



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**REMOCIÓN DE BENZO[A]PIRENO Y
BENZO[A]ANTRACENO DEL AGUA POTABLE POR
SELENASTRUM CAPRICORNUTUM Y SCENEDESMUS
ACUTUS CONTENIDAS EN DISCOS DE ALGINATO.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

ANDRÉS BACA IBAÑEZ

CDMX

2019





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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: JOSEFINA ELIZALDE TORRES
VOCAL: JULIO CESAR AGUILAR CORDERO
SECRETARIO: MARTHA PATRICIA GARCIA CAMACHO
1er SUPLENTE: ANA ELENA GARCIA IÑARRITU
2do.SUPLENTE: GENARO JIMENEZ REYES

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

Departamento de Química Analítica. Laboratorio 208, Edificio F2, Facultad de Química, Circuito Interior Ciudad Universitaria.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Martha Patricia García Camacho

SUSTENTANTE:

Andrés Baca Ibañez

Agradecimientos.

A mi Universidad por darme el lugar y las herramientas para crecer en todos los ámbitos.

A la Facultad de Química por ayudarme a construir una carrera y desarrollarme profesionalmente.

A la Dra. Martha Patricia García Camacho por su guía y crítica constructiva en la realización de esta tesis.

No se pudo haber realizado este proyecto sin el apoyo de la Dirección General de asuntos Académicos (DGAPA), Programa de Apoyo a Proyectos de investigación e innovación tecnológica (PAPIIT). Proyecto IT202718 “Diseño y evaluación de un biorreactor microalgal para la remediación de un medio acuoso contaminado con hidrocarburos aromáticos policíclicos” y el Proyecto IT2032014 “Bioremoción de hidrocarburos aromáticos policíclicos en cultivos acuosos con microalgas libres e inmovilizadas”.

A mis padres por su apoyo incondicional, múltiples enseñanzas y amor inquebrantable.

A mis amigos y compañeros que me dieron apoyo durante toda la carrera.

CONTENIDO

Introducción

Objetivos

Capítulo 1. ANTECEDENTES

1.1 Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs)

1.1.1 Estructura y propiedades

1.1.2 Fuentes

1.1.3 Toxicología de HAP's

1.1.4 Límites máximos permisibles para HAPs

1.1.4 Remoción de HAPs

1.1.4.1 Métodos generales

1.1.4.2 Métodos con microorganismos

1.2 Microalgas

1.2.1 Características generales

1.2.2 Especies manejadas

1.3 Inmovilización

1.3.1 Inmovilización pasiva

1.3.2 Inmovilización activa

1.3.3 Inmovilización en alginato de calcio

1.3.4. Degradación de contaminantes orgánicos por microorganismos inmovilizados

1.4 Determinación de HAP's en muestras acuosas

1.4.1 Extracción de HAPs reportados en la literatura

1.5. Cromatografía de líquidos

Principios y parámetros generales

1.5.1 Parámetros generales

Cromatografía de fase reversa (inversa):

1.5.2 Extracción con adsorbentes

A.- Extracción en fase sólida

B.- Dispersión de Matriz de Fase Sólida

Capítulo 2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2 Material

2.3 Reactivos y disolventes

2.4 Figura general de trabajo:

2.5 Metodología analítica

2.5.1 Selección de longitud de onda

2.5.2 Extracción en fase sólida (EFS)

2.5.3 Dispersión de Matriz de Fase Sólida (DMFS)

2.6 Microorganismos

2.7 Formación de perlas de alginato

2.8 Optimización del disco

2.8.1 Tamaño

2.8.2 Solidez y transparencia

2.8.3 Inmovilización de microalgas y pruebas de viabilidad

2.8.4 Agitación y tamaño de matraz para la incubación

2.9. Preparación de discos

2.10 Bioensayos de exposición

2.11 Bioensayos de exposición en matraces

2.12 Bioensayos de exposición en columna estática

2.13 Bioensayos de columna con flujo en recirculación

Capítulo 3. RESULTADOS

3.1 Metodología analítica

3.5.1 Selección de longitud de onda

3.5.2 Extracción de los HAP

3.5.3 EFS

3.5.4 DMFS

3.6. Microorganismos

3.8 Optimización del disco

3.8.1 Tamaño

3.8.2 Solidez y transparencia

3.8.3 Inmovilización de microalgas y pruebas de viabilidad

3.8.4 Agitación y tamaño de matraz para la incubación

3.11 Bioensayos en matraz.

3.11.1 Ensayos preliminares de exposición con perlas y discos

3.12 Bioensayos de exposición en columna estática

3.13 Bioensayos de columna con flujo en recirculación

Capítulo 4. CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA

ANEXO 1 Pruebas estadísticas

ANEXO 2 Datos crudos

Índice de tablas y figuras.

Tabla 1.1 Propiedades del Benzo(a)pireno y del Benzo(a)antraceno

Tabla 1.1.3 Número CAS (“ChemicalAbstractService”) para HAP’s clasificados por la EPA (Environmental Protection Agency) como peligrosos.

Tabla 1.1.4. Tabla de límites máximos permisibles de HAP’s en la NOM (Norma Oficial Mexicana) 138

Tabla 1.4.1 Técnicas y análisis de HAP’s utilizando microorganismos.

Figura .1.5 Esquema de los componentes de CLAR

Figura 1.5.3.A Fases en el proceso de extracción en fase sólida

Figura 1.4.3.B Fases en el proceso de dispersión de matriz de fase sólida

Tabla 1.4.3 Cuadro comparativo para el aislamiento de HAPs por medio de diferentes técnicas en muestras complejas.

Figura. 2.1. Esquema general de trabajo

Tabla 2.6.1. Composición de medio Bristol. Bold (1949), Bischoff & Bold(1963)

Figura 2.6.1. A) Medio líquido *S. acutus* B) Medio líquido *S. capricornutum* C) Medio sólido *S. acutus* D) Medio sólido *S. capricornutum*

Figura 2.9. Proceso para la preparación de discos

Figura 2.12.1. Columna con alambre metálico dentro de un vaso de precipitado para exposición con flujo, la columna tiene capacidad para 74 mL

Figura 2.12.2. Esquema de posiciones y ensayos

Figura 2.13.1 Montaje para los bioensayos de columna con flujo.

Figura 3.1.1 y 3.1.2 Cromatogramas de estándares de los HAP’s estudiados. A) BaP B) BaA

Figura 3.3 Espectros UV de los HAPs estudiados a 1 mg/L.

Tabla 3.5.2. Límite de detección y límite de cuantificación obtenidos durante el presente trabajo y por León-Santiago (2016) para BaA y BaP.

Figura 3.6 Curva de crecimiento de *Selenastrum capricornutum* Printz 1914 y *Scenedesmus acutus* Meyen a 21 días.

Tabla 3.8.1 Optimización de tamaño de los discos de alginato

Tabla 3.8.2 Optimización de solidez

Tabla 3.8.3.1 Pruebas de crecimiento

Tabla 3.8.3.2 Pruebas de viabilidad.

Tabla 3.8.4 Observaciones de las pruebas con variación de la agitación y tipo de recipiente.

Figura 3.11.1 Porcentaje de remoción de medio líquido por EFS (a) y recuperación para biomasa por DMFS (b) para *S. capricornutum* para la comparación de tipos de inmovilización previo a la optimización del disco.

Figura 3.11.2. Porcentaje de remoción de medio líquido por EFS (a) y recuperación para biomasa por DMFS (b) para *S. acutus* para la comparación de tipos de inmovilización previo a la optimización del disco. Se trabajó por triplicado

Figura 3.11.1 Porcentajes de a. remoción en el agua potable de BaP

Figura 3.11.2 Porcentajes de a. remoción en el agua potable de BaA

Tabla 3.11.3 Remoción porcentual de los HAP's a 15 h en ensayos en matraz para ambas especies algales trabajadas a diferentes cantidades de células algales.

Figura 3.12.1. Porcentajes de a. remoción en el agua potable de BaP

Figura 3.12.2. Porcentajes de a. remoción en el agua potable de BaA

Figura 3.13.1 Porcentajes de a. remoción en el agua potable de BaP

Figura 3.13.2 Porcentajes de a. remoción en el agua potable de BaA

Tabla 3.13 Comparación de ensayos con flujo y sin flujo

Abreviaturas

ACN	Acetonitrilo
HAP	Hydrocarburo aromático policíclico
USEPA	Protección ambiental de Estados Unidos
BaP	Benzo(a)pireno
BaA	Benzo(a)antraceno
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
EFS	Extracción en fase sólida
DMFS	Dispersión en matriz de fase solida
WHO	World Health Organization, Organización Mundial de la Salud
Vis	Visible
CYP	Citocromo P-450
CAS	Chemical Abstract Service
OSHA	Occupational Safety and Health Administration
SEMARNAT	Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales
CONAGUA	Comisión Nacional del Agua
NOM	Norma Oficial Mexicana
EPD	Extracción por disolventes
AU	Asistida por ultrasonido
ELL	Extracción líquido- líquido
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
UV	Ultravioleta
CG	Cromatografía de gases
DCE	Detector de captura de electrones

EM	Espectrómetro de masas
DIF	Detector de ionización de flama
CF	Colector de fracciones
ECL	Espectrómetro de centelleo líquido

Introducción

Los HAPs (Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos) son un grupo de moléculas orgánicas con dos o más anillos bencílicos fusionados formados como consecuencia de combustiones incompletas. Se producen cantidades masivas de HAPs en actividades industriales, tales como la refinación de petróleo o la utilización de combustibles fósiles. Debido a su persistencia, toxicidad, bioacumulación, carcinogenicidad y potencial mutagénico es necesario removerlos del agua (Advaiti et al, 2013). La Agencia de Protección ambiental de Estados Unidos (USEPA por sus siglas en inglés) ha incluido a 16 HAPs en su lista de contaminantes prioritarios entre los cuales se encuentra el Benzo(a)pireno (BaP) y el Benzo(a)antraceno (BaA) (USEPA, 2008).

Cuando los HAPs se encuentran en el medio ambiente pueden seguir múltiples procesos: volatilización, foto-oxidación, oxidación química, adsorción sobre las partículas del suelo y degradación microbiana. La bio-remoción con microorganismos es una opción ecológica y efectiva que puede deberse a la adsorción del contaminante a las células o a la degradación enzimática (Rubio-Clemente, *et al.*, 2014). Para aplicarla, algunos microorganismos como las microalgas, *Scenedesmus acutus* y *Selenastrum capricornutum* pueden ser inmovilizados en alginato, un polímero natural que les otorga protección del medio externo hacia cambios fisicoquímicos extremos o depredación por zooplancton agresivo, así como también les permite la difusión de nutrientes u otros compuestos como el o los mismos contaminantes en estudio (Cassidy, 1996). Otra de las ventajas de realizar la inmovilización de las microalgas es que se puede remediar un medio acuoso contaminado por HAPs, logrando posteriormente recuperar fácilmente la biomasa algal (Bernal-Toris, 2015). Para poder medir la concentración de BaP y BaA se puede utilizar la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución llamada (CLAR) y para el aislamiento de los analitos de los cultivos acuosos se puede usar la extracción en fase sólida (EFS) y la dispersión de matriz en fase sólida (DMFS). La EFS es una técnica de extracción que usa una fase sólida y una líquida para aislar analitos afines a la fase sólida presentes

en una disolución. La EFS es usada para purificar una muestra antes de realizar un análisis cromatográfico o de cualquier otro tipo. El procedimiento general de la EFS es pasar la muestra líquida por un adsorbente que se encuentra empacado en una columna de vidrio o plástico, la cual tiene un tapón poroso en la parte inferior; a esta columna se le hacen pasar disolventes de fuerza eluyente creciente, para primero eliminar interferentes y después recuperar al analito de interés (Żwir-Ferenc & Biziuk, 2006). Por otra parte, la técnica llamada DMFS, consiste en colocar muestra sólida en un mortero de ágata que contiene una fase sólida, comúnmente C18, y utilizando un pistilo de ágata realizar la dispersión de la muestra en el adsorbente. El material mezclado es transferido y empacado en una columna para la posterior aplicación de disolventes que permiten “limpiar” la muestra de compuestos interferentes y después recuperar el analito de interés que también queda retenido (Barker, 2006). La EFS y la DMFS pueden utilizarse para manejar la extracción de HAPs como el BaP y el BaA de un medio de cultivo líquido algal y de la biomasa misma, respectivamente. Por otra parte, para efectuar la remoción de contaminantes de medios acuosos, usualmente se han usado microalgas inmovilizadas en alginato en forma de cuentas o perlas. Lo anterior es debido a la simplicidad de su creación y manejo. En el presente trabajo se consideró que esta forma presenta geoméricamente una menor área expuesta por volumen a comparación con un disco, por lo que la forma de disco podría ser más fácilmente manipulable para empacar una columna. El flujo que atraviesa a los discos en la columna, podría ser más homogéneo que el que se tendría en una columna con cuentas. Por estas razones, se evaluó el desempeño de una columna que contiene discos con microalgas en la remoción de BaA y BaP de agua potable.

