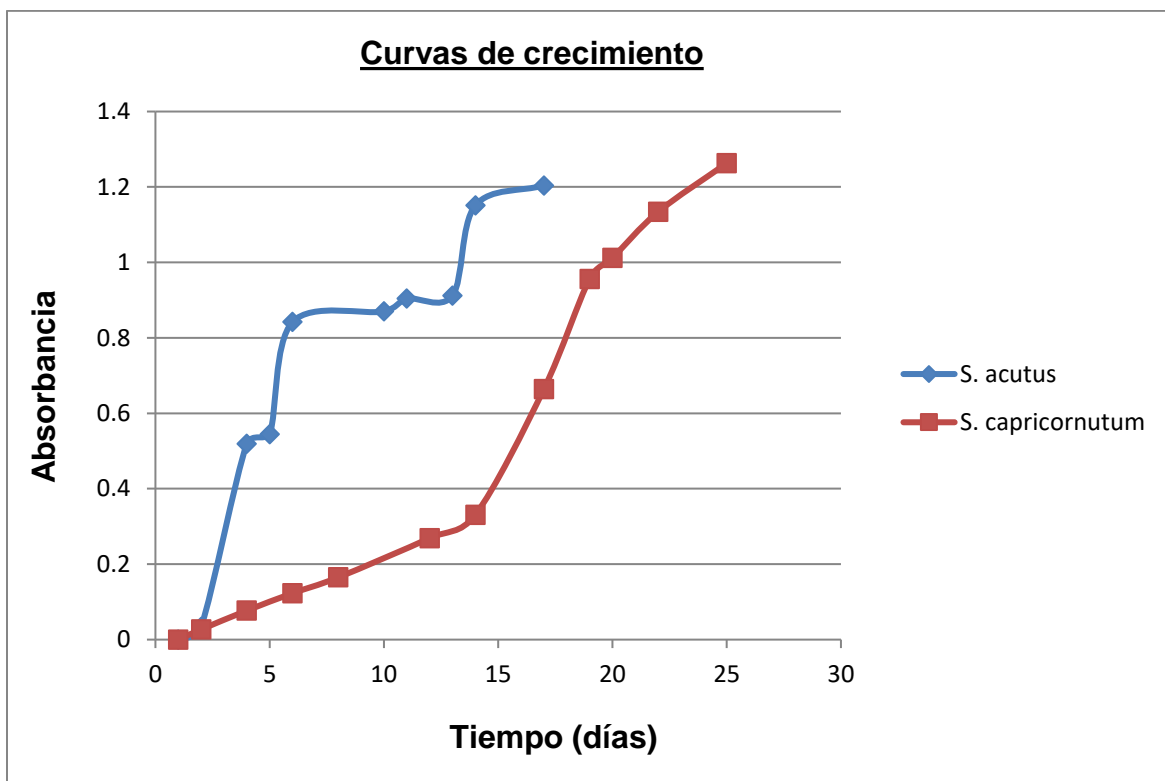


Figura 3.5 Absorbancia de los cultivos de las algas a través del tiempo

En la figura 3.6 también se observa el crecimiento de las algas a través de los días, pero esta vez comparando el número de células que presentan. En el final de la primera semana de crecimiento *S. acutus* sobrepasó las 3×10^6 células/mL y *S. capricornutum* no alcanza las 7.5×10^5 células/mL. Para el final de la segunda semana *S. acutus* tiene aproximadamente 4.5×10^6 células/mL y *S. capricornutum*

tiene 1.5×10^6 células/mL. A partir de este punto empieza el mayor crecimiento de células de *S. capricornutum*, hasta alcanzar 5.5×10^6 células/mL en el último día de monitoreo (día 25).

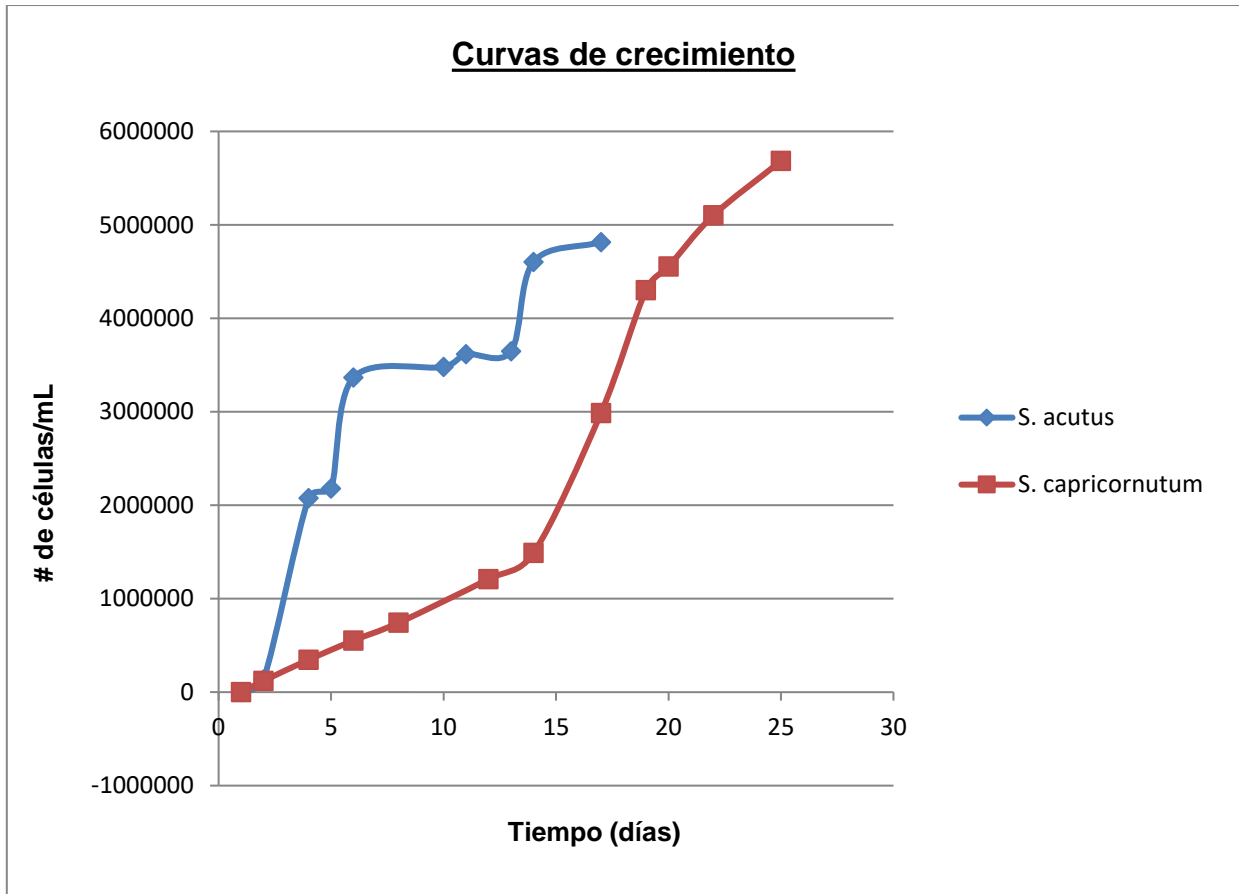


Figura 3.6 Número de células/mL de cada alga a través del tiempo

3.5.2 Viabilidad celular: Resiembra

En trabajos anteriores se llevaron a cabo pruebas de viabilidad celular con el fin de comprobar que las células crecían aún después de la inmovilización. Bernal Toris, 2015 observó que el peso seco de la biomasa tras inmovilizar a *S. capricornutum* (y dejar las perlas 24 horas sumergidas en medio Bristol) era de 5.56 mg, a 685 nm y con un cultivo que alcanzaba el valor de 1 de absorbancia. Lo anterior comprueba

que las microalgas siguen reproduciéndose aun estando inmovilizadas en las cuentas de alginato; igualmente, se demuestra que siguen vivas después de la inmovilización en este tiempo.

En este caso, para corroborar la viabilidad de *S. acutus* aún después de la inmovilización se utilizaron 15 mL de medio en absorbancia 1 y 685 nm. El alga se inmovilizó en cuentas de alginato y se dejaron en exposición a luz para permitir su crecimiento, durante 24 horas. Se *desinmovilizó* hasta obtener el “botón” de biomasa que posteriormente se utilizó para hacer una resiembra en un tubo de vidrio que contenía agar y peptona (medio sólido). La resiembra se llevó a cabo tomando una asada del “botón” de biomasa y sembrando por estría en el medio sólido, todo lo anterior realizado en condiciones asépticas. El tubo se observó dos semanas, con el fin de observar si había crecimiento del alga después de la resiembra y se observaron al microscopio las células. Se observó que después de este tiempo el crecimiento era evidente en el tubo y las células eran fácilmente identificables al microscopio por su forma ovoide y su tendencia a apilarse. Los tubos de resiembra y la imagen al microscopio se observan en la imagen 3.7.



Figura 3.7 . A.Tubos en los que se realizó la resiembra de *S. acutus*. B. Células de *S. acutus* observadas al microscopio con aumento de 40x.

3.5.3 Conteo de células

El conteo de células se realizó con la cámara de Neubauer utilizando dos cultivos de cada alga con absorbancia de 1; los conteos se realizaron antes y después de inmovilizar para cada alga. Las perlas se dejaron en los matraces con agua potable y en iluminación con lámparas fluorescentes con periodos de luz/oscuridad de 16/8 horas, respectivamente. Después de 24 y 72 horas se *desinmovilizaron* las cuentas con citrato y se obtuvo un “botón” tras centrifugar a 3900 rpm. Se resuspendió el “botón” con agua y se tomó una muestra para realizar el mismo procedimiento de conteo en la cámara.

Para calcular el número de células se siguió la siguiente ecuación:

$$\frac{\# \text{ células}}{\# \text{ cuadros}} \times \frac{\# \text{ cuadros de la cámara}}{\text{Vol. de la cámara}} \times \frac{1000 \text{ m}^3}{1 \text{ mL}} = \# \text{ células / mL}$$

Una de las principales razones para llevar a cabo la inmovilización es que debido al medio protegido en que se encuentran las células, se produce un aumento en la biomasa microalgal, ya que hay un mayor número de microorganismos adheridos a la superficie en comparación a la cantidad de microorganismos que podría haber en suspensión (Cohen, 2001); se ha observado también una mayor actividad metabólica dentro de los sistemas inmovilizados debido, quizá, a la mayor concentración existente de biomasa.³⁹

La figura 3.8 presenta el número de células/ mL para *S. acutus*. Tras *desinmovilizar* las células después de dejarlas en las cuentas durante 24 horas, no se observa que existió crecimiento significativo en ninguno de los dos tubos, ya que el porcentaje

de crecimiento después de inmovilizar con respecto a las algas libres es de 10 % para el tubo 1 y 27 % para el tubo 2. A las 72 horas cambia el panorama y el crecimiento es evidente para ambos tubos, ya que el porcentaje de crecimiento después de inmovilizar con respecto a las algas libres, contadas antes de la inmovilización, es de 47% para el tubo 1 y 165% para el tubo 2. Las diferencias de crecimiento presentes en cada tubo pueden deberse a la tendencia de *S. acutus* por crecer más rápidamente hasta aglomerarse y formar tétradas; esto también conlleva a una mayor variabilidad en el conteo.

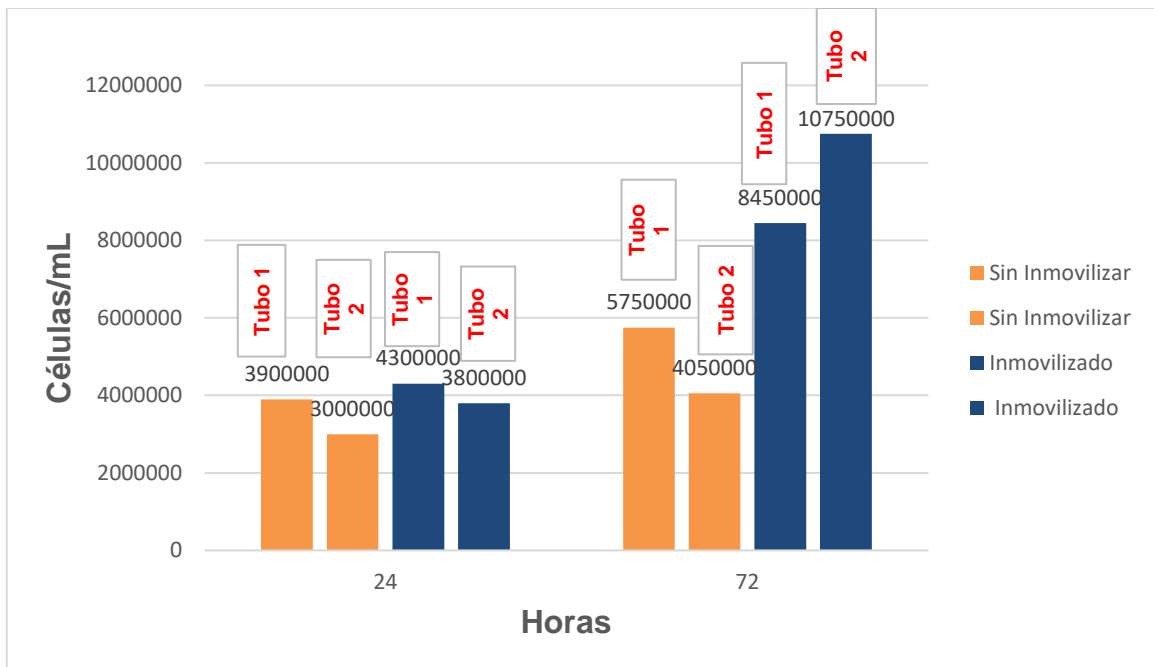


Figura 3.8 Número de células presentes de *S. acutus* con y sin inmovilización

La figura 3.9 presenta el número de células/ mL presentes para *S. capricornutum* a las 24 y 72 horas después de inmovilizar. A las 24 horas de la inmovilización no se presenta un crecimiento tan significativo en el número de células, como en el caso de *S. acutus*; el porcentaje de crecimiento es de apenas 2% para el tubo 1 y de 23

% para el tubo 2. A las 72 horas después de la inmovilización el crecimiento es evidente, el porcentaje de crecimiento es de 17% para el tubo 1 y 54% para el tubo 2. Aunque el crecimiento ya es considerable en este tiempo para *S. capricornutum*, no se alcanza el mismo número de células y porcentaje de crecimiento de *S. acutus*; lo anterior puede deberse a que *S. capricornutum* presenta un crecimiento más lento (quedó demostrado en las curvas de crecimiento) lo cual se refleja en el máximo número de células que se observa para cada alga (en *S. capricornutum* es aproximadamente la mitad comparada con *S. acutus*). Sin embargo, para las dos especies se observa un aumento en células de 24 a 72 hrs, indicado que la reproducción continua para ambas, por lo menos hasta este tiempo, en el interior de las cuentas.