Objetivos

General

- Diseñar y evaluar una columna con recirculación o sin ella para la remoción de Benzo(a)Pireno y Benzo(a)Antraceno en medio acuoso, por medio de las microalgas *Selenastrum capricornutum* y *Scenedesmus acutus* inmovilizadas en discos de alginato.

Particulares

- Realizar ensayos para la comparación de capacidad de remoción de discos vs. perlas, con o sin algas.
- Establecer las condiciones para inmovilización en discos de las algas *S.capricornutum* y *S.acutus* con el propósito de asegurar viabilidad celular y máxima resistencia mecánica.
- Comparar las capacidades de remoción de acuerdo a la especie, tiempo de exposición y concentración celular.
- Evaluar la capacidad de remoción de una columna con discos/alga con recirculación y sin recirculación.

Capítulo 1. ANTECEDENTES

1.1 Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos

1.1.1 Estructura y propiedades

Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) son sustancias compuestas de átomos de carbono e hidrógeno que forman por lo menos 2 anillos aromáticos fusionados (CCME, 2010). Se dividen en 2 categorías: Los de bajo peso molecular, constituidos por menos de 4 anillos y los de alto peso molecular, formados por 4 anillos o más. Los HAPs puros son compuestos coloreados, usualmente amarillentos, y sólidos cristalinos a temperatura ambiente. (WHO, 2010)

Las propiedades físicas de los HAPs varían con su peso molecular y su estructura. (Akyuzand & Cabuk, 2010). Son altamente lipofílicos y por ende miscibles en solventes orgánicos. Su solubilidad acuosa desciende por cada anillo aromático que es añadido a la estructura. Presentan propiedades como sensibilidad a la luz, resistencia al calor, conductividad, resistencia a la corrosión y acción fisiológica (WHO, 2010). Los HAPs suelen tener un espectro característico en la región UV. Como cada anillo tiene una espectro UV único, cada isómero exhibe un espectro de absorción único lo cual es apoyo para una identificación (Ki-HyunK *et al.*, 2013).

A continuación, se presenta en la Tabla 1.1, algunas propiedades fisicoquímicas de los HAPs utilizados en este trabajo (WHO, 2010).

Tabla 1.1 Propiedades físico-químicas de Benzo(a)pireno y Benzo(a)antraceno

Compuesto	#CAS	Presión de vapor a 25°C Pa	Punto de ebullición (°C)	Fórmula	Peso molecular (u)	Log Kow	Solubilidad a 25 ° C (g/mL)
Benzo(a)pireno	50-32-8	6.52×10^{-7}	435	C ₂₀ H ₁₂	252.31	6.05	3.8×10^{-3}
Benzo(a)antraceno	56-55-3	6.52×10^{-7}	493–496	C ₁₈ H ₁₂	228.29	5.61	0.01

1.1.2 Fuentes

Las propiedades fisicoquímicas de los HAPs hacen que su movimiento en el ambiente sea extremadamente fácil, permitiéndoles distribuirse por aire, tierra y cuerpos de agua, en donde su presencia es ubicua (Baklanov *et al.*, 2007).

Los HAPs ocurren en el ambiente en formas complejas de múltiples componentes (Petit, 1996). Han recibido mucha atención debido a su potencial tóxico, mutagénicos y carcinogénico. (Ning Qin *et al.*, 2014). Son formados durante la descomposición de moléculas orgánicas y su subsecuente recombinación en combustiones incompletas a alta temperatura (500-800 °C) o a temperaturas bajas (100-300°C) durante largos periodos de tiempo (Haritash & Kaushik, 2009).

La ocurrencia de HAPs en la tierra y sedimento suele estar relacionada con la combustión de materia orgánica. Por ejemplo fuentes de HAPs, derrames de petróleo (Short *et al.*, 2007), el uso y desecho inapropiado de aceite para motor, los sitios industriales contaminados como son las plantas de gas, los puntos de tratamiento de madera con creosota (Murphy & Brown, 2005), y la producción de aluminio o producción de acero (Achten & Hofmann, 2009)

Las principales fuentes antropogénicas de HAPs son plantas de energía y el calentamiento de viviendas que son responsables de un 51% de su presencia en el ambiente; la incineración de materia orgánica y combustiones al aire libre son responsables del 28%; la industria en general (aluminio, acero, gas y petróleo) produce el 20% y el transporte es responsable del 0.9% (Landrum *et al.*, 1984).

A partir de 2004 los procesos industriales y extracción de combustibles fósiles forman un poco mas de una cuarta parte de la producción global de HAPs, uno de los países que mayor contribuye a este proceso son los Estados Unidos. (Ramesh, A *et al.* ,2011)

1.1.3 Toxicología de HAP.

El descubrimiento del potencial carcinogénico del BaP y BaA entre otros HAPs a mediados de los años treinta del siglo pasado marcó el inicio de una nueva era en la investigación biológica que busca determinar la causa y naturaleza de la enfermedad que estos compuestos causan a los mamíferos.

La absorción de HAPs en los organismos es resultado de la difusión pasiva de dichos componentes a través de las membranas celulares, atribuida a la naturaleza no polar de los HAPs y a la lipofilicidad que comparten HAPs y membranas lipídicas. Sin embargo, aunque los HAPs tienen una naturaleza no específica en su absorción, su distribución sí parece ser específica. Basándonos en las diferencias generales en la distribución de tejidos, se puede esperar que la toxicidad varíe según la capacidad de los tejidos de metabolizar y detoxificar a los HAPs. Por ejemplo, exposiciones acuáticas idénticas con el pez *Rasboradaniconius* a naftaleno y antraceno revelaron que el naftaleno se acumula casi exclusivamente en el intestino mientras que el antraceno se acumuló en hígado y riñones (Gauthier *et al.*, 2014). Basándonos en las diferencia generales en la distribución de tejido, se puede esperar que la toxicidad de HAPs se fundamentara en la capacidad de estos tejidos para metabolizarlos y detoxificarlos.

La toxicidad de HAPs es atribuida al metabolismo del compuesto inicial, que genera compuestos genotóxicos, carcinogénicos y reactivos a otros metabolitos oxigenados. Esto es comúnmente mediado por la súper familia de las monooxigenasas, citocromo P450 (CYP). Al ser enzimas de fase 1, la CYP funcionaliza a los HAP (por ejemplo por hidroxilación), permitiendo modificaciones posteriores por otras enzimas fase 1 o 2 que tienen como objetivo hacer más soluble y fácil de excretar al metabolito de HAP.

En general, la carcinogénesis efectuada por los metabolitos resultantes de CYP es la manera más reconocida por la cual los HAPs tienen un efecto tóxico (Gauthier

et al., 2014). Los metabolitos reactivos de algunos HAPs se han vuelto de mayor importancia debido a su potencial para unirse a las proteínas celulares y al mismo ADN, aún en presencia de HAPs no metabolizados, teniendo como resultado una disrupción bioquímica y un daño celular que puede llevar a mutaciones, al desarrollo de malformaciones, tumores y cáncer. Existe evidencia de que la mezcla de múltiples HAPs puede tener mayor potencial carcinogénico en humanos que los HAPs individuales (Szu-Chich & Chung-Min, 2004).

De acuerdo con la Agencia de Protección Ambiental (EPA) de Estados Unidos, en su Programa Nacional para la Reducción de Desperdicios, se define al grupo a los HAPs de la Tabla 1.1.3 como residuos peligrosos debido a su potencial teratogénico, tumoral y tóxico (EPA, 2008).

A continuación, se presenta una tabla que contiene los HAP's clasificados por la EPA como peligrosos siendo identificados por su nombre y su número "Chemical Abstract Service" (CAS)

Tabla 1.1.3 Número CAS para HAP's clasificados por EPA como peligrosos.

#	Nombre	#CAS
1	Benzo(a)antraceno	56-55-3
2	Benzo(a)fenantreno	218-01-9
3	Benzo(a)pireno	50-32-8
4	Benzo(b)floranteno	205-99-2
5	Benzo(j)fluoranteno	205-82-3
6	Benzo(k)fluoranteno	207-08-9
7	Benzo(j,k)fluoreno	206-44-0
8	Benzo(r,s,t)pentafeno	189-55-9
9	Dibenzo(a,h)acridina	226-36-8
10	Dibenzo(a,j)acridina	224-42-0
11	Dibenzo(a,h)antraceno	53-70-3
12	Dibenzo(a,e)fluroantreno	5385-75-1
13	Dibenzo(a,e)pireno	192-65-4
14	Dibenzo(a,h)pireno	189-64-0
15	Dibenzo(a,l)pireno	191-30-0
16	H - Dibenzo (c, g) - carbazol	194-59-2
17	7,12-Dimetilbenz(a)antraceno	57-97-6
18	Indeno(1,2,3-cd)pireno	193-39-5
19	3-Metilcolantreno	56-49-5
20	5-Metilcriseno	3697-24-3
21	1-Nitropireno	5522-43-0

1.1.4 Límites máximos permisibles para HAPs

Los límites máximos permisibles cambian de acuerdo con la agencia regulatoria. La OSHA (Occupational Safety and Health Administration) de los Estados Unidos Norteamericanos marcan que en el ambiente de trabajo no se puede superar un contenido de 0.2 mg/m³ de BaP. La EPA provee 2 límites para agua de consumo

humano, uno al cual no se esperan daños a la salud del ser humano, y un segundo que es la máxima cantidad permisible. El primero es de 0 mg/L y el segundo tiene un valor de 0.0002 mg/L.

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 que de acuerdo al uso de suelo y al hidrocarburo se tendrán diferentes límites, como puede verse en la tabla 1.1.4, en donde hay que notar que se incluyen a los dos compuestos en estudio de este trabajo.

Tabla 1.1.4. Tabla de límites máximos permisibles de HAP’s en la NOM 138.

Hidrocarburos específicos.	Uso del suelo predominante (mg/kg) Base seca.		
	Agrícola, forestal, pecuario y de conservación.	Residencial y Recreativo.	Industrial y comercial.
Benceno	6	6	15
Tolueno	40	40	100
Etilbenceno	10	10	25
Xilenos (suma de isómeros)	40	40	100
Benzo[a]pireno	2	2	10
Dibenzo[a,h]antraceno	2	2	10
Benzo[a]antraceno	2	2	10
Benzo[b]fluoranteno	2	2	10
Benzo[k]fluoranteno	8	8	80
Indeno (1,2,3-cd)pireno	2	2	10

Por otro lado la “Ley Federal de Derecho/Disposiciones Aplicables en Materia de Agua Nacionales” expedida por la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) y la Comisión Nacional del Agua (CONAGUA) menciona que para los hidrocarburos aromáticos policíclicos presentes en agua para uso público urbano se tiene como límite la concentración de 0.0001 mg/L y para aguas costeras y estuarios el límite es de 0.1 mg/L.

1.1.4 Remoción de HAPs

Los HAPs son contaminantes ambientalmente ubicuos, que se encuentran en aire, tierra y ambientes acuáticos. Los HAPs con altos pesos moleculares son altamente lipofílicos y químicamente estables. La vida media de ciertos HAPs, incluyendo alfluirantreno, pireno, BaA, queroseno, BaP, Benzo(k)fluorantreno y

dibenzo(a,h)antraceno, se encuentran en el rango de 1000-3000 h en ambientes acuáticos. La presencia de HAPs recalcitrantes en agua posee un riesgo a los organismos acuáticos y a la salud humana. Su alta estabilidad también resulta en la bioacumulación y biomagnificación de agentes tóxicos por la cadena alimenticia. (Lijuan *et al.*, 2014)

1.1.4.1 Métodos generales

La remoción de HAPs del ambiente puede ser llevada a cabo por métodos físicos, biológicos y químicos. En el caso de la remoción de HAPs de sistemas acuosos, procesos físicos como la volatilización y adsorción tienen un importante rol ya que reducen de manera importante la cantidad de HAPs.

Sin embargo, los procesos físicos no resuelven el problema ya que no tienen la capacidad de degradar a los contaminantes. Por esta razón se prefieren métodos biológicos y químicos. Como procesos químicos se pueden mencionar los de ozonización, fotólisis, oxidación, radiación ultravioleta y las reacciones con hidróxido (Rubio-Clemente *et al.*, 2014). Los métodos biológicos utilizan comúnmente a microorganismos y como conciernen a este trabajo, se describen con mayor detalle a continuación.

1.1.4.2 Métodos con microorganismos

La remoción de HAPs del ambiente por degradación microbiana es una de las herramientas más prometedoras de acuerdo con la gran profundidad de su estudio. La biodegradación es un proceso natural que ayuda a remover HAPs del medioambiente utilizando microorganismos. Es uno de los métodos más económicos entre los diferentes procesos de remediación. La biorremediación ha demostrado ser efectiva en limpiar suelos con HAPs de alto peso molecular.

El tratamiento biológico depende del metabolismo de los microorganismos, los cuales descomponen a los contaminantes. Esto se logra proveyendo las condiciones adecuadas como agua, aire y nutrientes; también por bioestimulación

(adiciones de un agente de carga como sería aserrín o nutrientes como nitrógeno fósforo y potasio) o bioaumentación (usualmente un inóculo de microorganismos cuya capacidad transformadora del contaminante es conocida) del ambiente contaminado.

Condiciones no favorables en el ambiente generalmente pueden causar variabilidad en la aplicación de la biorremediación, por lo tanto el entender las condiciones del sitio ayudara a optimizar la biorremediación y subsecuentemente llevar a resultados más efectivos (Gupta, *et al.*, 2015).

Los microorganismos como bacterias y hongos pueden transformar el núcleo aromático de los HAPs. Las bacterias inicialmente oxidan los HAPs con dioxigenasas que incorporan dos átomos de oxígeno molecular para formar un dihidrodiol con una configuración cis. Se continúa la oxidación de dichos cis dihidrodioles hasta la formación de catecol que a su vez es un substrato para otra di-oxigenasa que lleva acabo la fisión del anillo aromático. Para el caso de los hongos se oxidan los HAPs a epóxidos por medio de enzimas del complejo del citocromo P-450, el cual incluye una mono-oxigenasa, y posteriormente con una epóxido hidrolasa dando como resultado trans di-hidrodiol (Cerniglia, 1984). Los mecanismos de degradación de HAPs por las microalgas no están bien elucidados y no se han identificado sus sistemas enzimáticos involucrados, aunque sí se conocen algunas especies que son capaces de degradar a los HAPs (Cerniglia, 1992).

1.2 Microalgas

1.2.1 Características generales

Las algas son organismos fotótrofos que contienen cloroplastos y pueden vivir en medios naturales a expensas de unos cuantos minerales (como K, P, Mg y N), agua, CO₂ y luz. Las algas habitan suelos y medios acuáticos, y constituyen los productores primarios de oxígeno más importantes de la naturaleza. La mayoría presenta pared celular con base en carbonato síliceo o sílice. Su color varía, y las

hay verdes, rojas, amarillas y cafés. De las tres últimas, su color se debe a los pigmentos accesorios, que le dan esa característica a las algas para poder atrapar la luz solar a distintas profundidades.

Las algas pueden ser pluricelulares o unicelulares. Estas últimas se presentan con mayor frecuencia en el agua, especialmente en el plancton. El fitoplancton es la población de microorganismos que flotan libremente compuesta principalmente por algas unicelulares.

De acuerdo con el esquema de Whittaker (Hagen.,2012), las algas se clasifican en siete divisiones, de los cuales cinco son considerados en el reino Protista y dos en el reino Plantae. La clorofila y otros pigmentos se producen en los cloroplastos, que contienen las membranas conocidas como tilacoides. La función de la clorofila es el generar energía a partir de las incidencias de luz sobre la planta.

La reproducción de las algas se produce tanto en forma asexual y sexual. La reproducción asexual se produce a través de la fragmentación de las algas filamentosas o coloniales y por la formación de esporas (como los hongos). La formación de esporas se lleva a cabo por mitosis. La fisión binaria también es llevada a cabo (similar a las bacterias).

Durante la reproducción sexual, las formas diferenciadas de las algas se fusionan para producir un cigoto diploide con dos juegos de cromosomas. El cigoto se convierte en una espora sexual que germina cuando las condiciones son favorables para reproducirse, y termina con un organismo haploide el cual tiene un único conjunto de cromosomas (Madigan, 2009).

1.2.2 Especies manejadas

Selenastrum capricornutum es una alga verde (clorofita) unicelular con forma de media luna encontrada ubicuamente que se puede cultivar fácilmente en agua dulce (Wang, Li, et al., 2013). *Selenastrum capricornutum* también es conocida como *Pseudokirchneriella subcapitata*. De la clase *Chlorophyceae*, orden *Sphaeropleales*, familia *Selenastraceae*, género *Selenastrum*.

S. capricornutum es una alga verde (clorofita) unicelular con forma de media luna y un volumen aproximado de entre 40 y 60 μm^3 , que puede encontrarse en sistemas acuáticos epicontinentales eutróficos u oligotróficos (Pica *et al.*, 2004).

Scenedesmus acutus, es un alga verde unicelular que se puede encontrar en múltiples ambientes acuáticos y tiene la característica de ser muy resistente. Suele tener colonias planas y lineales de 4, 8 o 16 células creciendo en agua dulce o salobre. El alga muestra rápido crecimiento y es fácil de cultivar. El uso de *S. acutus* como modelo de experimentación para medir diferentes niveles de toxicidad en agua tiene como ventaja que el alga es ubicua y resistente a los contaminantes. De la clase *Chlorophyceae*, orden *Sphaeropleales*, familia *Scenedesmaceae*, género *Scenedesmus*. Vale la pena mencionar que no suelen tener densidades poblacionales altas en su medio natural.

Algunas especies algales son heterotróficas cuando se trata de su fuente de carbono. Una manera de investigar la biodegradación de contaminantes orgánicos es alentar a las algas a crecer en presencia del contaminante (Kirk *et al.*, 1999)

Cerniglia (1992) demostró que 18 especies algales de diferentes grupos taxonómicos, incluidas cianobacterias, diatomeas, algas verdes, rojas y cafés tienen la capacidad de metabolizar el naftaleno (0.1%-2.4%). *Agmenellum quadruplicatum* PR-6 ha podido degradar el 2.4% de fenantreno añadido al medio. Se reportó que 6 especies, *Chlamydomona* ssp., *Chlorellaminiata*, *Scenedesmus platydiscus*, *Scenedesmus quadricauda*, *Selenastrum capricornutum* y *Synechocystis* ssp. pudieron degradar del 34% al 100% de pireno a una concentración de 0.1 mg/L en 7 días. *Selenastrum capricornutum*, *Anabaena flosaquae*, *Ankistrodes musbraunii*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Euglena gracilis*, *Ochromonas malhamensis* y *Scenedesmus acutus* demostraron la capacidad de remover BaP a diferentes niveles.

La remoción de HAPs por microalgas es específica de la especie ya que diferentes especies tienen diferentes composiciones en su pared celular, tamaño celular y mecanismo de degradación. El rendimiento de remoción y degradación suele ser afectado por la concentración algal, ya que a mayor biomasa provee

más superficie celular, volúmenes y enzimas para la degradación, aunque si la biomasa resulta demasiado alta, las células podrían generar agregados, llevando a la reducción de la efectividad de absorción y adsorción. Si la concentración algal llega a ser extremadamente alta se tendrá competencia por nutrientes y luz, además de un problema al querer realizar un mezclado efectivo para la distribución de nutrientes y contaminantes; todo lo anteriormente mencionado restringirá el crecimiento celular y la capacidad de este de tomar y degradar a los contaminantes (León, 2016).

Warshawsky *et al.* (1995) encontraron que *Selenastrum capricornutum*, un alga verde de agua dulce, metaboliza el BaP a cis-dihidrodiol sugiriendo que se usa el sistema enzimático dioxigenasa como el que se ha encontrado en procariontes heterotróficos. En otro estudio se observó que *S. capricornutum* producía 11,12-dihidrodiol bajo luz amarilla y 9,10-dihidrodiol bajo luz blanca. El estudio también concluyó que solamente las algas verdes pueden metabolizar el BaP a dihidrodiol, mientras que las algas amarillas y verde-azules fallaron en metabolizar a los HAPs (Haritash, 2009).

También se encontró que solamente las microalgas verdes, *Selenastrum capricornutum*, *Scenedesmus acutus* y *Ankistrodesmus braunii* tienen la capacidad de metabolizar casi completamente a el BaP a dihidrodiol. (Dijkman *et al.*, 1996).

García de Llasera *et al.*, (2016) llega a observar completa remoción de BaP con *S. acutus* a las 72 horas y para *S. capricornutum* observa una remoción del 100% al pasar 15 h. Para el BaP se encuentran 3 metabolitos a 24 horas, el 4,5-dBaP al 19%, 8-dBaP al 5% y 9,10-dBaP al 5% en relación al BaP inicial. Por otra parte, se encuentran metabolitos al degradar el BaA durante 48 h con niveles de 20% para el 5,6-dBaA y de 67% de 8,9-dBaA/10,11-dBaA en relación con el BaA inicial. (García de Llasera y García-Cicourel, 2017)

1.3 Inmovilización

Numerosas especies microbianas han sido inmovilizadas en diversas matrices para diferentes aplicaciones. Algunas especies de hongos se han inmovilizado para el control biológico y la biodegradación. Las microalgas han sido inmovilizadas para la eliminación de contaminantes de aguas residuales como secuestradores de metales y remoción de nutrientes. Se ha estudiado la absorción de metales y compuestos tóxicos por bacterias inmovilizadas (Cassidy, 1996).