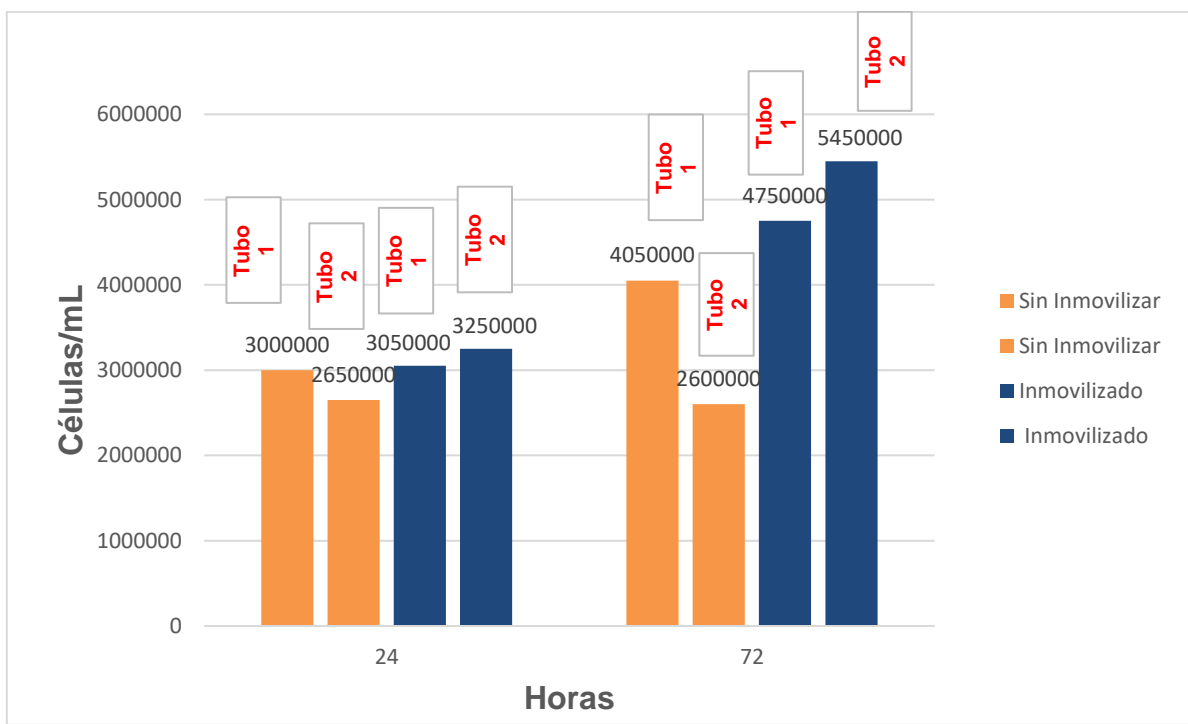


Figura 3.9 Número de células presentes de *S. capricornutum* con y sin inmovilización

La variabilidad presente en el conteo del número de células se explica con el hecho de que sólo se tomaron dos cultivos para cada alga y al tratarse de organismos vivos, cada uno presenta una velocidad crecimiento particular. La asada inicial tomada del cultivo sólido pudo ser variable en las células tomadas inicialmente. Se comprobó que aún después de inmovilizar las algas siguen su crecimiento y que éste es más evidente después de las 24 horas de inmovilización.

3.6 Bioensayos de exposición

3.6.1 Bioensayo 1. Exposición *S. capricornutum* inmovilizada con BaP

El sistema CLAR-UV permitió realizar la cuantificación de los BaP en los extractos obtenidos de la biomasa por DMFS. Se analizó la sorción del hidrocarburo presentada por el alga a través del tiempo, que iba desde las 1.5 h hasta las 48 h; los blancos se utilizaron como controles de interferencias de los ensayos. En la figura 4.0 se observa la curva que permitió saber cómo era la sorción del BaP por las microalgas y en qué tiempo se alcanzaba la máxima concentración del hidrocarburo en la microalga. Se observa un incremento en la cantidad recuperada de BaP (ng) hasta las 15 h, después de este tiempo se nota una disminución en la cantidad de hidrocarburo presente debido a la sorción; dicha disminución se presenta de manera lenta y gradual. La cantidad de hidrocarburo presente en la biomasa con respecto a la cantidad inicial fue de 284 ± 51 ng (15 h), lo que corresponde a un 7.1% con respecto a la cantidad inicial. Este bioensayo realizado sirvió para saber el comportamiento del alga y para estimar los tiempos que se usarían con la misma alga en contacto con una mezcla de hidrocarburos (BaA/BaP) de los bioensayos siguientes.

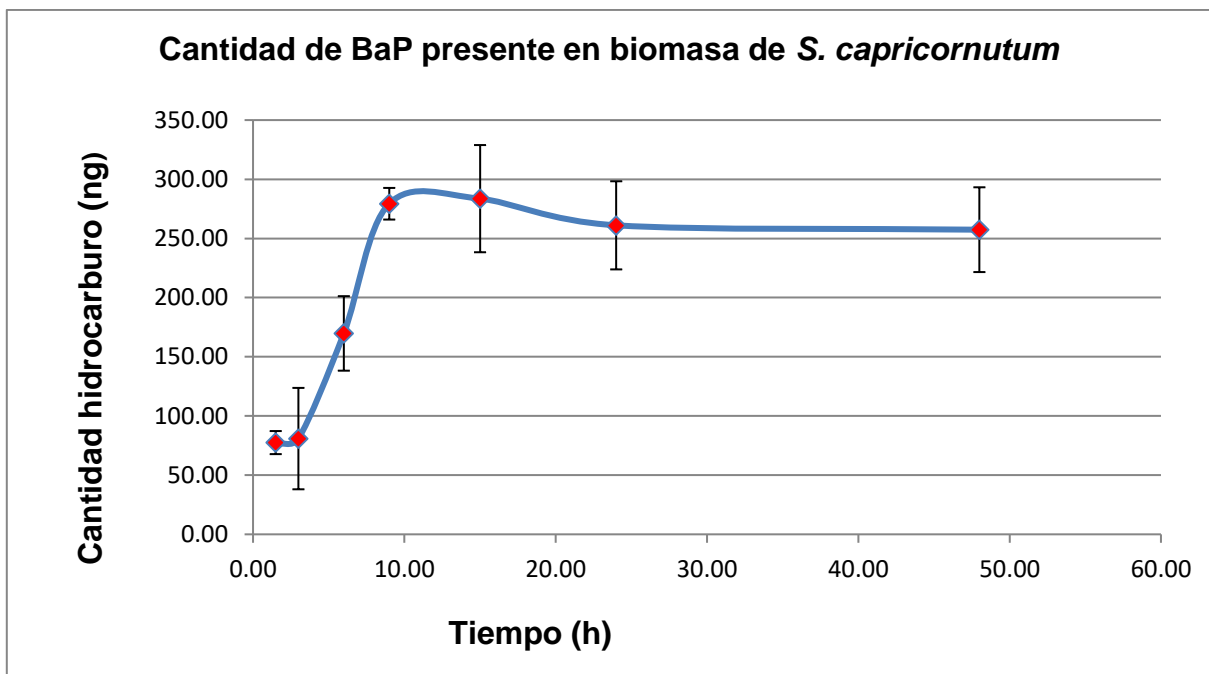


Figura 4.0 Cantidad de BaP (ng) presente en biomasa de *S. capricornutum*

3.6.2 Bioensayo 2. Exposición de *S. capricornutum* inmovilizada con BaP/BaA en agua potable

Con el sistema CLAR-UV se realizó la cuantificación de los extractos de los dos HAPs en mezcla obtenidos de la biomasa por DMFS. Se utilizaron algunos tiempos propuestos en el anterior ensayo, y estos iban de las 1.5 h hasta las 24 h, cada uno con su respectivo blanco (algas en perlas sin dopar con los HAPs).

En la figura 4.1 podemos observar el comportamiento del alga ante la sorción del BaA, es evidente que el hidrocarburo presente en la biomasa aumenta desde las 1.5 h hasta las 15 h, donde se encuentra el máximo y después disminuye en el último tiempo de 24 h. La máxima cantidad de hidrocarburo hallada en la biomasa fue de 83 ± 9 ng (15 h) y con respecto a la cantidad inicial corresponde al 2%.

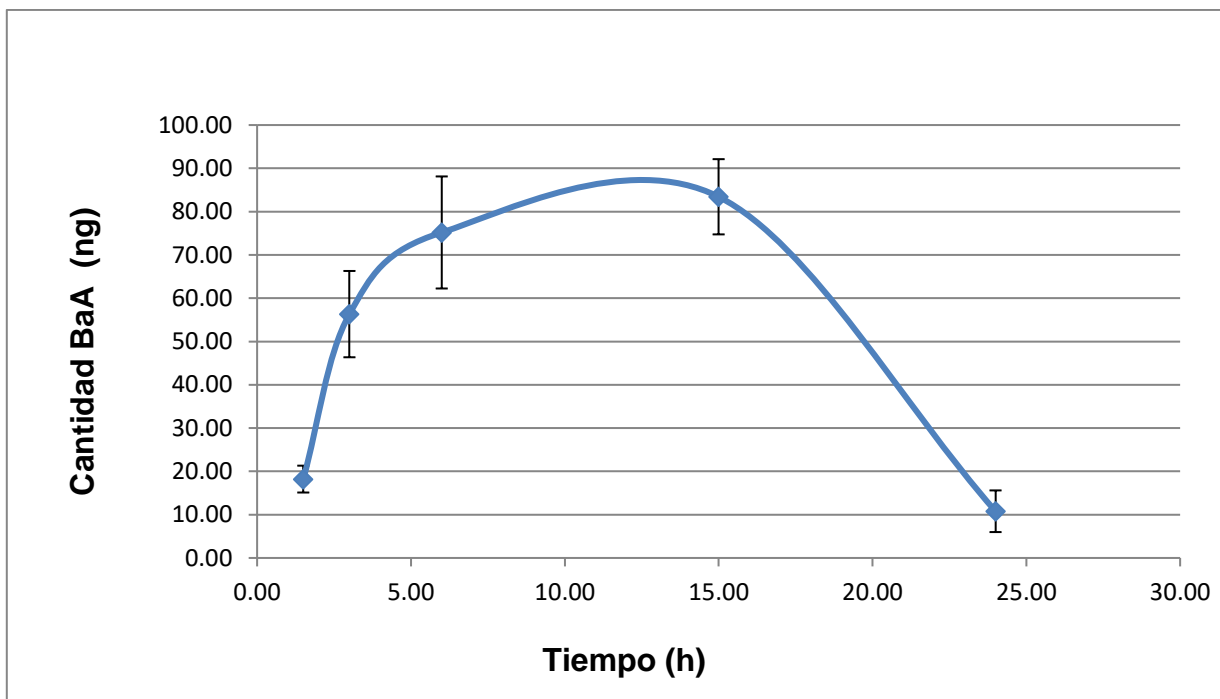


Figura 4.1 BaA presente en biomasa de *S. capricornutum* a través del tiempo

Por otra parte, en la figura 4.2 se puede ver el comportamiento del alga con BaP. La cantidad absorbida por el alga incrementa desde el tiempo inicial y alcanza el máximo igualmente a las 15 h de exposición, después de donde se da una disminución hasta el tiempo final de 24 h. La máxima cantidad de hidrocarburo presente en la biomasa fue de 96 ± 24 ng (15 h) y con respecto a la cantidad inicial corresponde al 2.4%.

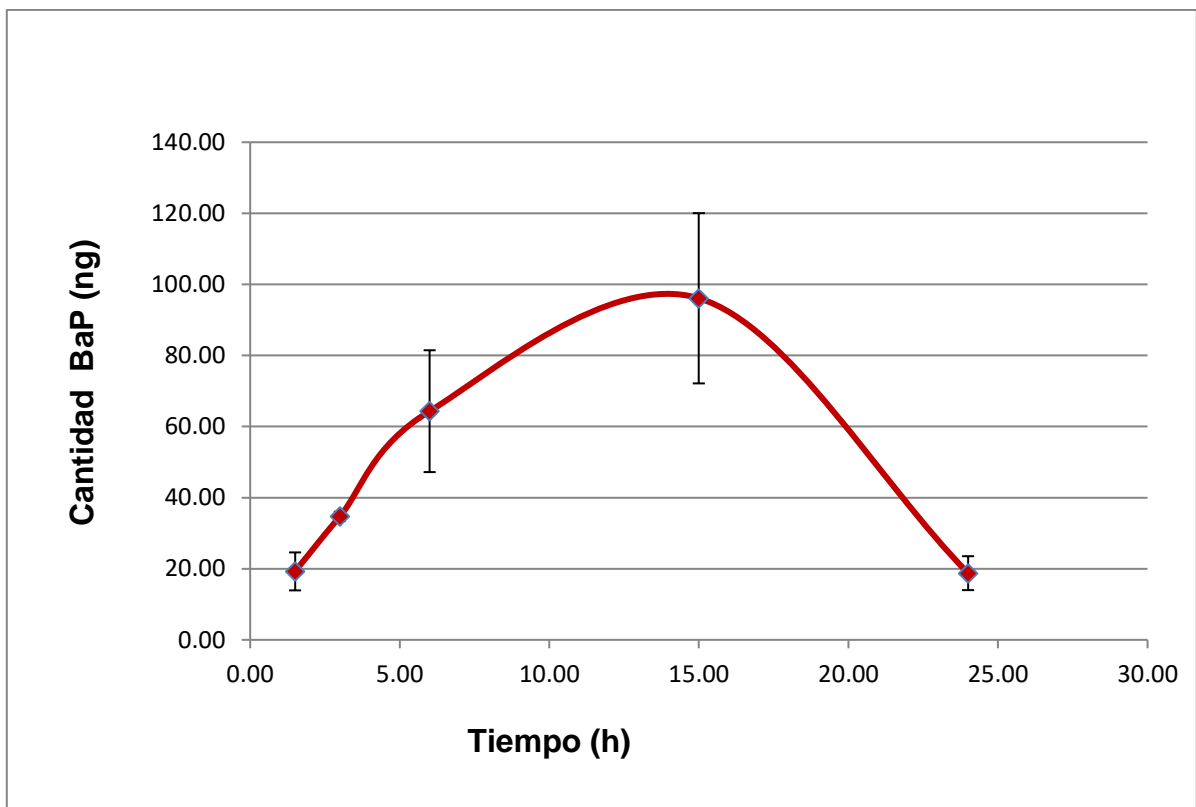


Figura 4.2 BaP presente en biomasa de *S. capricornutum* a través del tiempo

El tiempo de sorción de *S. capricornutum* con la mezcla de hidrocarburos resulta similar al presentado cuando sólo se utilizó BaP, porque en ambos casos se alcanzó la máxima cantidad de hidrocarburo en la biomasa entre las 10 y las 15 h, después de ese tiempo el hidrocarburo va desapareciendo de la biomasa, por lo que se podría decir que el alga en cuanto retiene a los hidrocarburos comienza la degradación. Es de notarse que en caso de la mezcla se llegó a una cantidad máxima retenida en la microalga menor que en el bioensayo 1, esto podría deberse a que la sorción simultánea de ambos hidrocarburos, reduce la capacidad de retención individual de cada HAP por la microalga. Bernal Toris, 2015 menciona que *S. capricornutum* inmovilizada puede remover la misma cantidad de BaP que cuando se trata de algas libres, solo que esta remoción ocurre de manera más lenta.