La inmovilización de células se definió como "el confinamiento físico o localización de las células intactas en una región específica con la preservación de alguna actividad catalítica deseada" (Karel *et al.*, 1985; Kourkoutas *et al.*, 2004).

Una célula inmovilizada se define como una célula viva que, por medios naturales o artificiales, está impedida para moverse independientemente de su ubicación original a todas las partes de una fase acuosa de un sistema (Tampion, 1987; De Bashan, 2010).

1.3.1 Inmovilización pasiva

La inmovilización a menudo imita lo que se produce naturalmente cuando las células crecen en superficies o en las estructuras naturales. Muchos microorganismos poseen la capacidad de adherirse a diferentes tipos de superficies en la naturaleza (Kourkoutas *et al.*, 2004).

Los materiales adsorbentes (portadores) para la inmovilización pasiva pueden ser naturales o sintéticos. Con respecto a los portadores naturales, recientemente se han realizado estudios que implican el uso de lufa, mejor conocido como zacate en México. La esponja se obtiene a partir de frutos secos después de quitar el tejido del pericarpio. Este portador no es tóxico ni es reactivo, es barato, mecánicamente fuerte y estable en cultivos a largo plazo. Un problema en las investigaciones que involucran la lufa como portador de biomasa es la repetibilidad. La estructura del esqueleto de frutas varía de una planta a otra en función de las condiciones de cultivo: cada esponja lufa tiene diferente estructura (Moreno-Garrido *et al.*, 2006).

1.3.2 Inmovilización activa

En contraste con los métodos pasivos, los métodos activos no dependen de la habilidad de las células para adherirse a las superficies; se usan técnicas específicas que han sido desarrolladas para atrapar o encapsular células, se encuentren vivas o no. Por ejemplo, se utilizan polímeros sintéticos, poliuretano, polisulfona, alcohol polivinílico, resina epóxica, agentes gelificantes naturales, proteínas, agar, carragenano y alginato.

1.3.3 Inmovilización en alginato de calcio

El alginato de calcio es el material de inmovilización más utilizado para las especies microalgales, ya sean de agua dulce o salada. La inmovilización en alginato de calcio no restringe de manera importante la intensidad de la luz necesaria para el crecimiento de los organismos; los componentes del soporte tienen baja toxicidad, el metabolismo de las células no se ve afectado, se puede notar que este proceso de inmovilización tiene múltiples ventajas.

Los alginatos son polímeros lineales sin ramificaciones que contienen Ácido D-manurónico unido a β - (1 \rightarrow 4) y restos de ácido L-gulurónico ligados con α - (1 \rightarrow 4). Es un componente estructural de las algas marrones (Phaeophyceae), y es extraído sobre todo de los géneros *Macrocystis* y *Laminaria*.

Los alginatos de diferentes especies pueden variar en el porcentaje de las sustancias que componen a cada polímero. Esto tiene implicaciones sobre las propiedades físicas del alginato. Los alginatos también se pueden encontrar en bacterias. *Pseudomonas aeruginosa* aumenta su producción de alginato en presencia de cobre, ya que existe una importante afinidad química con este metal y otros cationes divalentes.

El alginato es usualmente vendido como una sal de sodio. Cuando este es disuelto en agua y se añade un catión divalente, el catión substituye al sodio y permite que ocurra la gelificación. Normalmente el alginato de sodio se disuelve en agua alrededor de 1.5 a 3.5 % (masa/volumen), mezclado con una suspensión de células viables o no. Esta mezcla se deja caer en una solución de CaCl_2 con

concentraciones de 4 a 2%. La gelificación externa es instantánea, pero el endurecimiento continúa durante 30 a 40 minutos. Cuando el alginato es disuelto en agua suele haber formación de múltiples burbujas. Para evitar esto se puede someter al alginato a vacío (por ejemplo en un kitazato) previo a la adición de las células o dejar reposar durante 1 hora para su desaireación.

Cuando se necesite un recuento de las células inmovilizadas, se puede redissolver al alginato en volúmenes conocidos de citrato de sodio. Las células inmovilizadas pueden ser utilizadas en pruebas *in situ*. Cuando se desea medir la toxicidad, dos problemas deben ser tomados en cuenta. El primero es la adición de los compuestos tóxicos al alginato (especialmente metales), lo cual implica un rápido descenso de los compuestos libres; la medición de las concentraciones en alginato deben ser llevadas a cabo para que la prueba sea válida. El segundo, la difusión de los compuestos tóxicos puede llegar a ser un proceso lento, y por lo tanto las células pueden estar protegidas de los xenobióticos y su toxicidad infravalorada.

Las algas han ido incrementando su uso como biosorbentes, pudiéndose encontrar vivas o muertas. Estos biosorbentes son usualmente utilizados en forma de polvo, lo que introduce problemas prácticos al usarlos continuamente, ya que la separación después del contacto con el agua puede llegar a ser problemática. La inmovilización celular es una técnica atractiva para manipular y recolectar biomasa, ya sea utilizando un soporte de origen natural o sintético.

Las principales ventajas de utilizar la ya mencionada técnica es la retención de la biomasa dentro del ambiente en el cual se trabaja y fácil separación de las células y sus productos metabólicos (Moreno-Garrido *et al.*, 2008)

1.3.4. Degradación de contaminantes orgánicos por microorganismos inmovilizados.

La inmovilización de microalgas en polímeros para el tratamiento de aguas residuales se basa en el principio de mantener las células vivas metabólicamente

activas dentro del gel el mayor tiempo posible. Durante este tiempo tienen movilidad muy limitada. Después de la sorción de los contaminantes por las microalgas, las aguas limpias se difunden fuera de los polímeros y se recogen, y el proceso puede repetirse varias veces.

Las perlas son la forma más común para su aplicación con organismos inmovilizados, se hacen dejando caer poco a poco la mezcla de alginato con microorganismos a través de un pequeño orificio, usando una jeringa o equipo específico diseñado para tal fin enviado por medio de una bomba peristáltica. Generalmente, la resistencia mecánica del polímero final aumenta con el aumento de la concentración de los monómeros (alginato de sodio) y el agente de reticulación utilizado (Ca^{2+}). Con el aumento de la dureza, el tamaño de poro de la perla de alginato de calcio disminuye (De Bashan & Bashan, 2010).

Moreno-Garrido (2005) realizó estudios sobre el crecimiento de las células inmovilizadas y la estabilidad de cuentas de alginato de calcio en un experimento de 17 días con 11 especies de microalgas marinas, encontrando que la estabilidad de las cuentas puede también depender de la especie inmovilizada.

No existen condiciones ideales de inmovilización en alginato de calcio que cumplan con los requerimientos de cada microorganismo. Sin embargo, las propiedades esenciales de todas las cuentas de alginato deben ser alta estabilidad mecánica y química, propiedades de hinchamiento controlables, y bajo contenido de contaminantes tóxicos, pirógenos e inmunogénicos (Smidsrød & Skjak-Braek, 1990).

En la mayoría de los casos, la inmovilización es benéfica para los microorganismos atrapados. Aparte de los efectos positivos directos, tales como evitar depredación por el zooplancton agresivo y reducción de la competencia por los nutrientes con otras especies microbianas, se han registrado varias mejoras en el metabolismo, la función y el comportamiento de las microalgas. La inmovilización en perlas de alginato de las microalgas, *Botryococcus braunii* *Botryococcus protuberans*, produjo un aumento significativo en la clorofila, los

carotenoides y los lípidos durante la fase de crecimiento estacionaria, en comparación con las células de vida libre, y la fotosíntesis en ambas especies se mejoró con respecto a las células libres, la senescencia se retrasó considerablemente. Sin embargo, como inconveniente, se puede decir que la inmovilización o encapsulación de microorganismos en polímeros ejerce una tensión significativa sobre los microorganismos debido a las fuerzas químicas y las interacciones entre la matriz de inmovilización y la pared celular. El confinamiento en un espacio limitado también afecta el metabolismo de los microorganismos. El efecto más notable, detectado hace décadas en bacterias inmovilizadas, es la reducción de la población inmovilizada, en comparación con la población antes de la polimerización (De-Bashan & De-Bashan, 2010).

1.4 Determinación de HAPs en muestras acuosas

En la actualidad existen diversos métodos para el análisis de HAPs en agua. Entre ellos se encuentra la cromatografía de gases acoplada a un detector de masas (Método EPA 8100) o por cromatografía de líquidos acoplada con un detector UV/Vis y/o fluorescencia (Método EPA 8310). Como generalmente las muestras a analizar contienen elementos que contaminan o dificultan la cuantificación de los HAPs, se realizan comúnmente métodos de extracción y separación selectiva (Método EPA 8310).

1.4.1 Extracción de HAPs reportados en la literatura

Debido a los bajos niveles de HAPs presentes continuamente en las muestras, es generalmente necesario hacer un paso de pre-concentración. El más usado es por medio de la extracción en fase sólida (EFS), que ha venido remplazando a la

extracción líquido-líquido clásica. La EFS puede ser llevada a cabo utilizando una variedad de adsorbentes presentados en cartuchos o discos, siendo ambos utilizados para obtener extractos para la determinación de HAPs con técnicas en línea y fuera de línea (El Harrak, 1998). Una fase estacionaria (o adsorbente) C_{18} es la más comúnmente utilizada para la EFS de HAPs, debido a su capacidad para separar una gran variedad de solutos con buena resolución, selectividad y eficiencia. Debido a su baja solubilidad en agua, los HAPs tienden a ser adsorbidos en las paredes y superficies del objeto con el que entran en contacto. Por lo tanto, se debe añadir un solvente a la muestra antes de realizar la EFS, con el objetivo de aumentar la solubilidad del HAP (Kayillo, 2006). Los solventes orgánicos como el metanol, acetonitrilo e isopropanol son algunos de los que se han utilizado teniendo diferentes resultados. El problema principal de agregar disolvente a la muestra aparece cuando se quiere trabajar con analitos de bajo peso molecular y mayor polaridad, los cuales son menos retenidos en el adsorbente o fase estacionaria y se recuperan junto con interferencias en el extracto. Al inyectar estos al cromatógrafo aparece al principio del cromatograma a tiempos de retención similares a los analitos que se buscan. (El Harrak, 1998).

La EFS se utiliza para el manejo de muestras líquidas, pero una variante de esta técnica es la DMFS que maneja muestras sólidas, de manera similar a la EFS con la diferencia de que la muestra es incorporada con el adsorbente formando una fase estacionaria de carácter único (Barker , 2000). Más adelante se darán, con más detalles de estas dos técnicas de extracción con adsorbentes y de la CLAR.

A continuación se presenta la Tabla 1.4.1 con referencias donde se han utilizado diferentes técnicas de extracción y análisis para HAPs.

Tabla 1.4.1 Técnicas y análisis de HAPs utilizando microorganismos.