Beltrán Calva, 2014 y Díaz Rojas, 2013 también encontraron la presencia de BaP en biomasa de microalgas libres de *S. capricornutum* y que esta disminuía al paso del tiempo. Takacova et al., 2014 observó por microscopía de fluorescencia la presencia de BaP dentro del alga *Chlorella kessleri*, sugiriendo que esta alga internaliza el hidrocarburo.⁵⁴

La diferencia encontrada es que cuando sólo se utilizó BaP el porcentaje máximo de hidrocarburo presente en la biomasa fue de 7.1%, mientras que en el caso de la mezcla apenas alcanzaba el 2-3%, por lo que se puede decir que, en efecto, el alga sorbe más hidrocarburo en la biomasa cuando este se encuentra solo que cuando hay mezcla de hidrocarburos.

3.6.3 Bioensayo 3. Exposición de *S. acutus* inmovilizada con BaP/BaA en agua potable

El análisis de los extractos DMFS al usar *S. acutus* se llevó a cabo de igual manera con el sistema CLAR-UV. Los tiempos que se utilizaron fueron similares a los bioensayos 2 con *S. capricornutum* y se incluyó uno más, de 48 h sabiendo que este organismo degrada más lento (García de Llasera et al., 2016).⁵⁵ Los blancos utilizados también incluían alga sin hidrocarburo, como medida de control de interferencias en los ensayos.

En la figura 4.3 se observa el comportamiento del alga ante BaA a través del tiempo. La cantidad de hidrocarburo aumenta conforme pasa el tiempo, desde las 3 h hasta las 24 h (máximo), después comienza a disminuir hasta el último tiempo de 48 h. La máxima cantidad de BaA presente en la biomasa es de 760 ± 84 ng (24 h) y con respecto a la cantidad inicial se tiene un porcentaje de 19 %.

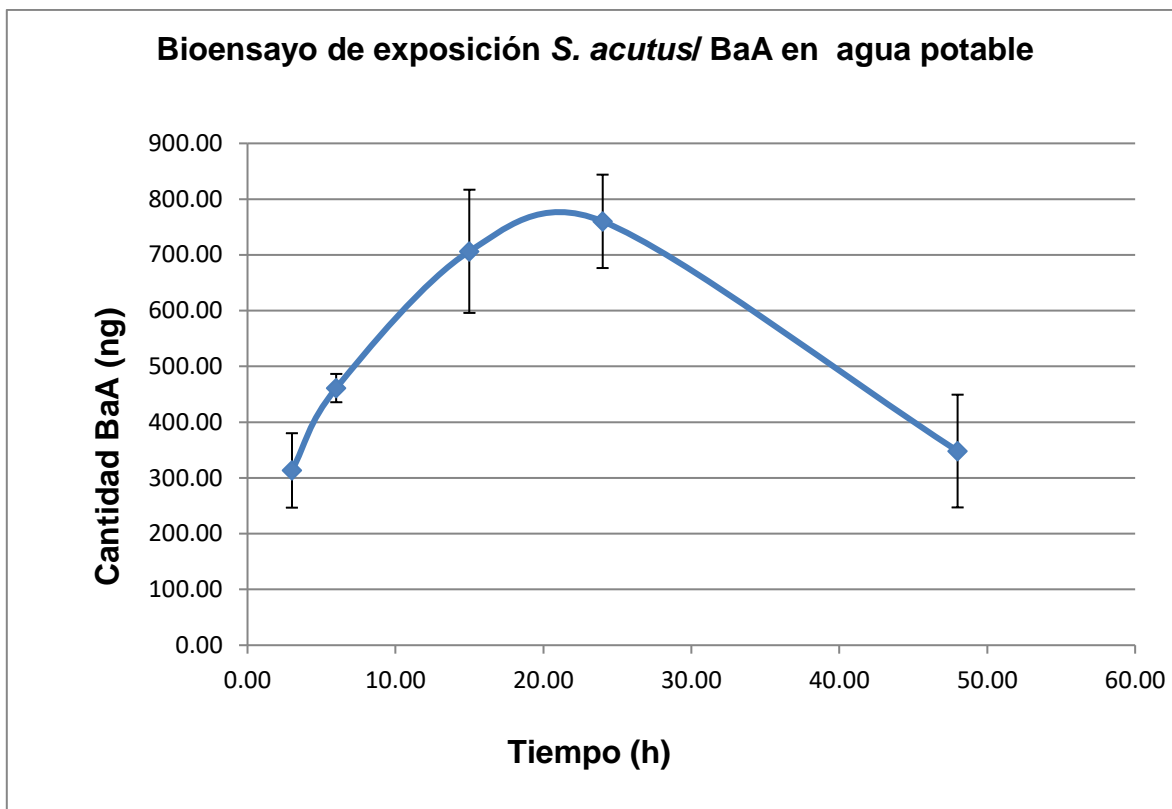


Figura 4.3 BaA presente en biomasa de *S. acutus* a través del tiempo

El comportamiento del alga frente al BaP se observa en la figura 4.4, donde se aprecia que el hidrocarburo presente en la biomasa aumenta hasta alcanzar su máximo a las 24 h y después se observa una notoria disminución hasta el último tiempo. La cantidad máxima del hidrocarburo fue de 502 ± 64 ng lo que corresponde a un porcentaje máximo presente en la biomasa de 12.6%.

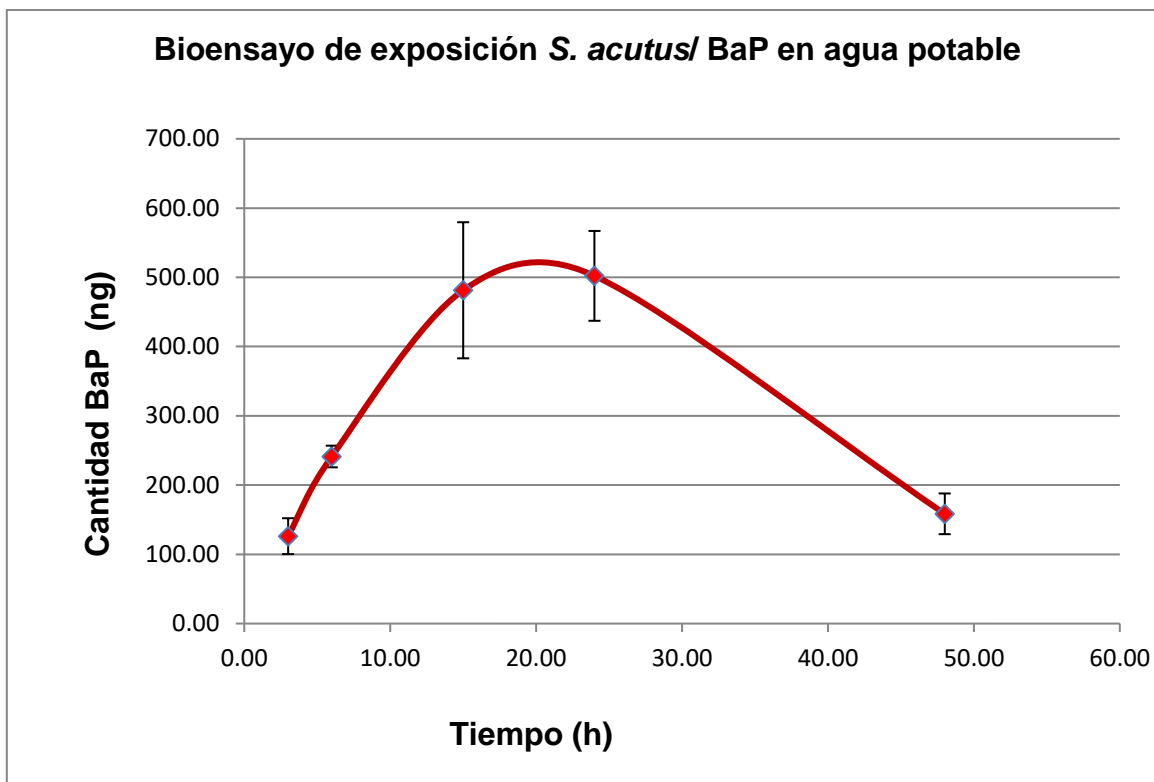


Figura 4.4 BaP presente en biomasa de *S. acutus* a través del tiempo

En el caso de *S. acutus* el tiempo en el que se presentó la máxima cantidad de hidrocarburos fue de 24 h, por lo que se puede decir que, comparándola con *S. capricornutum* utilizando los mismos hidrocarburos, tarda más en acumular el hidrocarburo. También se hace notar que *S. acutus* retuvo una mayor cantidad de HAPs y se confirma que es un alga que acumula más lentamente el BaP en comparación a *S. capricornutum*. Sin embargo, García de Llasera et al., 2016 demostró que la remoción por las dos especies es parecida e igualmente rápida; de acuerdo a ese estudio la diferencia de cantidades acumuladas por las células de las dos especies parece explicarse mejor si se considera que las dos microalgas retienen con igual eficiencia a los hidrocarburos, pero *S. capricornutum* se

desembaraza más rápidamente de ellos que *S. acutus* por efecto de la degradación.⁵⁵

3.6.4 Bioensayo 4. Exposición con doble de células y mezcla de especies

Estos bioensayos se hicieron con el objeto de evaluar el efecto de utilizar el doble de células por cuenta y la mezcla de especies. De acuerdo a los resultados obtenidos en los bioensayos anteriores, se tomaron en cuenta los tiempos donde cada especie de microalga sorbía el mayor porcentaje de hidrocarburos en la biomasa. Para *S. acutus* se determinó utilizar el tiempo de 24 h y para *S. capricornutum* el tiempo de 15 h; ya que estos tiempos corresponden a sus máximos de acumulación de HAPs. En cada uno de estos tiempos se probó el efecto de utilizar el doble de células por cuenta con cada especie (bioensayo 4a y 4b) y la mezcla de especies 50:50 (bioensayo 4c) con número normal de células por cuenta, por triplicado e incluyendo blancos (algas sin hidrocarburos).

En la figura 4.5 se observan los ensayos realizados para BaA. Al utilizar doble de células con *S. acutus* se obtuvo un valor de 665 ± 49 ng por lo que el porcentaje máximo de hidrocarburo encontrado en la biomasa fue de 16.6%, cifra muy parecida a la hallada al utilizar el número normal de células con la misma alga (19%, bioensayo 3), aunque un poco menor. El porcentaje máximo de hidrocarburo en biomasa para *S. capricornutum* con doble de células fue 34 ± 6 ng lo que corresponde a un porcentaje de 0.9% más bajo al hallado en el número de células normales para la misma alga (2%, bioensayo 2). En el caso de utilizar la mezcla de algas, los resultados de dos ensayos independientes resultaron similares entre sí; también se nota que el porcentaje de hidrocarburo presente en la biomasa con la

mezcla de especies es menor con respecto a *S. acutus solo* con el doble número de células y mayor con respecto de *S. capricornutum solo* con el doble número de células.

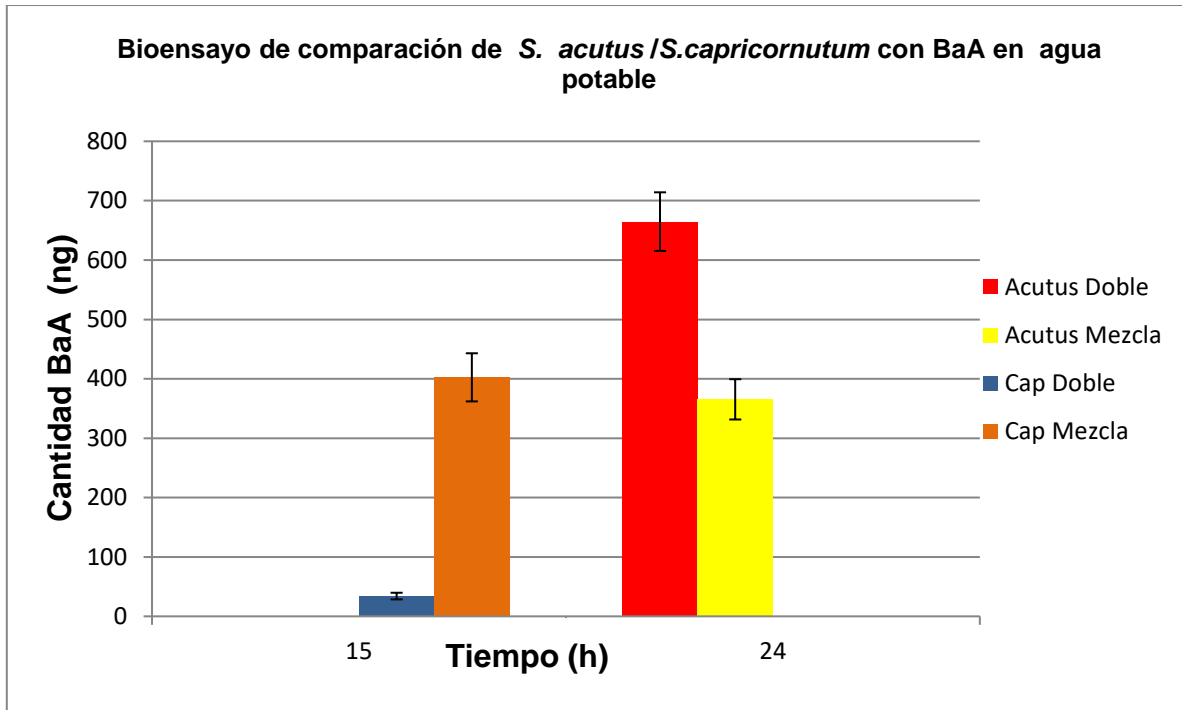


Figura 4.5 Sorción de BaA en ensayos de doble de células y mezcla de algas

Para el caso del BaP, en la figura 4.6 se observa que las cantidades obtenidas resultan mayores en comparación a las del BaA. Al utilizar el doble de células con *S. acutus* se obtuvo una cantidad de 192 ± 12 ng por lo que el porcentaje de hidrocarburo máximo presente en la biomasa fue de 4.8%, el cual resulta menor en comparación al obtenido con cantidad normal de células (12.6%, bioensayo 3). Con el alga *S. capricornutum* se obtuvo una cantidad máxima de BaP de $10 \text{ ng} \pm 2 \text{ ng}$ por lo que el porcentaje máximo fue de 0.3 % y también fue menor al encontrado con el número de células estándar (2.4%, bioensayo 2). Con la mezcla de algas se obtuvieron cantidades de BaP muy similares entre los ensayos independientes; el

porcentaje de hidrocarburo presente en la biomasa con la mezcla de algas es menor con respecto al caso de *S. acutus* con el doble número de células y mayor con respecto de *S. capricornutum* con el doble número de de células.

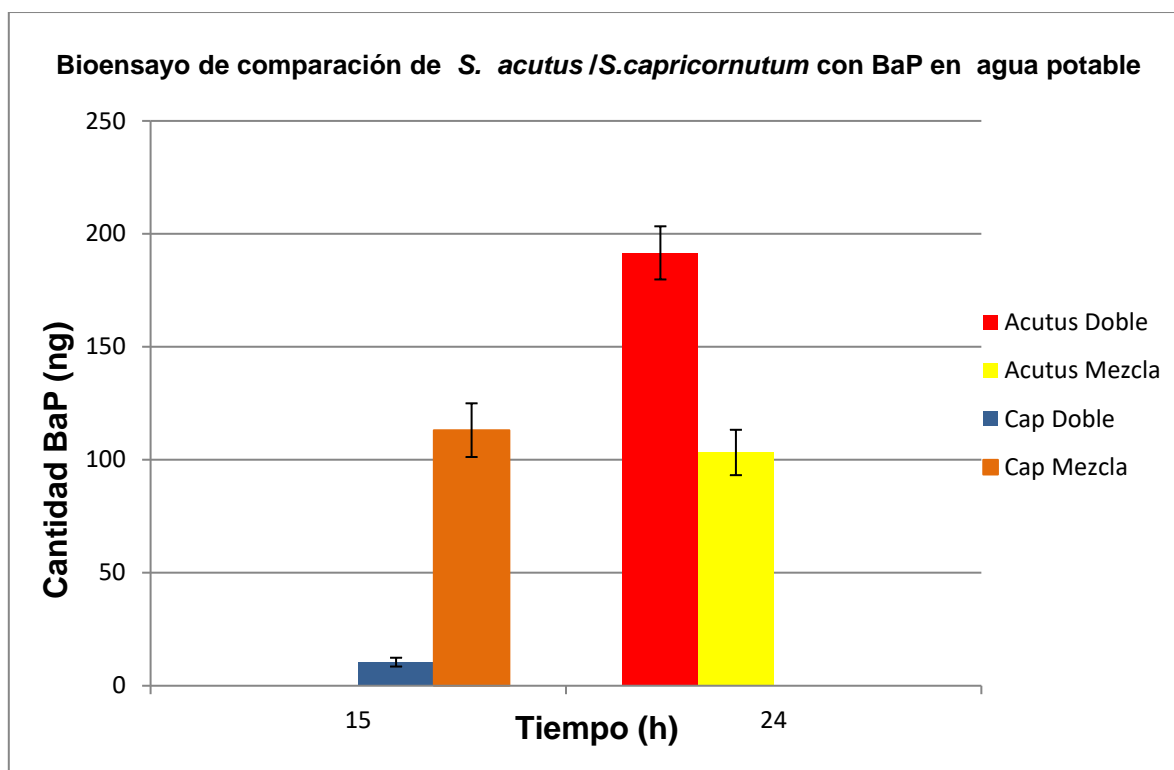


Figura 4.6 Sorción de BaP en ensayos de doble de células y mezcla de algas

DISCUSIÓN

3.7 Comparación de bioensayos

3.7.1 Comparación de la sorción de BaA/ BaP por *S. acutus* / *S. capricornutum*

(bioensayos 2 y 3)

En la figura 4.7 se muestra la cantidad de BaA presentes en la biomasa de cada microalga. Como se puede observar, en los ensayos con *S. acutus* se obtiene mayor porcentaje de BaA en la biomasa que en los ensayos con *S. capricornutum* y la

cantidad máxima presente es de 760 ± 84 ng, mientras que para *S. capricornutum* es de aproximadamente 83 ± 9 ng; este último valor está ligeramente arriba del 10% obtenido con la otra microalga. Como prueba estadística para comprobar si había diferencias en ambas especies para acumular HAPs en la biomasa se realizó un análisis de varianza de un factor en cada tiempo que tenían en común las algas al realizar los bioensayos (Microsoft Excel, 2010). Las F obtenidas fueron mayores en comparación a la F de tablas (7.71), con un 95% de nivel de confianza, por lo que se rechaza la hipótesis nula, que consistía en creer que no había diferencia significativa en el uso de una u otra alga para acumular BaA. Así pues, sí existe diferencia significativa entre cada alga al acumular el hidrocarburo en la biomasa. *S. acutus* tarda más en acumular y *S. capricornutum* lo hace más rápido, pero se detecta menor cantidad, lo cual puede deberse a que ésta alga presenta una degradación más rápida como ya se había comentado de acuerdo a lo observado por García de Llasera et al., 2016.⁵⁵ Los autores mencionan que *S. capricornutum* es capaz de lograr una completa remoción de BaP a las 15 h de exposición, lo cual ocurre principalmente debido a la biodegradación. Las células de *S. acutus* acumulan BaP de manera lenta y gradual; el alga *S. capricornutum* lleva a cabo el proceso de sorción (adsorción/absorción) de BaP casi de inmediato.

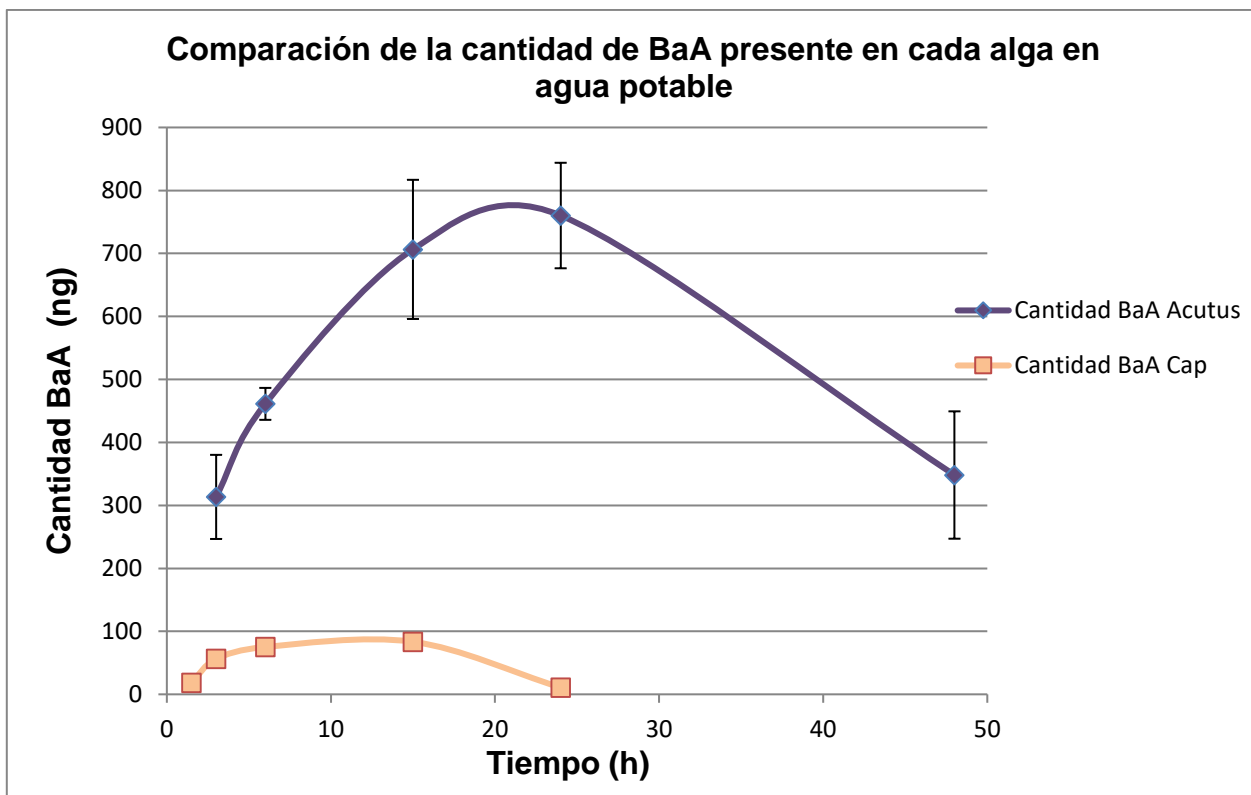


Figura 4.7 Sorción de BaA en biomasa por parte de ambas algas

En la figura 4.8 se observa la sorción de BaP en la biomasa por parte de cada alga. Con *S. acutus*, la mayor cantidad de BaP encontrada en la biomasa fue de 502 ± 64 ng y para *S. capricornutum* la cantidad máxima obtenida fue de aproximadamente 96 ± 24 ng. Las cantidades de BaP encontradas en la biomasa fueron mayores en cada microalga con respecto a BaA, lo cual quiere decir que en ambas especies la capacidad para la acumulación de BaP es mayor que para el BaA. Comparando estos resultados con el bioensayo de *S. capricornutum*/ BaP podemos decir que se acumula una mayor cantidad de hidrocarburo cuando este se encuentra solo con respecto a cuándo está en mezcla con otro HAP, lo anterior puede deberse a la competencia del alga por acumular uno u otro hidrocarburo o a las diferencias de hidrofobicidad.

También se utilizó una prueba estadística para comprobar si había diferencias en ambas especies para acumular HAPs en la biomasa, para ello se realizó un análisis de varianza de un factor en cada tiempo que tenían en común las algas al realizar los bioensayos (Microsoft Excel, 2010). Las F obtenidas fueron mayores en comparación a la F de tablas (7.71), con un 95% de nivel de confianza, por lo que se rechaza la hipótesis nula, que consistía en creer que no había diferencia significativa en el uso de una u otra alga para acumular BaP. Así pues, sí existe diferencia significativa entre cada alga al acumular BaP en la biomasa; mientras que *S. acutus* acumula mayor cantidad, *S. capricornutum* lo hace en menor cantidad en un tiempo más corto.

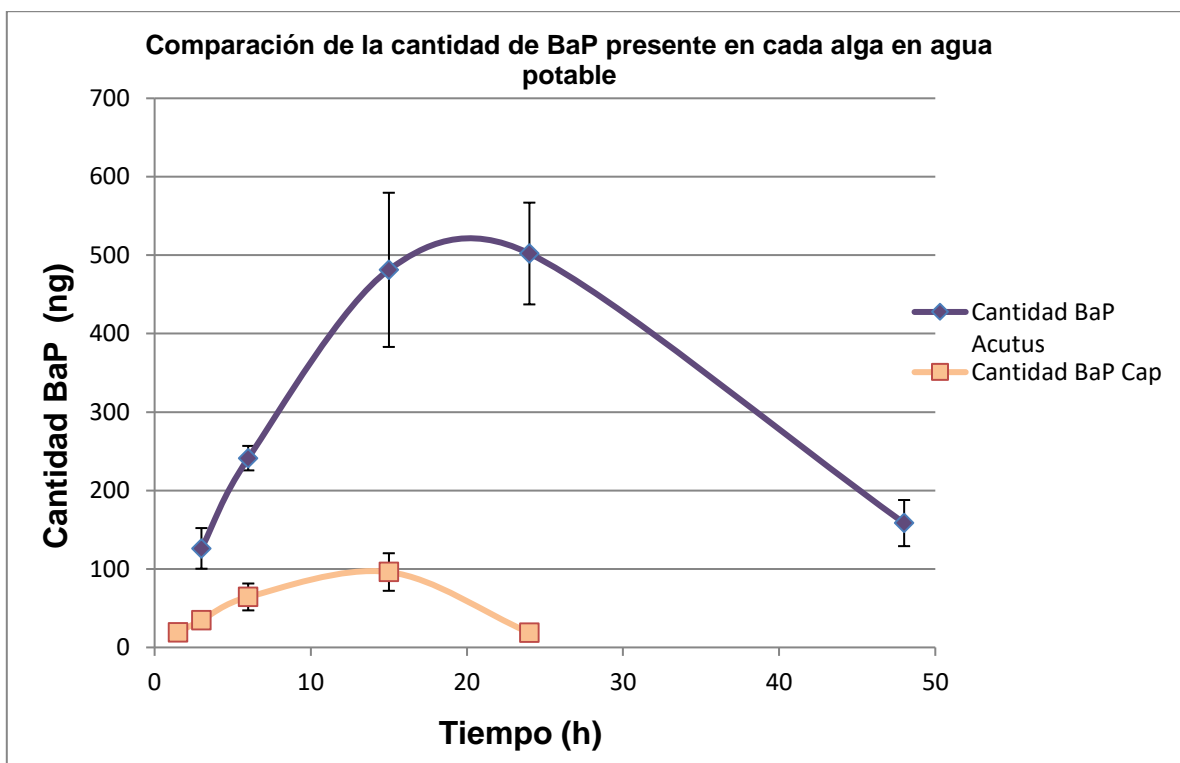


Figura 4.8 Sorción de BaP en biomasa por parte de ambas algas

3.7.2 Comparación del efecto del doble de células y mezcla de especies para BaA/BaP por *S. acutus* / *S. capricornutum* (bioensayo 4)

Con base a los resultados obtenidos, se llevó a cabo la comparación de la cantidad de HAPs presente en la biomasa al utilizar el doble de células y la mezcla de algas, con respecto a la cantidad reportada en los bioensayos anteriores en los que se utilizó el número de células estándar. En la figura 4.9 se puede observar que la cantidad máxima de BaA sorbida por *S. acutus* al utilizar el doble de células es 665 ± 49 ng, la cual resulta menor a los 760 ± 84 ng que se obtuvieron al utilizar el número normal de células. En el caso de *S. capricornutum*, la cantidad máxima encontrada al utilizar el doble de células también resulta notoriamente menor (34 ± 6 ng) en comparación al ensayo con el número normal de células (83 ± 9 ng). Para ambas especies, es muy similar las máximas cantidades de BaA encontradas en la biomasa al utilizar la mezcla de ellas (365 ± 34 ng y 402 ± 41 ng).

Para realizar una comparación mejor se realizó un análisis estadístico de un factor (ANOVA) para los tiempos de 15 y 24 h (Microsoft Excel 2010), en los que se comparó los ensayos realizados con el doble de células/ mezcla de algas (cada uno, sus triplicados) contra el ensayo realizado con el número estándar de células (también triplicado). Para ambos casos y en ambas algas la F obtenida fue mayor a F de tablas (7.71), por lo que se concluye que hay diferencia significativa en la cantidad de BaA encontrada en la biomasa para cada bioensayo.