Autor (año)	Organismo	Analitos	Extracción	Análisis
Borde et al (2003)	Algas (<i>Chlorella sorokiniana</i>) y bacterias	Fenantreno, fenol y salicilato.	EPD	CLAR-UV y CG-DCE
Lindquist y Warshawsky (1985)	Microalga. <i>Selenastrum capricornutum</i>	BaP	ELL	CLAR-UV;EM
Gramss G et al. (1999)	Cultivo de hongos	Fenantreno, antraceno, perileno, pireno	EPD-AU	CLAR-DF
Hong et al (2008)	Algas diatomeas	Fluoranteno y fenantreno	ELL y EPD-AU	CG-EM
Ke et al. (2010)	Algas <i>Selenastrum capricronutum</i>	Fluoreno, fenantreno, fluoranteno y BaP	ELL	CG-EM
Lei (2007)	Microalgas. <i>Chlorella</i> , <i>Scendesmus</i> y <i>Selenastrum</i>	Fluoranteno y pireno	ELL	CG-DIF
Warshawsky (1995)	Múltiples Microalgas	BaP y metabolitos	ELL	CLAR-CF.ECL
Olmos	S.	BaA, BaP,	DMFS,	CLAR

Espejel et al. (2013)	<i>capricornutum</i>	Benzo (b) fluorantreno, Benzo (k) fluorantreno	EFS	
García de Lasera et al. (2016)	<i>Selenastrum capricornutum</i> y <i>Scenedesmus acutus</i>	BaP	DMFS, EFS.	CLAR-UV.
García de Lasera & García Cicourel (2017)	<i>Selenastrum capricornutum</i> y <i>Scenedesmus acutus</i>	BaA	DMFS ,EFS.	CLAR.

*EPD=extracción por disolventes; CLAR-UV: Cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a Ultra Violeta; AU= Asistida por ultrasonido; ELL= Extracción líquido-líquido; CLAR=Cromatografía de líquidos de alta resolución; UV= Detector ultravioleta; CG= Cromatografía de gases; DCE=Detector de captura de electrones EM= Espectrómetro de masas; DIF=Detector de ionización de flama; CF=Colector de fracciones; ECL= Espectrómetro de centelleo líquido; DMFS= Dispersión matriz de fase sólida; EFS= extracción de fase sólida.

1.5. Cromatografía de líquidos

Principios y parámetros generales

La cromatografía de líquidos de alta resolución es una técnica de análisis químico ampliamente utilizada que permite separar físicamente y cuantitativamente los distintos componentes de una solución gracias a la adsorción selectiva de los constituyentes de una mezcla. Consta de dos fases: una fija que suele llamarse fase estacionaria, y una móvil (fase móvil) la cual fluye permanente durante el análisis, y que en este caso es un líquido. (Skoog., 2005).

Un equipo para CLAR puede ser representado esquemáticamente por la siguiente figura:

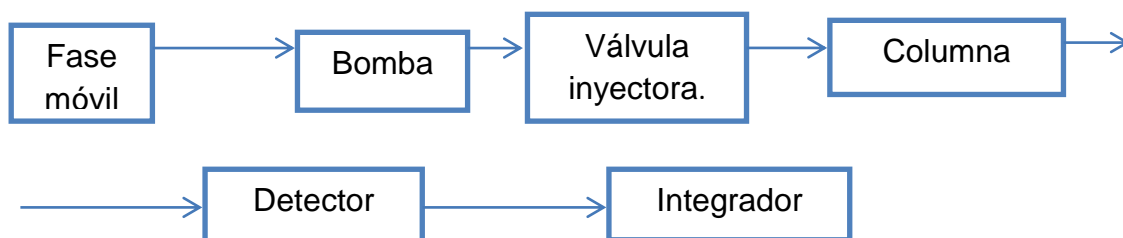


Figura.1.5 Esquema de los componentes de un CLAR

La fase móvil puede ser un disolvente puro o una mezcla de disolventes, algo importante es que deben ser grado cromatográfico, esto implica un 99% o más de pureza para evitar contaminantes que puedan interferir en la elución de la muestra o bien que contengan algunas pequeñas partículas que puedan tapan la columna; por lo que es necesario filtrarlos antes de que entren a la columna. Dependiendo del equipo, cuando se trata de una mezcla de disolventes, se puede o no programar la bomba para que tome las cantidades adecuadas de cada disolvente que se enviará a la columna, o bien, algunas otras bombas (las más antiguas) no tienen la capacidad de realizar esta mezcla y por lo tanto esta se tiene que preparar por el usuario. Aparte cuando la composición de la fase móvil durante toda la separación se mantiene constante, se denomina elución isocrática. En este caso, la bomba envía el disolvente hacia la columna pasando por la válvula inyectora que es una válvula de seis vías que permite introducir la muestra contenida en el “loop” o bucle de volumen calibrado. Luego de que se produzca la separación en la columna, los componentes de la mezcla pasan al detector, el cual da una señal eléctrica proporcional a la cantidad de materia; esta señal es enviada al registrador que a su vez da un cromatograma con picos compuestos con diferente intensidad en función del tiempo, en el cual lo ideal es obtener picos gaussianos los cuales corresponden cada uno a un componente diferente de la muestra. (Snyder, 1992). Cuando la elución es en gradiente, se envía una composición variable de la fase móvil hacia la columna para ir aumentando

gradualmente su fuerza eluyente. Con ello puede conseguirse una mejor resolución de mezclas complejas y rapidez.

Algunos de los detectores más usados en acoplamiento con los cromatógrafos de líquidos son: detectores de absorbancia, detectores de fluorescencia, detectores de índice de refracción, detector de dispersión de luz, detectores electroquímicos, detectores por espectrometría de masas.

El procesamiento de las señales se efectúa por medio de un integrador. El integrador calcula el área de cada pico, la cual se puede relacionar con la concentración del componente si se tiene una curva patrón. Si no se cuenta con ella, sólo sería cualitativa la medición de los analitos. Debido a que los detectores que se usan en estos equipos no son destructivos, es posible recuperar los productos que salen de él, y de esta manera realizar otro tipo de separaciones (por ejemplo) analíticas. El procesamiento de las señales también depende del tamaño del "loop", de la columna y del tipo de bomba (Snyder, 1997).

1.5.1 Parámetros generales

El volumen de fase móvil (o tiempo t_r) necesario para transportar la banda de soluto desde el punto de inyección a través de la columna, hasta el detector, en el punto máximo del pico del soluto, se define como volumen de retención (V_r). El volumen muerto (V_0) representa el volumen que se requiere para el paso de un analito no retenido en la columna, también se le define con unidades de tiempo y es el t_0 o tiempo muerto t_m .

Factor de retención

Antes conocido como factor de capacidad (k'), el factor de retención es un parámetro experimental importante que se utiliza para describir las velocidades de migración de los solutos en columnas. Para el soluto A, el factor de retención, k'_A se define como:

$$k'_A = K_A \cdot V_S / V_M$$

Donde K_A es la constante de distribución del soluto A, V_s es el volumen del soluto en la fase estacionaria y V_m el volumen del soluto en la fase móvil o para calcularse directamente del cromatograma con la fórmula:

$$k' = (t_r - t_0) / t_0$$

Donde t_r es el tiempo de retención y t_0 es el tiempo muerto. (Skoog *et al.*, 2001).

Selectividad

El factor de selectividad α de una columna para dos solutos, A y B, se define como la relación de la constante de distribución del soluto retenido con más fuerza, B, y la constante de distribución del soluto retenido con menos fuerza. Resulta importante mencionar que el factor de selectividad también es la relación entre dos factores de capacidad (k').

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A}$$

Donde k'_B es el factor de la capacidad de la especie retenida con más fuerza, especie B, y k'_A es el factor de capacidad de la especie retenida con menos fuerza, es decir, la especie A, que eluye más rápido. Lo mismo para K de acuerdo con esta definición, α siempre es mayor que la unidad (Skoog *et al.*, 2001).

Eficiencia

La eficiencia de una columna cromatográfica depende del ensanchamiento de la banda cromatográfica que ocurre cuando un compuesto pasa a través de la columna.

La eficiencia de una columna puede determinarse a partir de un pico del cromatograma mediante la siguiente ecuación:

$$N = 5.54(t_R / W_{1/2})^2$$

Donde t_R es el tiempo de retención del pico y $W_{1/2}$ es ancho del pico medido a la mitad de la altura del mismo.

Para las mediciones cuantitativas de la eficiencia de las columnas cromatográficas se emplean dos términos: (1) *altura del plato* H y (2) *cantidad de platos o número de platos teóricos* N. Los dos están relacionados por la ecuación:

$$N=L/H$$

Donde L es la longitud del empaque de la columna (en cm). La eficiencia de las columnas cromatográficas aumenta a medida que es mayor el número de platos N y la altura H es menor. Se observan grandes diferencias en la eficiencia de las columnas como resultado de las diferencias en el tipo de columna y de las fases móvil y estacionaria. En términos de número de platos teóricos, la eficiencia puede variar desde unos centímetros hasta varios cientos de miles. La altura de los platos varía desde unas décimas hasta milésimas de centímetro y son comunes incluso más pequeñas (Skoog et al., 2001).

Resolución

Es una medida cuantitativa de su capacidad para separar dos analitos A y B. La resolución de cada columna y base se puede calcular con la relación:

$$R_s = [k' / (1 + k')] [(\alpha - 1) / \alpha] [(N^{1/2}) / 4]$$

Donde k' es el factor de capacidad, α es el factor de selectividad, N es eficiencia.

Se puede mejorar la resolución para una fase estacionaria determinada alargando la columna, lo que incrementa el número de platos. Sin embargo, una consecuencia adversa de añadir platos es un incremento en el tiempo necesario para la separación de los componentes (Skoog *et al.*, 2001).

Cromatografía de fase reversa (inversa):

Este tipo de cromatografía es la más comúnmente usada y se empleó en el presente trabajo. Por esta razón se describe brevemente a continuación.

La cromatografía de reparto en fase reversa utiliza un empaque enlazado hidrofóbico, usualmente con un grupo funcional octadecilo (C-18) u octilo (C-8) y

una fase móvil polar, frecuentemente una fase móvil polar parcial o totalmente acuosa. Conforme aumenta el carácter hidrofóbico de los solutos, la retención aumenta. El agua es el eluyente más débil. El metanol y el acetonitrilo son disolventes populares porque tienen baja viscosidad y son fáciles de conseguir con excelente pureza. En cromatografía de fase inversa la fuerza de la retención solo se da por la interacción favorable del soluto con la fase estacionaria, sino también por el efecto del disolvente de la fase móvil para forzar al soluto hacia dentro de la capa hidrocarbonada enlazada.

La técnica de fase inversa en sus varias formas es el modo más ampliamente utilizado en CLAR el cual incluye cerca de la mitad de los métodos de cromatografía líquida. Esta técnica es la que probablemente proporcionará retención y selectividad óptimas cuando los compuestos no tienen grupos para enlaces de hidrógeno o no tienen un carácter predominantemente alifático o aromático. El método es muy apropiado para separar solutos con base en el tamaño y estructura de los grupos alquilo. (Skoog., 2005).

1.5.2 Extracción con adsorbentes

A. Extracción en fase sólida

La extracción en fase sólida es una técnica simple para el tratamiento de muestra que consiste en pasar una muestra líquida a través de un sorbente empacado comúnmente en un cartucho. Los analitos o analito a ser determinado en conjunto con sus interferencias son retenidos en el sorbente por diferentes mecanismos. Los analitos son eluidos del sorbente en un pequeño volumen de solvente y por lo tanto son concentrados; la función de la extracción en fase sólida también es la de limpiar la muestra. En el primer caso se pueden manejar directamente muestras líquidas y en un segundo caso los sólidos, gases o líquidos pero usualmente después de haber pasado por otra técnica de tratamiento de muestra. La técnica tiene múltiples ventajas como es su capacidad para hacer pre-concentración, separación y flexibilidad ya que el sorbente y solventes apropiados

pueden ser ajustados dependiendo de las características de la muestra (Marce & Borrull, 2000).

En la figura 1.5.3.A se presentan los pasos generales a seguir durante un proceso de extracción en fase sólida.