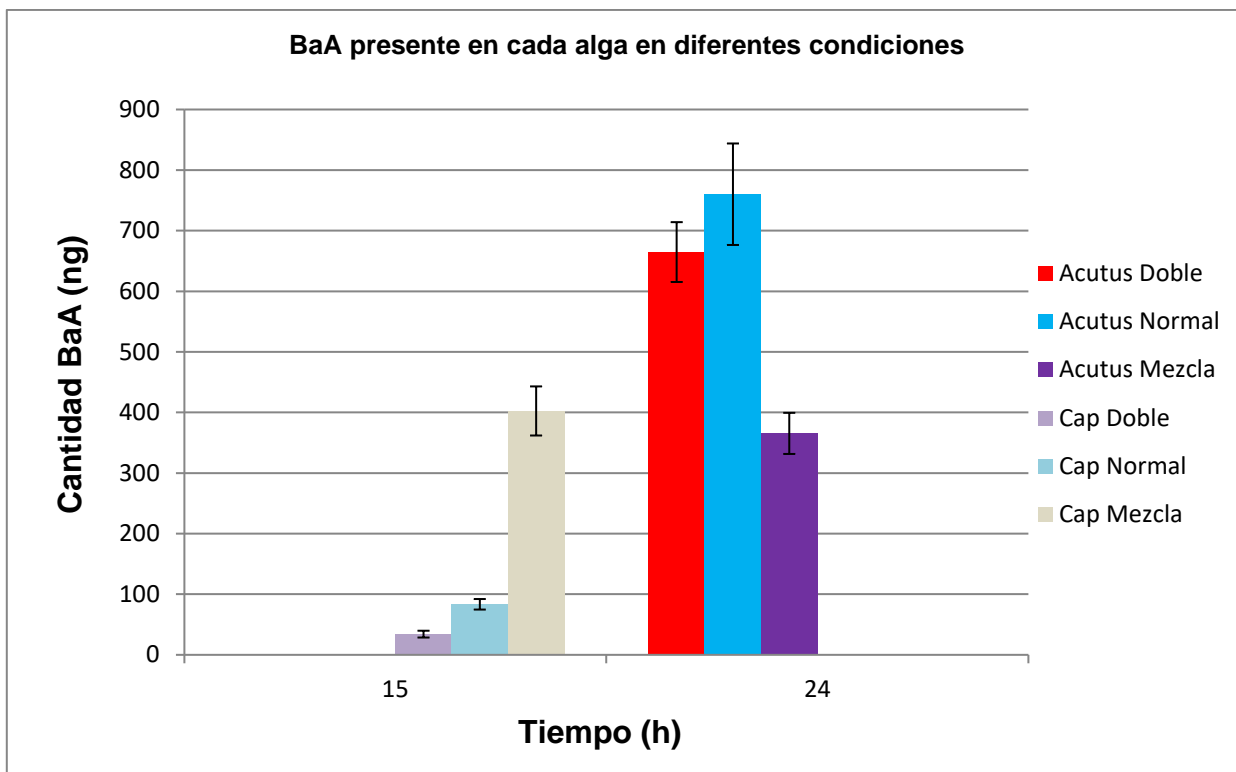


Figura 4.9 Cantidad de BaA encontrada en biomasa de *S. acutus* y *S. capricornutum*

En la figura 5.0 se observa que la cantidad máxima de BaP sorbida por *S. acutus* al utilizar el doble de células (192 ± 11 ng) es menor a la cantidad máxima que se obtuvo al utilizar el número normal de células (502 ± 65 ng). Para *S. capricornutum* la cantidad máxima de hidrocarburo encontrada al utilizar el doble de células también es casi 10 veces menor (10 ± 2 ng) en comparación al número estándar de células (96 ± 24 ng). En los ensayos independientes de mezcla de algas, las cantidades de BaP encontradas en la biomasa para cada alga resultan muy similares (103 ± 10 ng y 113 ± 12 ng).

Para este hidrocarburo también se realizó un análisis estadístico de un factor (ANOVA) para los tiempos de 15 y 24 h (Microsoft Excel 2010), en los que se comparó los ensayos realizados con el doble de células/ mezcla de algas (cada uno,

sus triplicados) contra el ensayo realizado con el número estándar de células (también triplicado). Como en el caso de *S. acutus*, en ambos casos y algas la F obtenida fue mayor a F de tablas (7.71), por lo que se concluye que hay diferencia entre cada bioensayo realizado y la cantidad de BaP adsorbido.

De acuerdo con Santiago León, 2016 al utilizar doble de células hay una mayor remoción de los HAPs (menor presencia en el medio) con respecto a utilizar el número normal de células a las 6 h, lo cual es más notorio en el caso de *S. acutus*. Es posible que la cantidad presente de HAPs en la biomasa durante la experimentación al utilizar doble de células con respecto al número normal de células sea menor debido a que se remueve más del medio por biodegradación. En el mismo trabajo, se menciona que para la mezcla de perlas de cada alga (50:50) a las 6 h la remoción es ligeramente menor con respecto a la remoción presentada al utilizar el número normal de células de *S. capricornutum*, y es mayor a la remoción que se presenta con el número normal de células de *S. acutus*. Lo anterior permite deducir que la mayor rapidez en degradación de *S. capricornutum* se refleja en los bioensayos con la mezcla de especies.⁴⁸

Como se observa en las figuras 4.9 y 5.0, la cantidad de HAPs presentes en la biomasa al utilizar la proporción 50:50 de perlas de cada especie es mayor con respecto a lo encontrado en la biomasa al utilizar el número normal de células para *S. capricornutum*, lo que indica que podría existir una mayor remoción con el número normal de células de esta especie debido a que esta alga degrada más rápido y al tener perlas de *S. acutus* su remoción se ve alentada. Por otra parte, para *S. acutus* la mezcla parece tener menor acumulación en biomasa con respecto al número

normal de células, pero lo anterior no quiere decir que exista una menor remoción, sino que al estar juntas ambas especies se ayudan a remover porque se acelera la degradación

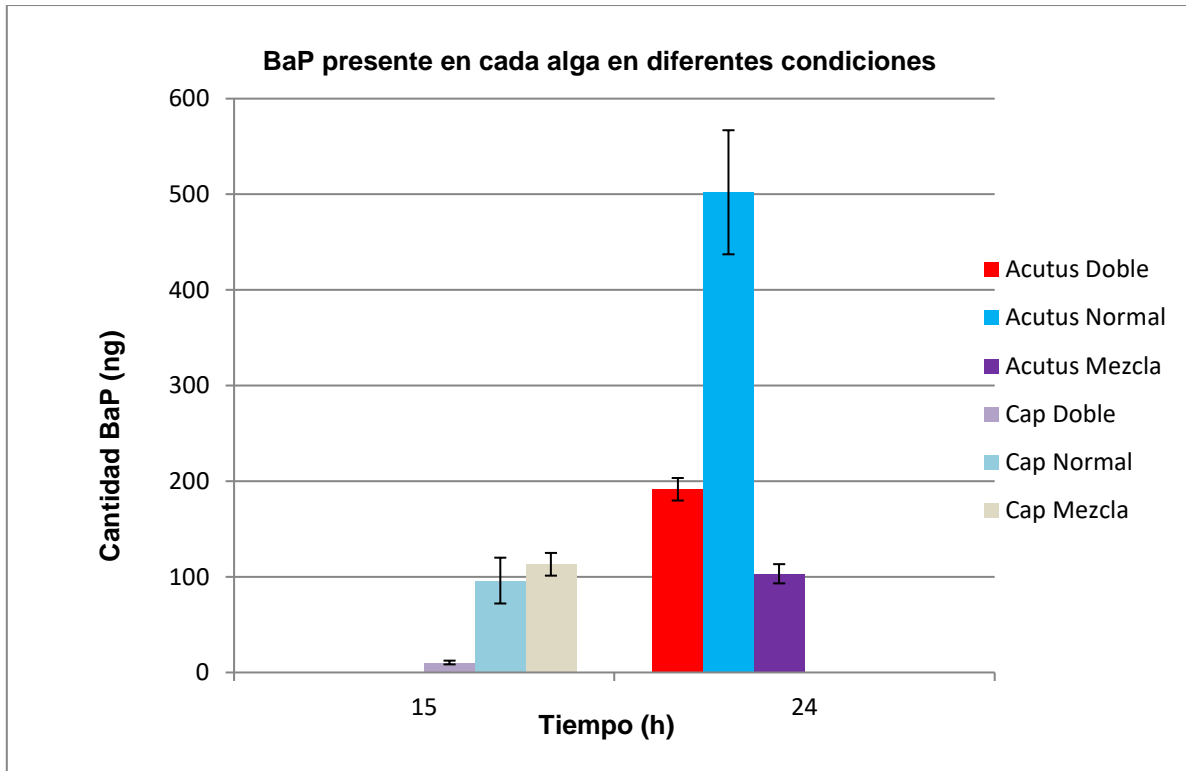


Figura 5.0 Cantidad de BaP encontrada en biomasa de *S. acutus* y *S. capricornutum*

García de Llasera et al., 2016, observaron en cultivos individuales la eliminación de BaP por medio de sorción y degradación en *S. acutus* y *S. capricornutum* en su forma libre; la eliminación completa del hidrocarburo ocurrió a las 15 h de exposición con *S. capricornutum* y a las 72 h con *S. acutus*.⁵⁵

La inmovilización en matrices poliméricas en forma esférica es una técnica que permite tener una alta concentración de microorganismos viables, por lo que teóricamente se esperaría que al existir un mayor número de células (doble) se sorbería una mayor cantidad de hidrocarburo en la biomasa. Sin embargo, esta

hipótesis sería correcta si se supusiera que las microalgas removieran HAPs sólo por sorción y la difusión del sustrato hacia dentro de la cuenta y por consecuencia hacia las células fuera independiente. Sin embargo, se sabe también que una alta carga de microorganismos en las cuentas limita la difusión de sustratos y provoca una disminución en la difusión de oxígeno, lo que disminuye el crecimiento del alga⁴⁰; esta sería una explicación de la mayor sorción de hidrocarburo en condiciones de menor cantidad de células, a diferencia de utilizar el doble de células. Ruiz Marín, 2011 reporta una mayor tasa fotosintética de *S. acutus* cuando se inmoviliza en cuentas de alginato de baja densidad celular en comparación a cuentas con alta densidad celular. Bernal- Toris, 2015 reportó que la mayor densidad de microalgas por cuenta limitaban la difusión de los hidrocarburos, lo que implica un impacto en su remoción.²

3.8 Determinación de los HAPs en el alginato disuelto después de exposición

Tras el bioensayo 1 se utilizó una muestra que había estado en exposición a 4 µg de HAPs durante 24 y 48 h con las microalgas inmovilizadas en las perlas (bioensayos) para compararla con un control (perlas sin algas) que también se expuso a 4 µg de HAPs durante 48 h a los HAPs. En la figura 5.1 se comparan las áreas resultantes de los cromatogramas sobrepuestos. Se observa que el control de 48 h mostró la mayor área (color verde), seguido del bioensayo de 48 h (color azul) y al final el bioensayo de 24 h (color negro). Lo anterior demuestra que en el control hay una mayor presencia de hidrocarburo en el alginato de la cuenta disuelto en el citrato, debido a que no hubo presencia de alga que pudiera sorberlo; por el contrario, en las muestras de 24 h y 48 h el alga *S. capricornutum* ya ha sorbido

gran parte de BaP y en el alginato disuelto en el citrato queda una cantidad remanente menor.

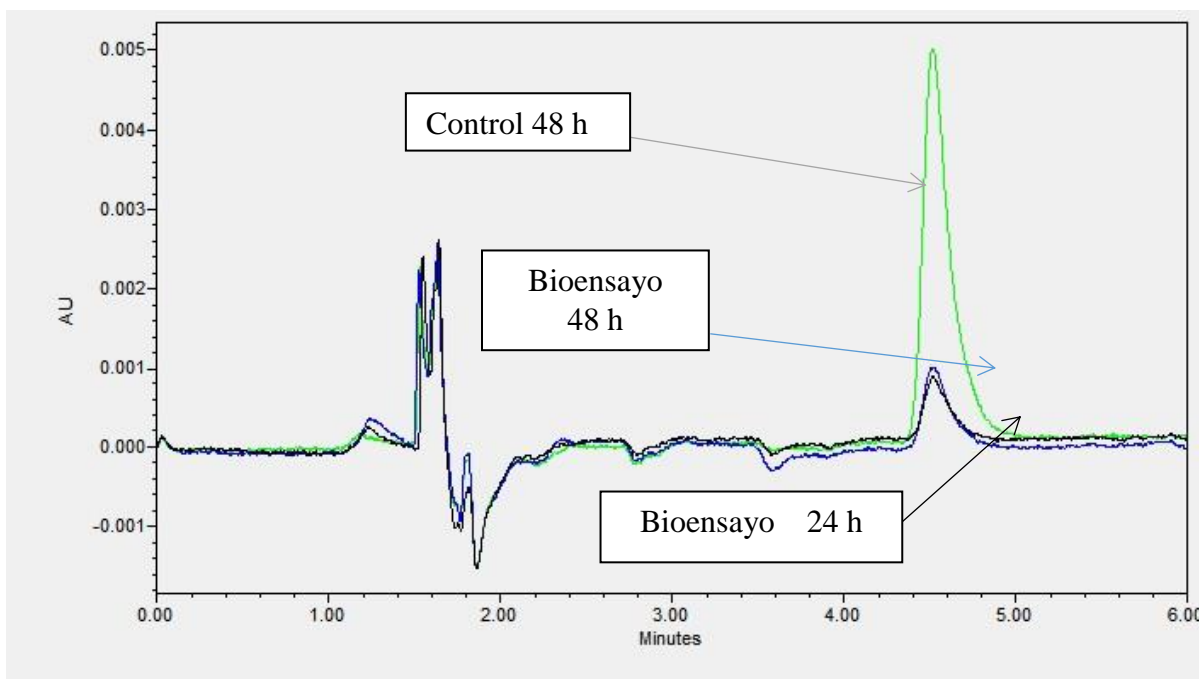


Figura 5.1 Comparación de los picos obtenidos por EFS para BaP con *S. capricornutum*

En la figura 5.2 se presenta la comparación de las áreas de los bioensayos/ control contra el estándar de 1 mg/L, en el cual se observa que el control de 48 h representa el 15 % del estándar, mientras que el bioensayo de 48 h representa el 3% y el bioensayo de 24 h es el equivalente a 2%. En ambas muestras de bioensayos el alga ha sorbido gran parte del hidrocarburo retenido en el alginato, por lo que se espera que el % que representan de un estándar sea menor en comparación al control que no tuvo microalga involucrada. Este ensayo se realizó con el fin de corroborar que la cantidad de hidrocarburo presente en el citrato tras la *desinmovilización* era mínima y no afectaba el bioensayo.