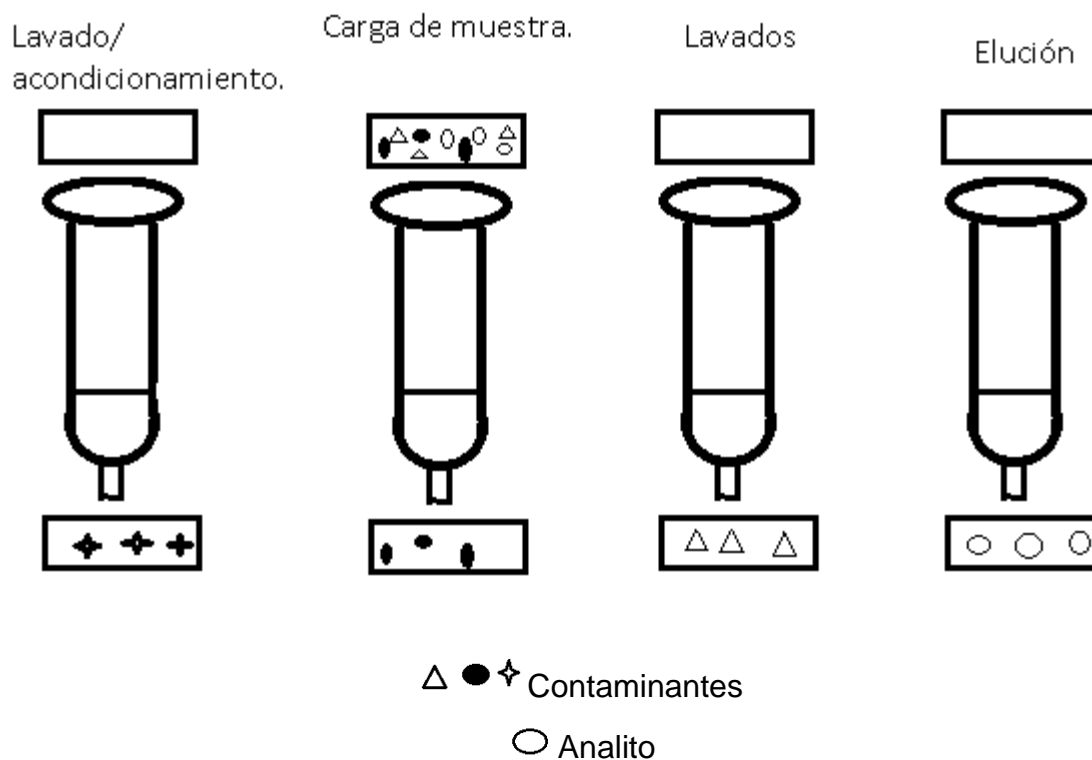


Figura 1.5.2.A Fases en el proceso de extracción en fase sólida

La EFS siempre consiste en 4 pasos sucesivos, como es ilustrado en la Fig. 1.5.3.A. Primero, el sorbente sólido debe ser acondicionado utilizando el solvente adecuado, seguido por el mismo solvente en el que se encuentra la muestra. Este paso es crucial ya que permite “mojar” el material de empaque y la solvatación de los grupos funcionales. Además, esto remueve posibles contaminantes que hayan estado contenidos en el material de empaque o en el sorbente; también remueve aire que podría estar en la columna y llevan el vacío con solvente.

Típicamente para un sorbente de fase reversa (como la sílice C18) se suele utilizar metanol, seguido por agua o un buffer acuoso cuyo pH y fuerza iónica son

similares a la muestra. Se debe tener cuidado en el no permitir que el sorbente se seque en cualquiera de los pasos, de lo contrario los analitos no podrán ser eficientemente recuperados y se obtendrán recobros pobres, en el caso de ocurrir se debe reacondicionar (Camel, 2003).

El segundo caso es el paso de la muestra a través del sorbente. Dependiendo del sistema utilizado, los volúmenes pueden ir de 0.1 mL a 1 L. La muestra puede ser aplicada a la columna por gravedad, bombeo o aspiración por vacío. El flujo por el cual la muestra atraviesa el sorbente debe ser lo suficientemente bajo como para permitir la retención eficiente de los analitos, y lo suficientemente alto para evitar pérdida de tiempo. Durante este paso los analitos se concentran en el sorbente.

El tercer paso es el lavado de interferentes del sorbente sólido con un solvente que tenga la fuerza de elución correcta para eliminar contaminantes pero que mantenga la retención del analito.

Un paso de secado es recomendable, específicamente para matrices acuosas, esto remueve rastros de agua del sorbente. Al eliminar la presencia de agua del extracto final se puede evitar el hacer daño al análisis. El último paso consiste en la elución de los analitos de interés por un solvente apropiado, esto quiere decir que se buscara solamente eluir al analito. El volumen del solvente debe ser ajustado de manera tal que exista una recuperación cuantitativa de los analitos y además el flujo debe ser correctamente ajustado para asegurar una elución eficiente (Camel, 2003).

B. Dispersión de Matriz de Fase Sólida

En la técnica de extracción por Dispersión de Matriz de Fase Sólida (DMFS), la muestra sólida o semi-sólida es colocada en un mortero de ágata o vidrio que contiene al sorbente, como podría ser sílice C18. El sorbente y la muestra son mezclados manualmente utilizando un pistilo de vidrio o ágata por 30 segundos, es decir que la muestra se dispersa en el adsorbente. Se pueden añadir estándares internos o dopar la muestra antes de este paso. El material mezclado

es transferido y empacado en una columna adecuada para permitir el paso de los solventes que harán los lavados posteriores. Dentro de la columna se empaca la mezcla de muestra y sorbente que le da características únicas para poder separar a los analitos. De esta manera un solvente apropiado o secuencia de solventes puede ser utilizado para limpiar a la columna o directamente aislar el analito. Se pueden utilizar co-columnas que consisten en otras fases sólidas u otro tipo de soportes que ayudarán en mayor limpieza de la muestra o en mejorar la purificación del analito (Barker, 2007).

En la figura 1.5.3.B se presenta el proceso de dispersión de matriz de fase sólida, desde cómo es que se mezclan las diferentes fases hasta la elución del analito.

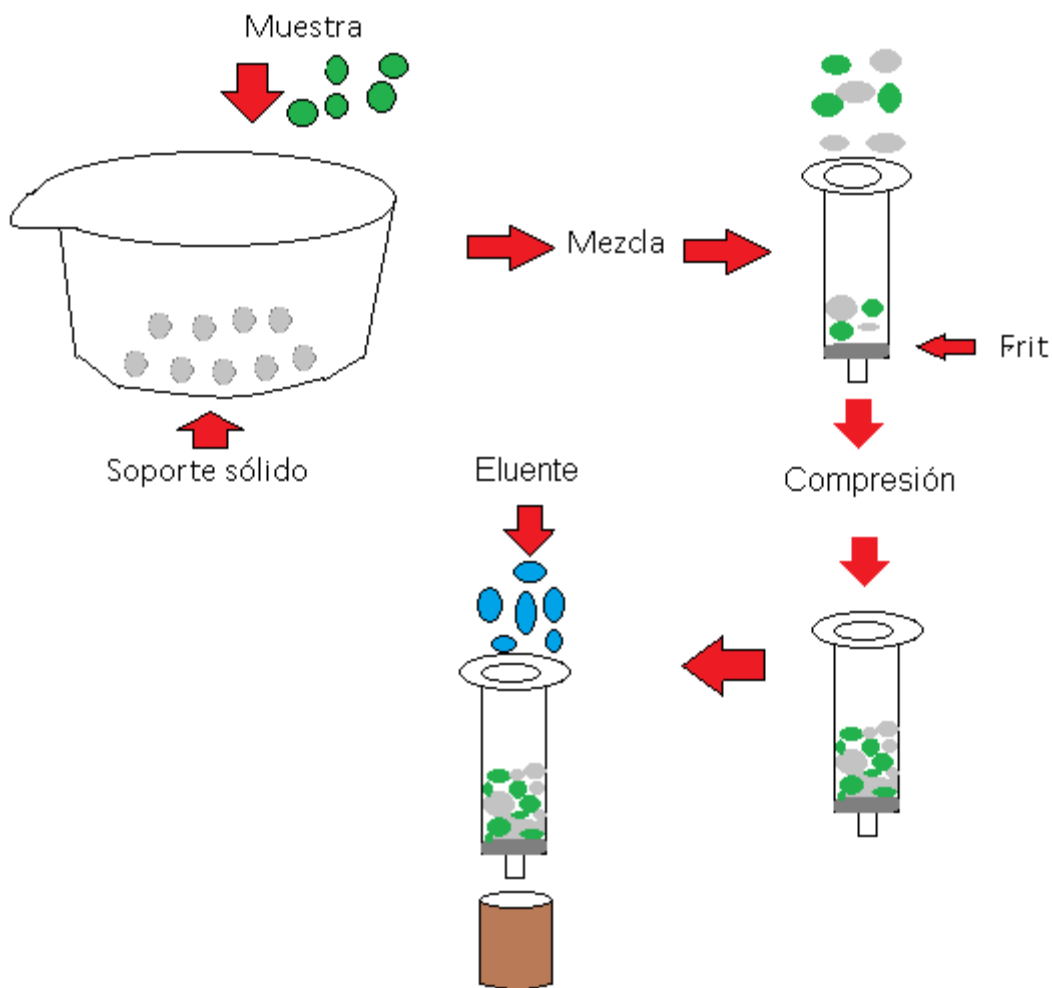


Figura 1.5.3.B Fases en el proceso de dispersión de matriz de fase sólida

En la figura también se ejemplifica como el soporte sólido es mezclado con la muestra en un mortero, posteriormente en un cartucho, al cual previamente se le ha colocado un tapón poroso, se añade la mezcla anterior. Después de un paso de compresión se le hace pasar un eluyente del cual se recuperan los analitos de interés.

En la tabla 1.5.3 se presentan ejemplos de métodos de determinación de HAPs que se han encontrado en la literatura.

Tabla 1.5.3 Cuadro comparativo de la extracción con de HAPs en muestras complejas.

Técnica	Matriz	HAPs a determinar	Concentración	Extracción	Recuperación	Referencia
EFS	Agua potable	B(b)F,B(k)F,B(a)P, B(ghi)P,l(1,2,3)P,Fl,B(a)A, DB(ah)A, B€P	100 ng/L BaP-10 ng/L	5 mL HXN reconstituir en 0.5 mL ACN.	EFS 95-104%	García-Flacón <i>et al.</i> 2004)
EFS	Agua de río, agua de mar, agua potable, agua de manantia l	NAF, ACE, ANT, PIR	5 mg/L	75% ACN	N.R.	Oliferova <i>et al.</i> . 2005
EFS	Agua residual	16 HAPs	100 ng/L	12 mL de 90:5:5 HXN:ACN.IP A. Evaporar y reconstituir a 1 mL IPA.	70-95%	Bussetti <i>et al.</i> 2006
DMFS	Sedimentos marinos	27 HAPs	310- a 5120 ng/g	Diclorometano 6 mL	94.2-101.3%	Sánchez Brunete <i>et al.</i> 2007
DMFS	Lodos de aguas residuales	17 HAPs	0.0001-0.005 µg/g	Diclorometano/metanol 6mL	76.3% to 103.6%.	Pena <i>et al.</i> 2008

DMFS	Suelos	16 HAPs	0.01 and 0.6 µg /g	Hexano/acet ona 6mL	43-99%	Pena <i>et al.</i> 2007
------	--------	---------	-----------------------	------------------------	--------	----------------------------

NAF: Naftaleno, ACE: acenaftileno, ANT: antraceno, PIR: pireno.