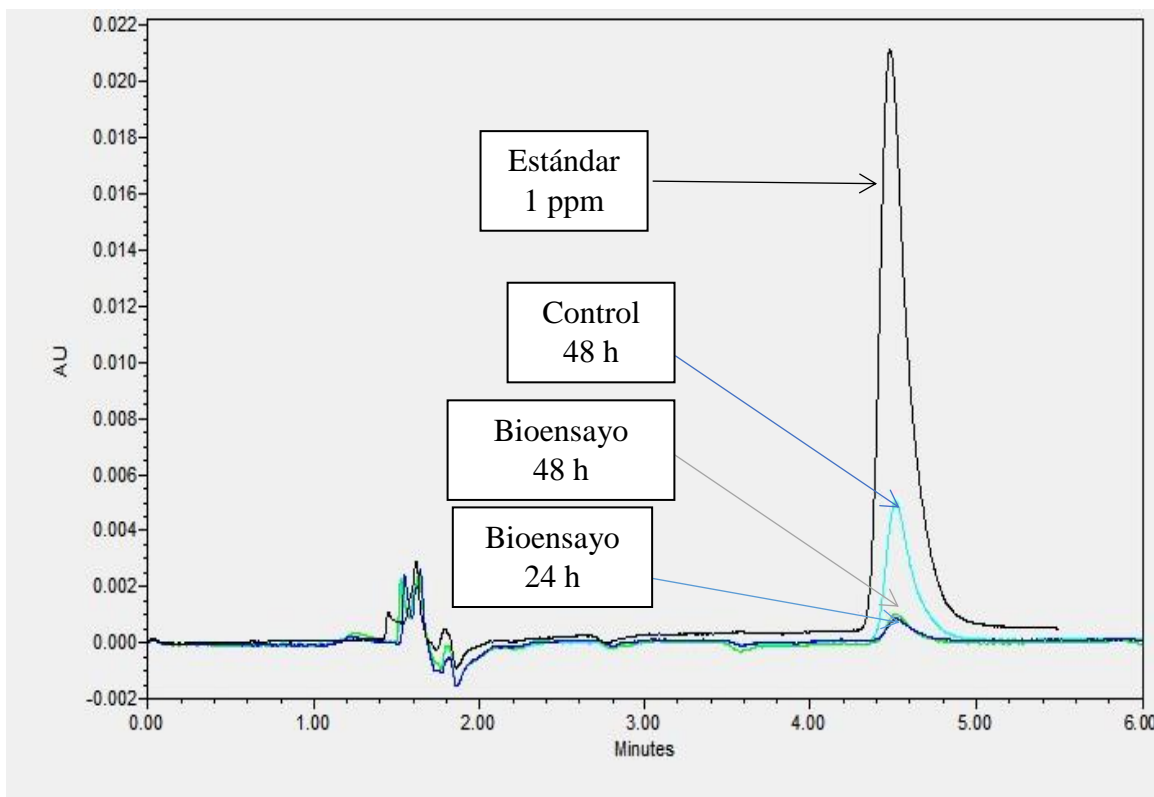


Figura 5.2 Comparación de los picos del BaP obtenidos por EFS del alginato disuelto con un estándar de 1 mg/L.

CAPÍTULO 4. Conclusiones

Las algas crecían aún después de su inmovilización por periodos de 24 y 72 h. después de las 24 h el crecimiento es mucho más notorio.

Las condiciones de DMFS se optimizaron para su aplicación en el análisis de los hidrocarburos BaA y BaP utilizando algas inmovilizadas en cuentas de alginato

Las metodologías de DMFS utilizada para extraer BaA y BaP de la biomasa fueron lineales y reproducibles en el intervalo de concentraciones utilizadas, lo anterior se logró analizar con la cromatografía de líquidos de alta resolución y detección UV.

S. capricornutum inmovilizada sorbía la mayor cantidad de BaP a las 15 h, lo cual sirvió para establecer los tiempos en que se llevarían a cabo los bioensayos subsecuentes.

Al utilizar una mezcla de hidrocarburos de BaA/ BaP, *S. capricornutum* sorbía la mayor cantidad de hidrocarburos a las 15 h, mientras que *S. acutus* lo hacía a las 24 h. *S. acutus* resulta ser el alga que acumula más hidrocarburos a un mayor tiempo, pero también degrada de manera más lenta; *S. capricornutum* acumula una menor cantidad de hidrocarburos en la biomasa y degrada más rápido.

Se observó una cantidad mayor de BaP en la biomasa de *S. capricornutum* cuando el hidrocarburo se analizó por separado en comparación a cuando se encontraba en una mezcla con BaA, por lo que existe una diferencia notable en su sorción.

Al existir un mayor número de células en las cuentas se presenta una menor acumulación de los hidrocarburos en la biomasa, por lo que existe una mayor remoción en el medio debido a la biodegradación.

Los ensayos independientes de la mezcla de algas demostraron acumular cantidades bastante parecidas de hidrocarburo en la biomasa. En el caso de *S. acutus*, la mezcla parece tener menor acumulación de HAPs en biomasa con respecto al número normal de células, por lo que se cree que al estar juntas ambas especies de algas se ayudan a remover porque se acelera la degradación.

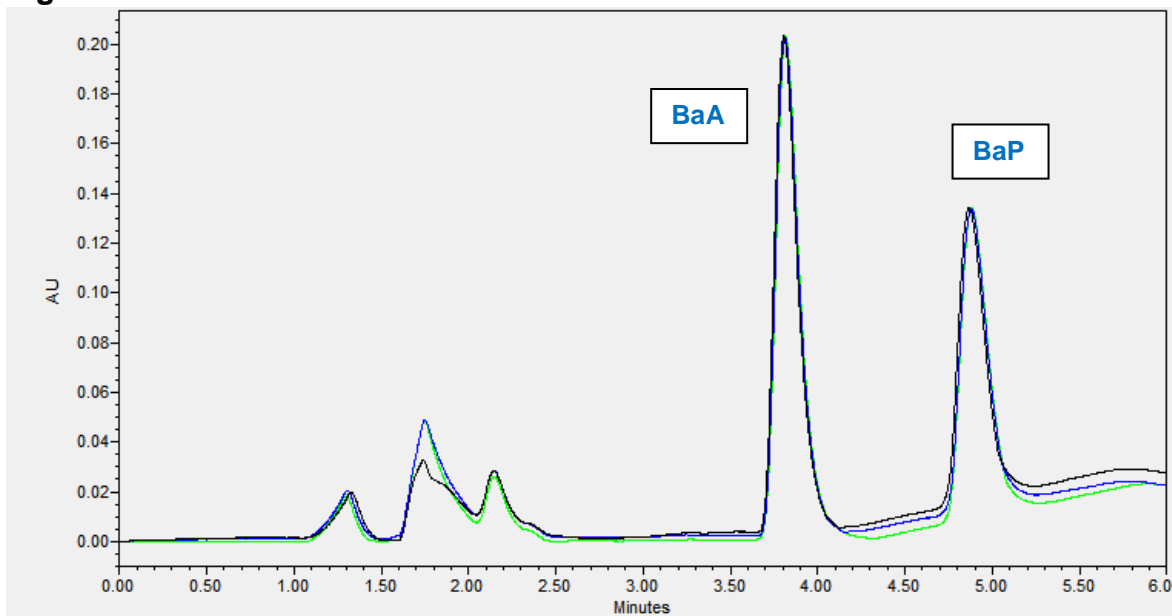
PERSPECTIVAS

Con el objetivo de dar seguimiento al presente estudio, se podrían realizar ciertas acciones para futuros trabajos relacionados.

- Utilizar diferentes especies de algas (que también demuestren remover/sorber contaminantes) y establecer sus tiempos de remoción/sorción máxima a través de ensayos de exposición.
- Con relación a la cantidad de HAPs presentes en alginato al *desinmovilizar*, se podría establecer un plan de trabajo para determinar por cromatografía de líquidos de alta resolución cual es esta cantidad cuantitativamente, utilizando la EFS con modificaciones en los lavados de muestra.
- Podría considerarse la inclusión de muestras de agua potable tomadas de garrafones o de distintas partes de la ciudad, aunque para ellos se necesitaría establecer un tratamiento previo para evitar interferencias de contaminantes.

ANEXOS

Anexo I: Cromatograma de la disolución estándar de la mezcla BaA y BaP a 4 mg/L



I-Cromatograma para la determinación de los parámetros cromatográficos en BaA y BaP.
Longitud de onda: Max Plot

Anexo II: Ensayos de dispersión de matriz en fase sólida

Ensayos de DMFS sin biomasa

Muestra	Area BaA	% Recuperación	tr	Area BaP	% Recuperación	Tr
1	2237690	77.0374945	3.557	1249011	78.2100758	4.481
2	2263394	77.9224124	3.564	1298335	81.2986265	4.488
3	2214952	76.2546879	3.558	1263801	79.1361902	4.882
X	2238678.667	77.0715316		1270382.333	79.5482975	
S	24236.12876	0.83438306		25312.04664	1.58497971	
C.V	1.082608644	1.08260864		1.992474705	1.9924747	

I-Tabla de las áreas encontradas y los coeficientes obtenidos al realizar ensayos de DMFS sin biomasa

Ensayos de DMFS con biomasa (algas libres)

Muestra	Area BaA	% Recuperación	Tr	Area BaP	% Recuperación	tr
1	2119721	55.6728955	3.711	1271693	60.0818955	4.813
2	2220813	58.3280017	3.774	1292855	61.0817069	4.818
3	2352572	61.7885538	3.711	1367738	64.6195989	4.813
X	2231035.333	58.5964837		1310762	61.9277338	
S	116761.591	3.06665634		50464.40323	2.38422088	
C.V	5.233515992	5.23351599		3.850005053	3.85000505	

II-Tabla de las áreas encontradas y los coeficientes obtenidos al realizar ensayos de DMFS con biomasa (algas libres)

Ensayos de DMFS con biomasa (algas inmovilizadas)

Muestra	Area BaA	% Recuperación	Tr	Area BaP	% Recuperación	tr
1	1723837	85.29638017	4.173	838423	86.01706957	5.419
2	1483768	73.41763717	4.176	711762	73.022426	5.422
3	1689377	83.59128087	4.167	804941	82.58202124	5.41
X	1632327.333	80.76843274		785042	80.5405056	
S	129804.7747	6.422809936		65633.29857	6.733574829	
C.V	7.952128968	7.952128968		8.360482442	8.360482442	

III-Tabla de las áreas encontradas y los coeficientes obtenidos al realizar ensayos de DMFS con biomasa (algas libres)

Anexo III: Bioensayos de exposición

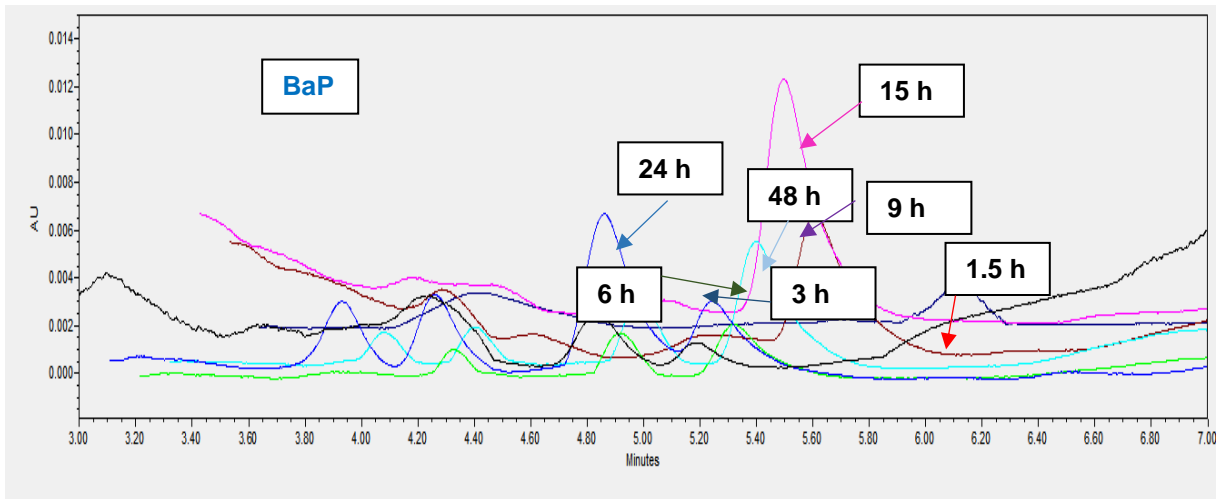
Anexo III A

Bioensayo (1): Exposición de *S. capricornutum* inmovilizada con BaP agua potable

Hidrocarburo: BaP

Tiempo (h)	Cantidad adicionada (µg)	Concentración final en biomasa (µg/mg)	% Recuperado	Cantidad recuperada (µg)	Cantidad recuperada promedio (ng)	Intervalo de confianza
1.5 (Bco)	4.0216	0.68627986	0	0		
1.5	4.0216	0.7489013	1.77145648	0.07124089		
1.5	4.0216	0.85023256	1.97881292	0.07957994		
1.5	4.0216	1.01555556	1.61702312	0.0650302	77.52	11.02
3 (Bco)	4.0216	0.44242024	0	0		
3	4.0216	0.60749245	4.28549385	0.17234542		
3	4.0216	0.54715646	1.92550726	0.0774362		
3	4.0216	0.57698709	2.0738194	0.08340072	80.89	48.46
6 (Bco)	4.0216	0.53478723	0	0		
6	4.0216	1.07817694	3.66457227	0.14737444		
6	4.0216	0.80271457	4.38866196	0.17649443		
6	4.0216	0.67363484	4.02521434	0.16187802	169.76	35.62
9 (Bco)	4.0216	0.49344785	0	0		
9	4.0216	0.50970849	10.5408738	0.42391178		
9	4.0216	0.55090411	9.98358747	0.40149995		
9	4.0216	0.57451429	10.2453973	0.4120289	279.31	15.13
15 (Bco)	4.0216	0.77338462	0	0		
15	4.0216	0.33072368	14.5030906	0.58325629		
15	4.0216	0.38558006	17.1310082	0.68894063		
15	4.0216	0.3656	15.3598068	0.61770999	283.62	51.25
24 (Bco)	4.0216	0.35031359	0	0		
24	4.0216	0.34313993	13.6486698	0.54889491		
24	4.0216	0.49772277	12.1983225	0.49056774		
24	4.0216	0.35907143	13.6739199	0.54991036	261.08	42.13
48 (Bco)	4.0216	0.24581907	0	0		
48	4.0216	0.54641304	7.92966204	0.31889929		
48	4.0216	0.55546961	10.2196371	0.41099293		
48	4.0216	0.63532385	8.55364423	0.34399336	257.40	40.52

I-Tabla donde se indica las cantidades presentes en la biomasa, la concentración final en biomasa y la cantidad recuperada en el extracto de 1 mL.