En la tabla 1.5.3 se puede apreciar los diferentes tipos de matrices que han sido trabajadas demostrándonos la flexibilidad de las técnicas analíticas y la capacidad de las mismas para trabajar diferentes HAPs y rangos de concentración.

2. Materiales y métodos

2.1 Equipos y accesorios cromatográficos:

- Bomba cromatográfica Pro Star 210 (Varian, EUA)
- Detector espectrofotométrico de arreglo de diodos 9065 *Polychrom Diode Array* (Varian, EUA)
- *Software Poly View, Varian Star 4.5 Workstation* (Varian, EUA)
- Precolumna de 20 x 20 mm, empacada con adsorbente Nucleosil 100-5 C18, tamaño de partícula 5 μm (MACHEREY-NAGEL, Alemania)
- Columna analítica, HYPERSIL Green PAH, tamaño de partícula 5 μm , dimensiones: 100 x 4.6 mm, empacada con fase inversa C18 (THERMO SCIENTIFIC, EUA)
- Inyector manual, Rheodyne 7725 (i), IDEX Health and Science Group, EUA), con bucle de inyección de 20 μmL
- Jeringa MICROLITER #710 (HAMILTON , EUA)
- Espectrofotómetro Spectronic Genesys 5 (ThermoScientific, EUA)
- Baño de ultrasonido modelo 1510 (BRANSON, EUA)
- Balanza analítica AV114 (OHAUS, EUA)
- Autoclave eléctrica 240 EL (TUTTNAUER, DEU)
- Lámparas fluorescentes de 14 Watts (OSRAM, México)
- Agitador orbital (THERMO SCIENTIFIC, EUA)
- Parrilla de agitación magnética (DAIGGER, EUA)
- Centrífuga 225 (THERMOSCIENTIFIC, EUA)
- Campana de flujo laminar 11231 BBC 86 (BIOBASE , China)
- Agitador con control de temperatura OSI-600R (JEIOTEC, Corea)
- Bomba 110B Solvent Delivery Module (BECKMAN, EUA).
- Microscopio óptico marca National, modelo B2-220 (Carnation, WA, EUA)

2.2 Material

- Asa bacteriológica en anillo.
- Mecheros de Bunsen.
- Sílice C18 (SUPELCO PAR, EUA)
- Celdas de plástico para lectura en espectrofotómetro región visible, 10 nm paso óptico
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Sistema de esterilización aséptico Sterifil (MILLIPORE, EUA)
- Filtro de nitrocelulosa con tamaño de poro de 0.22 μm y 47 mm de diámetro par a el sistema Sterifil (MILLIPORE, IE)
- Matraz Kitasato de 250 mL
- Cartuchos de empaque para extracción en fase sólida de 6 mL (VARIAN, EUA)
- Micropipeta 100-1000 μL (EPPENDORF, EUA)
- Pipeta graduada de 5 mL
- Frites de polietileno
- Vaso de precipitados de 150 mL
- Matraces volumétricos de 5 y 100 mL

- Matracas Erlenmeyer de 50 y 125 mL
- Probetas de 10 mL
- Pipetas Pasteur de vidrio
- Tubos de vidrio para centrifuga de 15 mL
- Viales con tapón de rosca de 10 mL
- Papel estroza
- Bulbos para pipeta
- Temporizador (“*timer*”) para ciclos de luz/oscuridad
- Propipeta
- Lámparas con foco de luz amarilla de 20 Watts (OSRAM , México)
- Jeringa de 20 mL con adaptador
- Mortero y pistilo de ágata de 20 mL
- Columna de vidrio para discos de alginato de fondo abierto de 10 cm.
- Columna de vidrio para discos de alginato de fondo cerrado de 10 cm.

2.3 Reactivos y disolventes

- Estándar de Benzo(a)antraceno y Benzo(a)pireno, pureza >99 % (CHEMSERVICE, EUA)
- Nitrato de sodio (NaNO_3) (MALLINCKRODT, IE)
- Cloruro de calcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (SIGMA-ALDRICH, EUA)
- Sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (J.T.BAKER, EUA)
- Fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4) (J.T.BAKER, EUA)
- Fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4) (J.T.BAKER, EUA)
- Cloruro de sodio (NaCl) (J.T.BAKER, EUA)
- Peptona proteasa (MCD Lab, México)
- Agar bacteriológico (MCD Lab, México)
- Alginato de sodio (SIGMA ALDRICH, EUA)
- Cloruro de calcio (SIGMA ALDRICH, EUA)
- Citrato de sodio (SIGMA ALDRICH , EUA)
- Metanol grado CLAR (J.T.Baker, EUA)
- Acetonitrilo grado CLAR (J.T.Baker, EUA)
- Isopropanol grado CLAR (J.T.Baker , EUA)
- Agua desionizada tipo I obtenida de un equipo de purificación Simplicity UV (MILLIPORE, EUA)
- Agua destilada (CONQUIMEX , México)
- Alcohol etílico (CONQUIMEX , México)

2.4 Esquema general de trabajo

Como se aprecia en la figura 2.1, la experimentación usada en este trabajo se divide en las tres secciones siguientes: 1) Metodología analítica, 2) Manejo de microalgas, 3) Desarrollo de columna.

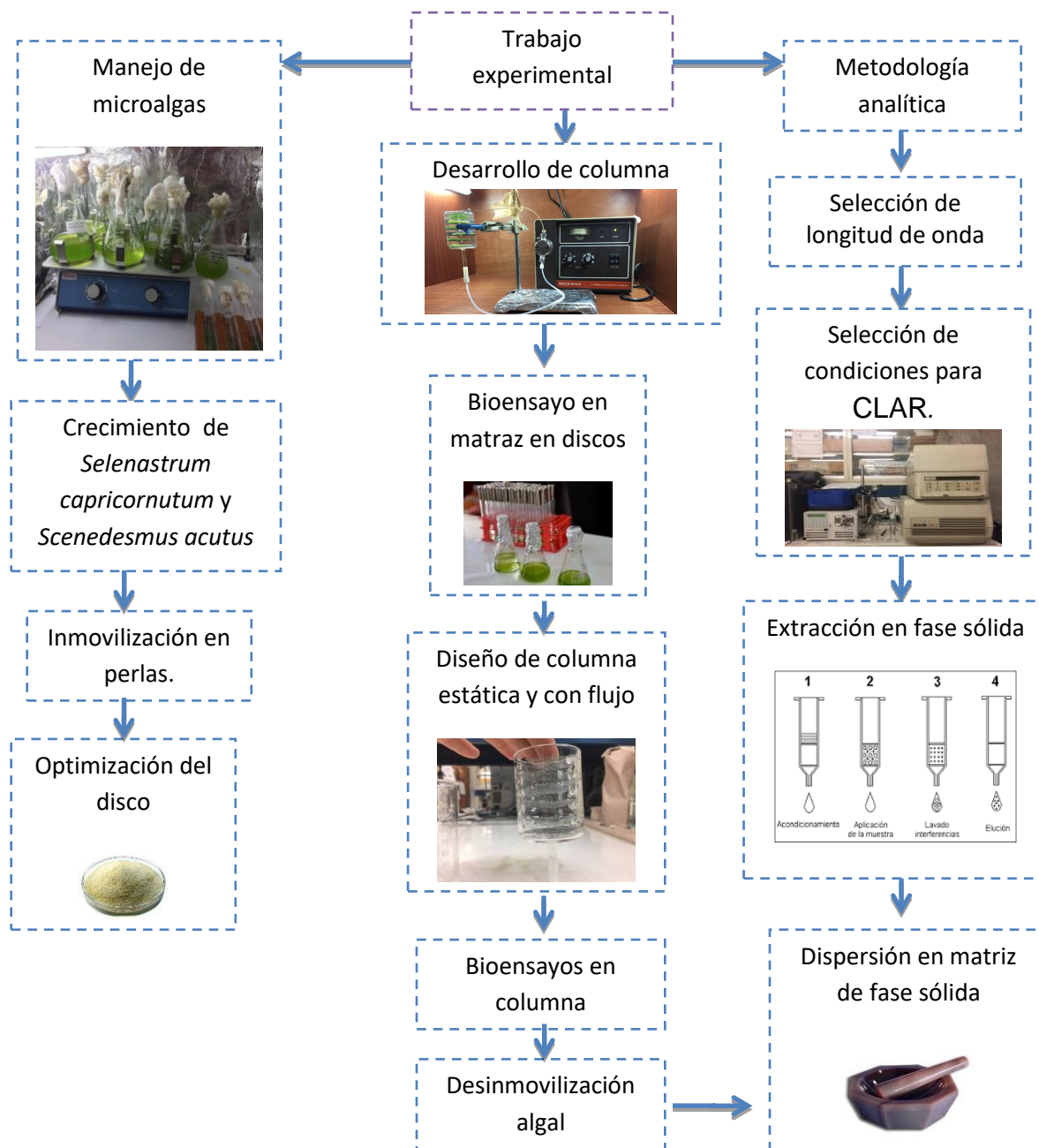


Figura. 2.1. Esquema general de trabajo

2.5 Metodología analítica

Para efectuar el análisis cromatográfico de los HAPs se utilizó una columna de fase inversa C18 HYPERSIL Green PAH y MeOH al 100% como fase móvil con un flujo de 1 mL/min a temperatura ambiente. La detección se realizó con un espectrofotómetro UV/Vis de arreglo de diodos a la longitud de onda de máxima respuesta.

2.5.1 Selección de longitud de onda

Se elaboró una solución de 1 mg/L para cada uno de los HAP en estudio y se inyectó en el cromatógrafo. Se realizaron barridos de 200 a 450 nm utilizando el detector de arreglo de diodos UV-Vis para obtener los espectros de absorción de los picos de elución obtenidos en los cromatogramas que se muestran en las figuras 3.1 y 3.2. Con estos barridos se determinaron las longitudes de máxima absorción (λ_{max}) para cada uno de los compuestos estudiados.

2.5.2 Extracción en fase sólida (EFS)

Para efectuar la extracción en fase sólida del BaP y el BaA del agua potable posterior a los bioensayos de exposición, se utilizó como referencia la metodología reportada por Olmos-Espejel (2013) en cultivos líquidos de microalgas libres. Se usó el método de Bernal-Toris (2015) para los hidrocarburos captados en el alginato. En la extracción se utilizaron cartuchos de 6 mL, a los cuales se les introducía un tapón poroso, posteriormente 300 mg de sílice Supelclean C18 y después otro tapón poroso sobre la sílice para comprimirla. El acondicionamiento y la implementación de la secuencia de elución en el cartucho empacado se realizaron a un flujo de 3 mL/min aplicado mediante vacío. Las condiciones de la EFS para los HAPs se describen a continuación por separado para la preparación de la muestra acuosa y para la de alginato.

La activación del adsorbente se realizó antes de la extracción de los HAP, para lo cual se le hizo pasar a la sílice C18 1 mL de metanol por gramo. Este proceso se le realizó a toda la sílice utilizada para EFS o DMFS.

- Extracción de HAPs del agua potable

Para la extracción de los hidrocarburos que se encontraron en agua potable, el adsorbente fue acondicionado previamente con 3 mL de ACN, y posteriormente con 10 mL de agua destilada. Para la carga de la muestra, se tomaron los 15 mL de agua potable en donde se expusieron las microalgas para hacerlos pasar por el cartucho. Mientras tanto se hacía un lavado del matraz o recipiente donde se realizó la exposición con 10 mL de isopropanol al 20% en agua para remover los hidrocarburos que se pudieron adherir a la superficie. Estos 10 mL de isopropanol resultantes se hicieron pasar también por el cartucho después de los 15 mL del agua potable. El siguiente paso fue realizar la eliminación de interferentes con “lavados” que consistieron en hacer pasar al cartucho 5 mL de agua destilada, 4 mL de una mezcla agua:acetonitrilo 90:10 v/v y 3 mL de una mezcla agua:acetonitrilo 45:55 v/v. Por último, se realizó la elución de los analitos utilizando 4 mL de acetonitrilo 100% a gravedad para llevar a análisis este extracto por CLAR-UV.