II-Cromatograma de bioensayos de *S. capricornutum* con BaP. Longitud de onda: opción Max plot

Anexo III B

Bioensayo (2): Exposición de *S. capricornutum* inmovilizada con BaP/BaA en agua potable

Hidrocarburo: BaA

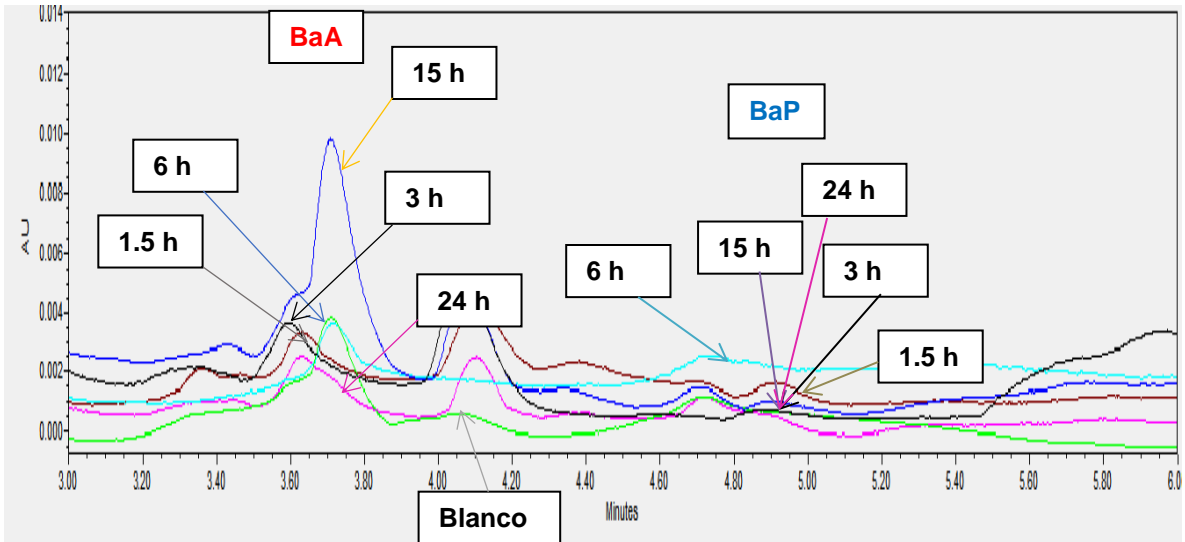
Tiempo (h)	Cantidad adicionada (µg)	Concentración final en biomasa (µg/mg)	% Recuperado	Cantidad recuperada (µg)	Cantidad recuperada promedio (ng)	Intervalo de confianza
1.5 (Bco)	4.0576	0.51755102	0	0		
1.5	4.0576	0.7310991	0.41753334	0.01526291		
1.5	4.0576	0.60924925	0.67878765	0.02067754		
1.5	4.0576	0.63899213	0.58583739	0.01871727	18.22	3.10
3 (Bco)	4.0576	0.81152	0	0		
3	4.0576	0.68424958	1.54807228	0.05296339		
3	4.0576	0.72457143	1.83049809	0.06631633		
3	4.0576	0.70813264	1.40353972	0.04969461	56.32	9.96
6 (Bco)	4.0576	0.92639269	0	0		
6	4.0576	0.82471545	1.64882257	0.06799047		
6	4.0576	0.87260215	2.02554507	0.08837475		
6	4.0576	0.96609524	1.43237195	0.06919039	75.19	12.94
15 (Bco)	4.0576	0.62617284	0	0		
15	4.0576	0.75560521	2.31957806	0.08763426		
15	4.0576	0.78483559	1.900234	0.07456856		
15	4.0576	0.7878835	2.23614567	0.08809111	83.43	8.69
24 (Bco)	4.0576	0.53671958	0	0		
24	4.0576	0.61948092	0.50639788	0.01568519		
24	4.0576	0.53040523	0.30276158	0.00802932		
24	4.0576	0.55583562	0.31149018	0.00865687	10.79	4.81

I-Tabla donde se indica las cantidades presentes en la biomasa, la concentración final en biomasa y la cantidad recuperada en el extracto de 1 mL.

Hidrocarburo: BaP

Tiempo (h)	Cantidad adicionada (µg)	Concentración final en biomasa (µg/ mg)	% Recuperado	Cantidad recuperada (µg)	Cantidad recuperada promedio (ng)	Intervalo de confianza
1.5 (Bco)	4.0096	0.511428571	0	0		
1.5	4.0096	0.72245045	0.397929404	0.014374214		
1.5	4.0096	0.602042042	0.790425382	0.023793466		
1.5	4.0096	0.631433071	0.621068248	0.019608152	19.26	5.34
3 (Bco)	4.0096	0.80192	0	0		
3	4.0096	0.676155143	1.064398994	0.035984943		
3	4.0096	0.716	0.96420293	0.034518465		
3	4.0096	0.699755672	0.96466339	0.033751434	34.75	1.28
6 (Bco)	4.0096	0.91543379	0	0		
6	4.0096	0.81495935	1.525595582	0.062164919		
6	4.0096	0.86227957	1.168831288	0.050392967		
6	4.0096	0.954666667	1.685467242	0.08045297	64.34	17.14
15 (Bco)	4.0096	0.618765432	0	0		
15	4.0096	0.746666667	2.828236503	0.105587496		
15	4.0096	0.775551257	1.852890445	0.071850576		
15	4.0096	0.778563107	2.847852093	0.110861629	96.10	23.95
24 (Bco)	4.0096	0.53037037	0	0		
24	4.0096	0.612152672	0.770257241	0.023575751		
24	4.0096	0.524130719	0.600531739	0.015737857		
24	4.0096	0.549260274	0.617845029	0.016967887	18.76	4.77

II-Tabla donde se indica las cantidades presentes en la biomasa, la concentración final en biomasa y la cantidad recuperada en el extracto de 1 mL.



III-Cromatograma de bioensayos de *S. capricornutum* con BaA/BaP. Longitud de onda: opción Max plot

Anexo III C

Bioensayo (3): Exposición de *S. acutus* inmovilizada con BaP/BaA en agua potable

Hidrocarburo: BaA

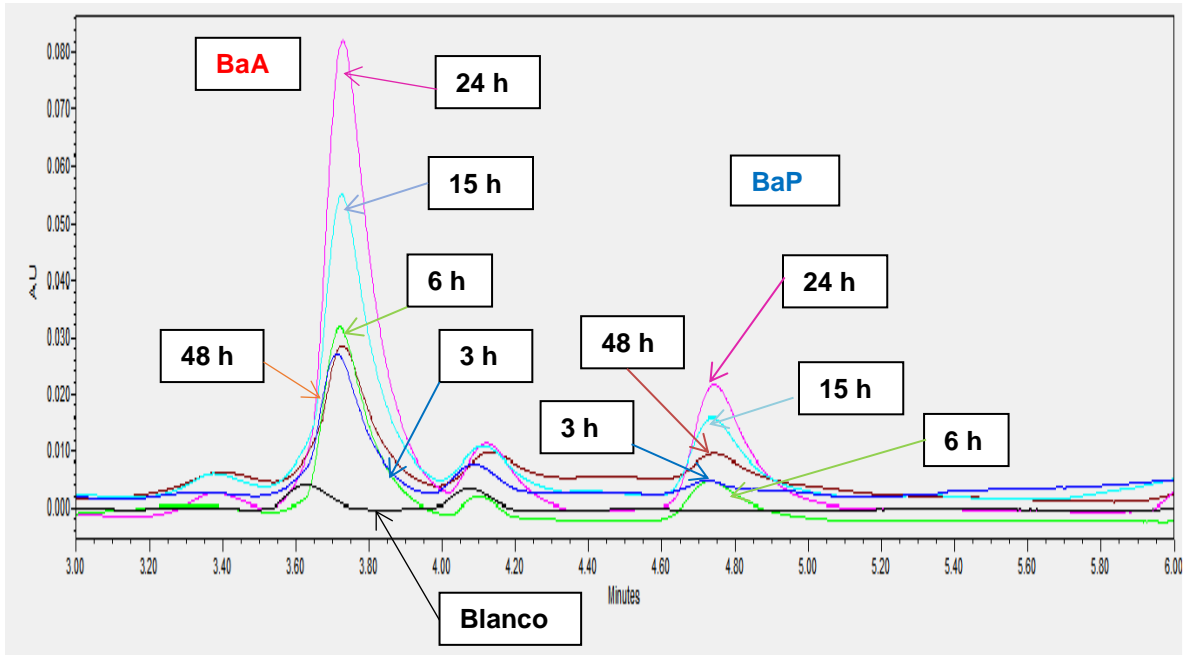
Tiempo (h)	Cantidad adicionada (µg)	Concentración final en biomasa (µg/ mg)	% Recuperado	Cantidad recuperada (µg)	Cantidad recuperada promedio (ng)	Intervalo de confianza
3 (Bco)	4.0576	0.565913529	0	0		
3	4.0576	0.565125348	11.82747102	0.334200184		
3	4.0576	0.64611465	11.12035536	0.359251225		
3	4.0576	0.611084337	8.07941931	0.24686033	313.14	66.77
6 (Bco)	4.0576	0.515578145	0	0		
6	4.0576	0.636985871	13.7918874	0.439261871		
6	4.0576	0.657633712	14.72163846	0.484072287		
6	4.0576	0.632024922	14.55965009	0.460103086	461.15	25.37
15 (Bco)	4.0576	0.64611465	0	0		
15	4.0576	0.581318052	22.00053548	0.639465421		
15	4.0576	0.578830243	28.2784548	0.818421243		
15	4.0576	0.568291317	23.2741232	0.661324106	706.40	110.47
24 (Bco)	4.0576	0.64611465	0	0		
24	4.0576	0.490048309	34.51178209	0.845622023		
24	4.0576	0.519539052	27.63681196	0.717920155		
24	4.0576	0.388659004	36.89334985	0.71694663	760.16	83.75
48 (Bco)	4.0576	0.679664992	0	0		
48	4.0576	0.77287619	11.56613659	0.446959579		
48	4.0576	0.617595129	10.51137932	0.324588834		
48	4.0576	0.574730878	9.499822049	0.272992053	348.18	101.11

I-Tabla donde se indica las cantidades presentes en la biomasa, la concentración final en biomasa y la cantidad recuperada en el extracto de 1 mL.

Hidrocarburo: BaP

Tiempo (h)	Cantidad adicionada (µg)	Concentración final en biomasa (µg/ mg)	% Recuperado	Cantidad recuperada (µg)	Cantidad recuperada promedio (ng)	Intervalo de confianza
3 (Bco)	4.0096	0.559218968	0	0		
3	4.0096	0.558440111	4.797439999	0.133954146		
3	4.0096	0.638471338	4.518801038	0.144256247		
3	4.0096	0.603855422	3.327013247	0.100451749	126.22	18.15
6 (Bco)	4.0096	0.509479034	0	0		
6	4.0096	0.629450549	7.161616088	0.225394159		
6	4.0096	0.649854133	7.704984938	0.250355815		
6	4.0096	0.624548287	7.944275868	0.248079194	241.28	5.72
15 (Bco)	4.0096	0.638471338	0	0		
15	4.0096	0.574441261	14.24664078	0.409192914		
15	4.0096	0.571982882	20.20008931	0.577705265		
15	4.0096	0.561568627	16.27617559	0.457009479	481.30	18.04
24 (Bco)	4.0096	0.638471338	0	0		
24	4.0096	0.484251208	23.46030241	0.568033989		
24	4.0096	0.513393086	18.47097213	0.474143469		
24	4.0096	0.384061303	24.16948203	0.464128138	502.10	11.42
48 (Bco)	4.0096	0.671624791	0	0		
48	4.0096	0.763733333	4.740797136	0.18103524		
48	4.0096	0.610289193	5.387843472	0.164407132		
48	4.0096	0.567932011	4.580751309	0.130077765	158.51	16.39

II-Tabla donde se indica las cantidades presentes en la biomasa, la concentración final en biomasa y la cantidad recuperada en el extracto de 1 mL.



III. Cromatograma de bioensayos de *S. acutus* con BaA/BaP. Longitud de onda: opción Max plot

Anexo III D

Bioensayo (4). Exposición con doble de células y mezcla de especies

Hidrocarburo: BaA

Alga: *S. acutus* (Bioensayo b y c)

Muestra	Tiempo (h)	% Recuperado	Cantidad recuperada (µg)	Cantidad recuperada promedio (ng)	Intervalo de confianza
AcuDobleBco	24	0	0		
AcuDoble1	24	36.2180845	0.70891574		
AcuDoble2	24	35.4286347	0.66353911		
AcuDoble3	24	33.6304758	0.62169671	664.72	49.36
AcuMezclaBco	24	0	0		
AcuMezcla1	24	13.6788056	0.38958253		
AcuMezcla2	24	11.1705656	0.33187551		
AcuMezcla3	24	13.6142661	0.37490872	365.46	33.94
AcuNormBco	24	0	0		
AcuNormal1	24	34.5117821	0.84562202		
AcuNormal2	24	27.636812	0.71792016		
AcuNormal3	24	36.8933498	0.71694663	760.16	83.75

I-Tabla donde se indica el porcentaje recuperado y la cantidad recuperada de BaA por *S. acutus* con el número normal de células, doble de células y mezcla de perlas de ambas algas 50:50

Alga: *S. capricornutum* (Bioensayo a y c)

Muestra	Tiempo (h)	% Recuperado	Cantidad recuperada (µg)	Cantidad recuperada promedio (ng)	Intervalo de confianza
CapDobleBco	15	0	0		
CapDoble1	15	1.709184121	0.029518911		
CapDoble2	15	1.839797272	0.033606178		
CapDoble3	15	2.508860948	0.039378466	34.17	5.61
CapMezclaBco	15	0	0		
CapMezcla1	15	10.45354467	0.362965251		
CapMezcla2	15	11.68304688	0.432749594		
CapMezcla3	15	12.76655894	0.411767931	402.49	40.52
CapNormBco	15	0	0		
CapNormal1	15	2.319578056	0.087634264		
CapNormal2	15	1.900234001	0.074568564		
CapNormal3	15	2.236145675	0.088091113	83.43	7.68

II-Tabla donde se indica el porcentaje recuperado y la cantidad recuperada de BaA por *S. capricornutum* con el número normal de células, doble de células y mezcla de perlas de ambas algas 50:50

Hidrocarburo: BaP

Alga: *S. acutus* (Bioensayo b y c)

Muestra	Tiempo (h)	% Recuperado	Cantidad recuperada (µg)	Cantidad recuperada promedio (ng)	Intervalo de confianza
AcuDobleBco	24	0	0		
AcuDoble1	24	0.41322786	0.202562676		
AcuDoble2	24	0.405768764	0.19032306		
AcuDoble3	24	0.392870824	0.181884641	191.59	11.77
AcuMezclaBco	24	0	0		
AcuMezcla1	24	0.154605679	0.110275092		
AcuMezcla2	24	0.125364818	0.093277395		
AcuMezcla3	24	0.153957389	0.10617751	103.24	10.04
AcuNormBco	24	0	0		
AcuNormal1	24	0.940664286	0.568033989		
AcuNormal2	24	0.740612099	0.474143469		
AcuNormal3	24	0.969099552	0.464128138	502.10	64.86

III-Tabla donde se indica el porcentaje recuperado y la cantidad recuperada de BaP por *S. acutus* con el número normal de células, doble de células y mezcla de perlas de ambas algas 50:50

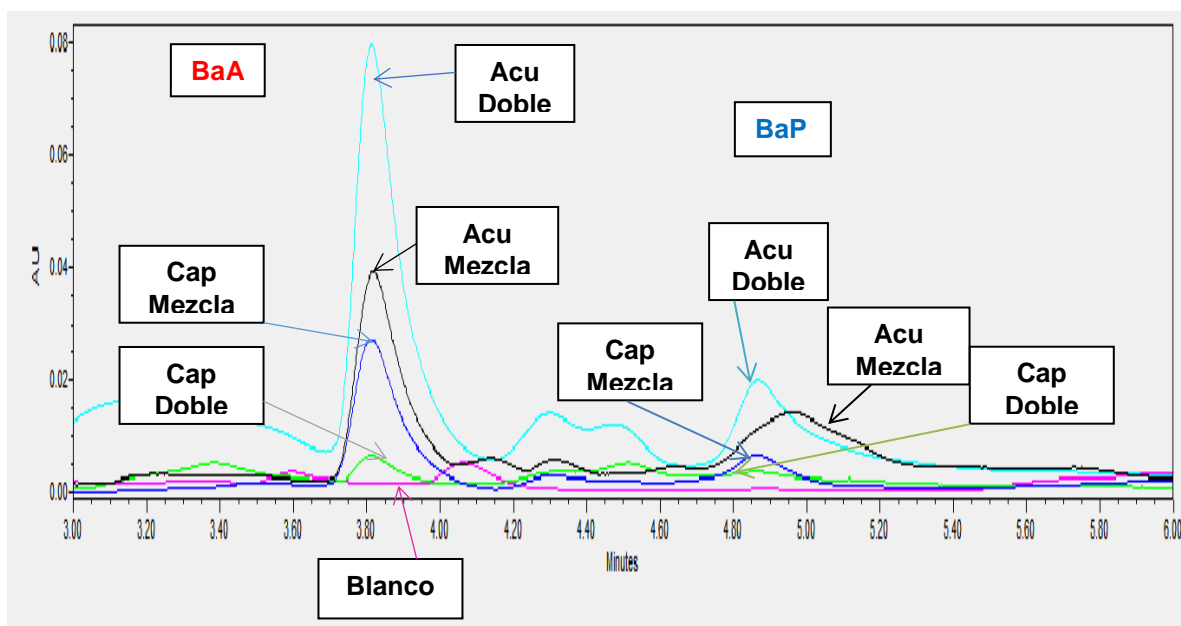
Alga: *S. capricornutum* (Bioensayo a y c)

Hidrocarburo: BaP

Alga: *S. acutus* (Bioensayo b y c)

Muestra	Tiempo (h)	% Recuperado	Cantidad recuperada (µg)	Cantidad recuperada promedio (ng)	Intervalo de confianza
CapDobleBco	24	0	0		
CapDoble1	24	0.41322786	0.202562676		
CapDoble2	24	0.405768764	0.19032306		
CapDoble3	24	0.392870824	0.181884641	10.44	1.95
CapMezclaBco	24	0	0		
CapMezcla1	24	0.154605679	0.110275092		
CapMezcla2	24	0.125364818	0.093277395		
CapMezcla3	24	0.153957389	0.10617751	113.12	11.88
CapNormBco	24	0	0		
CapNormal1	24	0.940664286	0.568033989		
CapNormal2	24	0.740612099	0.474143469		
CapNormal3	24	0.969099552	0.464128138	96.10	23.95

IV-Tabla donde se indica el porcentaje recuperado y la cantidad recuperada de BaP por *S. capricornutum* con el número normal de células, doble de células y mezcla de perlas de ambas algas 50:50



V. Cromatograma de bioensayos con doble de células y mezcla de algas con BaA/BaP. *S. acutus* se evaluó a 24 h y *S. capricornutum* a 15 h. Longitud de onda: opción Max plot

***Opción Max plot: Máxima absorptividad para todas las especies presentes en la muestra**

BIBLIOGRAFÍA

- 1- Cerniglia, C. E., 2003. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *National Center for Toxicological Research*, 4, pp. 331-338.
- 2- Bernal Toris, D.N., 2015. Tesis. Evaluación de la capacidad de *Selenastrum capricornutum* inmovilizada en alginato para remover Benzo[a]Pireno de medio de cultivo acuoso. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.
- 3- Haritash, A. K., Kaushik, C.P; 2009. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials*, 169 (1-3), pp. 1-15.
- 4- Cassidy, M.B., Lee, H., Trevors, J.T., 1996. Environmental applications of immobilized microbial cells: a review. *Journal of Industrial Microbiology*, 16, pp. 79-101.
- 5- Rubio-Clemente, A., Torres-Palma, R. A., Peñuela Gustavo, A., 2014. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous environment by chemical treatments: A review. *Science of the Total Environment*, 478, pp. 201-225.
- 6- Bojes, H., Pope, P., 2007. Characterization of EPA's 16 priority pollutant polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in tank bottom solids and associated contaminated soils at oil exploration and production sites in Texas. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 47, pp. 288-295.
- 7- Chan, S.M.N; Luan, T.; Wong, M. H; Tam, N. F. Y; 2006. Removal and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Selenastrum*

- capricornutum*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 25(7), pp. 1772-1779.
- 8- Skupinska, K., Misiewicz, I., Kasprzycka-Guttman, T., 2004. Polycyclic aromatic hydrocarbons: physicochemical properties, environmental appearance and impact on living organism. *Acta Poloniae Pharmaceutica* ,61, pp. 233-240.
- 9- Doyle, E., Muckian, L., Hickey, A.M, Clipson, Nicholas, 2008. Microbial PAH Degradation. *Environmental Science and Pollution Research Journal*, 65, pp. 27-28.
- 10- Calesso-Teixeira, E., Para, D., Idalgo, D., Pegas, H., Wiegand, F., 2012. DNA- damage effect of polycyclic aromatic hydrocarbons from urban area, evaluated in lung fibroblast cultures. *Environmental pollution*, 162, pp. 430-438.
- 11- Bekki, K., Toriba, A., Tang, N., Kameda, T., Hayakawa, K., 2013. Biological effects of polycyclic aromatic hydrocarbon derivatives. *Division of Environmental Science and Engineering* ,35 (1), pp. 17-24.
- 12- Fu, P., Xia, Q., Sun, X., Yu, H., 2012. Phototoxicity and Environmental Transformation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)—Light-Induced Reactive Oxygen Species, Lipid Peroxidation, and DNA Damage. *Journal of environmental science and health. Part C: Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews*, 30(1), pp. 1-41.
- 13- Juhasz, A.L., Naidu, R., 2000. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of

- benzo[a]pyrene. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 45, pp. 57-88.
- 14- SEMARNAT, 2013. NOM-138- SEMARNAT/ SSA1-2012, México.
- 15-US-EPA, 2009. National primary drinking water regulations.
- 16- Bouloubassi, I., Roussiez, V., Azzoug, M., Lorre, A., 2012. Sources, dispersal pathways and mass budget of sedimentary polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in the NW Mediterranean margin, Gulf of Lions. *Marine Chemistry*, 142–144, pp. 18–28.
- 17- González, N., Simarro, R., Molina, M.C., Bautista, L. F., Delgado, L., Villa, J.A., 2011. Effect of surfactants on PAH biodegradation by a bacterial consortium and on the dynamics of the bacterial community during the process. *Bioresource Technology* ,102, pp. 9438-9446.
- 18- Mares Brum, D., Cassella, R., Pereira Netto, A., 2008. Multivariate optimization of a liquid–liquid extraction of the EPA-PAHs from natural contaminated waters prior to determination by liquid chromatography with fluorescence detection. *Talanta* ,74, pp. 1392–1399.
- 19- IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). XML on-line corrected version: <http://goldbook.iupac.org> (2006-) created by M. Nic, J. Jirat, B. Kosata.
- 20- Moreno Jiménez, A. 2016. Tesis. Plan de capacitación para el personal de nuevo ingreso en cromatografía de líquidos de alta resolución. Facultad de química. Universidad Nacional Autónoma de México.

- 21-Skoog, D. A., West, D., Holler, F. J. 1997. Fundamentos de química analítica. 4a Edición. Editorial Reverté. pp. 711-715.
- 22- Fidalgo-Used, N., Blanco-González, E., Sanz-Medel, A., 2007. Sample handling strategies for the determination of persistent trace organic contaminants from biota samples. *Analytica Chemical Acta*, 590, pp. 1–16.
- 23- Nickerson, B., 2011 Sample preparation of pharmaceutical dosage forms: challenges and strategies for sample preparation and extraction. Editorial Springer, pp. 63-92.
- 24-Camel, V., 2003. Review. Solid phase extraction of trace elements. *Spectrochimica Acta Part B*, 58, pp. 1177–1233.
- 25- Żwir-Ferenc, A., Biziuk, M., 2006. Solid Phase Extraction Technique – Trends, Opportunities and Applications. *Polish Journal of Environmental*, 15 (5), pp. 677-690.
- 26- Barker S., 2007. Review. Matrix solid phase dispersion (MSPD). *Journal Biochem. Biophys. Methods* ,70, pp.151–162.
- 27- García-López, M., Canosa, P., Rodríguez, I., 2008. Trends and recent applications of matrix solid-phase dispersion. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391, pp. 963–974.
- 28- Moliner-Martínez, Y., González-Fuenzalida, R.A., Herráez-Hernández, R., Campíns-Falcó, P., Verdú-Andrés, J., 2010. Cleaning sorbents used in matrix solid-phase dispersion with sonication: application to the estimation of polycyclic aromatic hydrocarbons at ng/g levels in marine sediments. *Journal of Chromatography A*, 12, pp. 1-23.

- 29- Capriotti, A. L., Cavaliere, C., Laganá, A., Piovesana, S., Samperi, R., 2013. Recent trends in matrix solid-phase dispersion. *Trends in Analytical Chemistry*, 43, pp. 53-66.
- 30- Peña Salamanca, E.J., Palacios Penaranda, M. L., Ospina Álvarez, N., 2005. Algas como indicadores de contaminación. *Programa Editorial Universidad del Valle*, Cali, Colombia, pp. 19-24.
- 31- El Gamal, A., 2010. Biological importance of marine algae. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 18, pp. 1–25.
- 32- Dreckmann, K., Senties, A., Núñez, M. L., 2013. Manual de prácticas de laboratorio: biología de algas. Universidad Autónoma Metropolitana, pp. 13-19.
- 33- De-Bashan, L. E., Bashan, Y. 2010. Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects. *Bioresource Technology* ,10, pp. 1611–1627.
- 34- Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A.A., Ibraheem I.B., 2012. Review. Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19, pp. 257–275.
- 35- Wan, J., Li, X., Lu, D., Du, Y., Ma, L., Li, W., Chen, J., Li, F., Fan, Y., Hu, G., Wang, J., 2016. Photosynthetic Effect in *Selenastrum capricornutum* Progeny after Carbon-Ion Irradiation. *PLoS One*, 11(2), pp. 1-14.
- 36- Castillo, G., 2004. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. *IDRC, IMTA*, Canadá, pp. 69 -71.

- 37- Giovanardi, M., Baldisserotto, C., Daglia, M., Ferroni, L., Sabia, A., Pancaldi, S., 2016. Morpho-physiological aspects of *Scenedesmus acutus* PVUW12 cultivated with a dairy industry waste and after starvation, *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all aspects of Plant Biology*, 150:4, pp. 767-775.
- 38- Montaña Montiel, A., 2013. Tesis. Remoción de hidrocarburos aromáticos policíclicos en medio acuoso por *Scenedesmus acutus*. Facultad de química. Universidad Nacional Autónoma de México.
- 39- Kourkoutas, Y., Bekatoroua, A., Banatb, I.M., Marchantb, R., Koutinasa, A.A., 2004. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiology* ,21, pp. 377–397.
- 40- Cohen, Y., 2001. Biofiltration -the treatment of fluids by microorganisms immobilized into the filter bedding material: a review. *Bioresource Technology*,77, pp. 257-274.
- 41- Gonçalves, A., Pires, J., Simões, M., 2016. A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment. *Algal Research*. pp. 1-13.
- 42- Mallick, N. 2002. Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: A review. *BioMetals*, 15, pp. 377–390.
- 43- Moreno-Garrido, I., 2008. Review: Microalgae immobilization: Current techniques and uses. *Bioresource Technology*, 99, pp. 3949–3964.
- 44- Siddhesh, N. P., Kevin, J. E., 2012. Alginate derivatization: A review of chemistry, properties and applications. *Biomaterials*, 33, pp. 3279-3305.

- 45- Leennen, Emily J. T., Dos Santos, V., Grolle Katja, C., Tramper Johannes, H., Wijffels, R., 1996. Characteristics of and selection criteria for support materials for cell immobilization in wastewater treatment. *Water Research*, 30 (12), pp. 2985-299.
- 46- Sikorski, P., Mo, F., Skjåk-Bræk, G., Stokke, B., 2007. Evidence for Egg-Box-Compatible Interactions in Calcium-Alginate Gels from Fiber X-ray Diffraction. *Biomacromolecules*, 8, pp. 2098-2103.
- 47- Zamani, N., Noshadi, M., Amin, S., Niazi, A., Ghasemi, Y., 2012. Effect of alginate structure and microalgae immobilization method on orthophosphate removal from wastewater. *Journal of Applied Phycology*, 24, pp. 649–656.
- 48- Santiago León, M., 2016. Tesis. Biorremoción de contaminantes orgánicos de medio acuoso con sistemas algales. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
- 49- Díaz Flores, G., 2013. Tesis. Evaluación de la biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos por la microalga *Selenastrum capricornutum* mediante metodología de extracción en fase sólida y dispersión de matriz en fase sólida acoplada a CLAR-UV. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
- 50- CONAGUA, 2014. Ley federal de derechos. Disposiciones aplicables en materia de aguas nacionales 2014, México.
- 51- Velasco, M., 2011. Tesis. Metodología analítica cromatográfica para la determinación de metabolitos de hidrocarburos aromáticos policíclicos. Tesis, Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.

- 52- Ruiz-Marin, A., Mendoza-Espinosa, G., Sánchez Saavedra, M., 2011. Características fotosintéticas y crecimiento de *Scenedesmus obliquus* inmovilizada en alginato. *Agrociencia*, 45, pp. 303- 313.
- 53- Environmental Protection Agency: METHOD 8000D DETERMINATIVE CHROMATOGRAPHIC SEPARATIONS [página principal en internet]. E.U.A; c2014 [actualizado el 04 Jul 2014; citado el 08 Ago 2017]. Disponible en: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/8000d.pdf>
- 54- Beltrán Calva, E., 2014. Tesis. Biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos por microalgas verdes bajo diferentes temperaturas. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
- 55- García de Llasera, M. P., Olmos-Espejel, J., Díaz-Flores, G., Montañó-Montiel, A. 2016. Biodegradation of benzo(a)pyrene by two freshwater microalgae *Selenastrum capricornutum* and *Scenedesmus acutus*: a comparative study useful for bioremediation. *Environmental Science and Pollution Research Journal*, 23, pp. 3365- 3375.