- Extracción de HAPs del alginato

Para la extracción de los hidrocarburos que se retuvieron en el alginato que conformaba las cuentas, durante la exposición se utilizaron cartuchos con 300 mg de sílice C18 acondicionados de la misma forma que en la sección anterior. Para la carga de la muestra, se pasaron los 15 mL provenientes de la desinmovilización algal (ver sección 2.9) la cual consiste de una mezcla de alginato y citrato de sodio, a través del cartucho con sílice C18. Las microalgas fueron separadas previamente mediante centrifugación. Posteriormente, se aplicó una secuencia de elución que incluía los lavados con el orden siguiente: 30 mL de agua destilada, 4 mL de una mezcla agua: acetonitrilo 90:10 v/v y 3 mL de una mezcla de agua: acetonitrilo 45:55 v/v. Por último, para la elución de los HAPs se usaron 4 mL de acetonitrilo a gravedad para llevarlo a análisis por CLAR-UV.

2.5.3 Dispersión de Matriz de Fase Sólida (DMFS)

Para lograr la extracción de los HAPs de la biomasa resultante de los bioensayos de exposición, se utilizó como guía el método desarrollado por Díaz-Flores (2013): Se toman 5 mg de biomasa seca y se dispersan en un mortero de ágata con 100 mg de sílice C18 Supelclean, previamente activada, hasta obtener una pasta homogénea. Esta mezcla se empaqueta entre dos tapones porosos en un cartucho de 1 mL. La secuencia de elución consistió de lavados de 10 mL de agua, 5 mL de agua:acetonitrilo 80:20 v/v y 1.5 mL de agua: acetonitrilo 60:40 v/v. Por último se realizó una elución de los analitos con 1 mL de mezcla agua: acetonitrilo 10:90 para llevarlo a análisis por CLAR-UV.

2.6 Microorganismos

Se utilizaron las especies *Selenastrum capricornutum* y *Scenedesmus acutus*, adquiridas de la colección de cultivos de algas de la Universidad de Austin, Texas (UTEX, EUA). Estas fueron cultivadas en condiciones axénicas. El medio líquido utilizado para el crecimiento de las microalgas fue el medio Bristol (Tabla 2.6.1) esterilizado en una autoclave eléctrica a 121 °C y 15 psi durante 30 minutos para su posterior sembrado con las especies ya mencionadas. A los medios de cultivo líquidos trabajados se les hizo la adición de 1 mg/mL de proteosa-peptona. Aparte, el medio Bristol también fue usado para mantenimiento de las cepas, se le agregó 16 mg/mL de agar además de 1 mg/mL de proteosa-peptona.

La siembra de las algas en medio sólido o líquido se hizo por medio del asa bacteriológica en anillo, haciéndose pasar microalgas del cultivo sólido de crecimiento al medio de cultivo líquido estéril en una zona aséptica. Una vez sembrados, los cultivos líquidos de 150 mL tardaron alrededor de 20 días para llegar a la absorbancia de trabajo ($Abs=1$), tiempo que dependió de la especie. Así, *S. acutus* tardó en crecer hasta $Abs=1$ en 22 días y *S. capricornutum* en 19 días. El crecimiento se realizó en una cámara a temperatura ambiente, con

periodos de luz/oscuridad de 16/8 horas iluminadas con lámparas fluorescentes de 14 W en agitación constante con un agitador orbital. El crecimiento de las algas fue monitoreado semanalmente al tomar pequeñas alícuotas del medio para medir su absorbancia a 685 nm en un espectrofotómetro de UV-Vis. Se utilizó dicha longitud de onda, debido a que es la longitud de máxima absorbancia de la clorofila. Se utilizó este método ya un valor de absorbancia igual a 1 mantiene una relación con la cantidad de células por mililitro de cultivo con valores de 6.15×10^6 cel/mL para *Scenedesmus acutus* y 6.75×10^6 cel/mL para *Selenastrum capricornutum*, de acuerdo a lo reportado por Olmos-Espejel, 2013. Para el caso de los cultivos sólidos, al sembrarlos y dejar pasar una semana, se observó una ligera tonalidad verde sobre el medio en los lugares donde se hizo pasar el asa, al pasar 3 semanas toda la superficie del medio tuvo un color verde oscuro y estuvieron listos para ser utilizados.

La tabla 2.6.1 presenta la composición del medio Bristol y la Fig 2.6.1 ilustra cómo se crecieron los cultivos algales tanto sólido como líquido de las especies *S.acutus* y *S.capricornutum*.

Tabla 2.6.1. Composición de medio Bristol. Bischoff & Bold(1963)

Componente	Solución Stock (g/L) en H ₂ O	Cantidad a usar de Stock (mL)	Concentración final (M)
Macronutrientes			
NaNO ₃	25.00	10	2.94x10 ⁻³
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2.50	10	1.70x10 ⁻⁴
MgSO ₄	7.50	10	3.04x10 ⁻⁴
K ₂ HPO ₄	7.50	10	4.31x10 ⁻⁴
KH ₂ PO ₄	17.50	10	1.29x10 ⁻³
NaCl	2.50	10	4.28x10 ⁻⁴
Solución de EDTA		1	
EDTA	50.00		1.71x10 ⁻⁴
KOH	31.00		5.53x10 ⁻⁴
Solución de hierro		1	
FeSO ₄ ·7H ₂ O	4.98		1.79x10 ⁻⁵
H ₂ SO ₄		1	
Solución de Boro		1	
H ₃ BO ₃	11.42		1.85x10 ⁻⁴
Solución de metales traza		1	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.82		3.07x10 ⁻⁵
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.44		7.28x10 ⁻⁶
MoO ₃	0.71		4.93x10 ⁻⁶
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1.57		6.29x10 ⁻⁶
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0.49		1.68x10 ⁻⁶



Figura 2.6.1. A) Medio líquido *S. acutus* B) Medio líquido *S. capricornutum* C) Medio sólido *S. acutus* D) Medio sólido *S. capricornutum*.

2.7 Formación de perlas de alginato

Partiendo de lo reportado por Bernal-Toris (2015) para la preparación de las perlas de alginato, todo el material de vidrio o de plástico que lo permitiera y las disoluciones de CaCl_2 fueron esterilizados con autoclave eléctrica por 30 minutos a 121°C y 15 psi. Las disoluciones de alginato fueron esterilizadas por filtración en sistema Sterifil en una zona aséptica. Se tomó una muestra de 15 mL de cultivo de microalgas (*S. capricornutum* o *S. acutus*) con absorbancia igual a 1, para centrifugarla y formar un botón que fue resuspendido en 2 mL del sobrenadante para ser mezclado posteriormente con 4 mL de alginato de sodio al 3 %,

obteniendo así una disolución con 2 % de alginato de sodio y 6 mL de volumen total. Esta mezcla fue goteada en una disolución de 20 mL de CaCl_2 al 1% contenida en un matraz Erlenmeyer utilizando una pipeta graduada de 10 mL. Después de esperar un minuto, la solución de CaCl_2 es retirada del matraz, decantando las perlas, que se guardaron en 15 mL de agua potable. En cada ensayo se producían en promedio 90 perlas. El proceso se realizó en condiciones asépticas.

2.8 Optimización del disco

Se hicieron modificaciones a la metodología de formación de perlas anteriormente descrita con el objetivo de lograr discos que cumplieran con las mejores características para poder implementarlos en la columna diseñada. La optimización de las características de estos discos se describe a continuación.

2.8.1 Tamaño

Se decidió poner a prueba 3 tamaños de disco (4, 6 y 10 cm de diámetro), utilizando varios recipientes para su moldeo. Se probó con una caja Petri de 10 cm de diámetro, un frasco de 6 cm de diámetro y un vaso de precipitado de 50 mL con un diámetro de 4 cm. Se tuvo como objetivo encontrar el tamaño de disco que tuviera la mejor manejabilidad, reproducibilidad, estructura y gelificación.

2.8.2 Solidez y transparencia

Se optimizó la relación porcentual de alginato vs. concentración de CaCl_2 como agente gelificante (agente endurecedor), lo cual se logró probando concentraciones 1.5, 2, 2.5 y 5 % de CaCl_2 y de 5, 4, 3 y 2 %; de alginato. Se probaron cada una de las concentraciones de alginato con cada una las concentraciones cloruro de calcio. La prueba se evaluó con el color que adquirió el disco, entre más blanco más endurecido fue el disco. Dado que esta dureza podría traer problemas de permeación, ya sea de nutrientes o los mismos HAP, se trató de encontrar la combinación que consiguiera un disco transparente, pero firme.

También se optimizó el tiempo de contacto del alginato con el CaCl_2 para lograr mayor eficiencia de acuerdo a tiempos en el proceso.

2.8.3 Inmovilización de microalgas y pruebas de viabilidad

Una vez conseguidas las condiciones óptimas de preparación de los discos de alginato se procedió a inmovilizar a las microalgas usando 15 mL de cultivo con: 6.25×10^6 células/mL (1C), 12.5×10^6 células/mL (2C) y 25×10^6 células/mL (4C) para *S.acutus* y 6.6×10^6 células/mL (1C), 13.2×10^6 (2C) células/mL y 26.4×10^6 células/mL (4C) para *S.capricornutum*, dejándolas en medio de cultivo inmovilizadas en tres discos por cada concentración de células durante un período de 1 a 5 días para después liberarlas y re-cultivarlas en medio nutritivo sólido. Después de una semana se corroboró su crecimiento en el medio sólido. También se realizó una desinmovilización de 3 discos para cada concentración celular para hacer un conteo de las células y observar si existió crecimiento durante su permanencia en los discos durante el periodo de 48 h y 160 h.

2.8.4 Agitación y tamaño de matraz para la incubación

Se experimentó con el propósito de buscar el tamaño (50 mL, 125 mL, 250 mL) de matraz Erlenmeyer adecuado para realizar la exposición de las microalgas a los HAPs en 15 mL de agua potable y encontrar así cuáles serían las revoluciones por minuto de agitación orbital (50 rpm, 75 rpm o 100 rpm) adecuadas para minimizar el daño físico a los discos, para lograr la mayor difusión de los HAPs. Primero se hizo una evaluación con los discos sin microalgas, observando el estado físico de estos después de un periodo de 48 horas con agitación orbital a 50, 75 y 100 rpm, sin agregar HAP.

2.9. Preparación de discos

Para poder garantizar que la campana de flujo laminar era una zona aséptica en la preparación de los discos, se utilizó 30 minutos de incidencia de luz UV previo al uso. Una vez pasado este tiempo se hizo un lavado exhaustivo de manos y

antebrazos, se encendió el flujo laminar en la campana y se procedió con el trabajo experimental.

Para iniciar con la inmovilización de las microalgas, en discos una vez que se encontraron suspendidas en la disolución de alginato, se usó un aspersor manual plástico (botella plástico) conteniendo un volumen de 170 mL del CaCl_2 (2%) para asegurar su correcta dispersión en la superficie del disco. La previa recolección de las microalgas se efectuó por centrifugaron de 15 mL de cultivo con absorbancia igual a 1; se desecharon 13 mL de sobrenadante para después de volver a suspender en los 2 mL restantes. Usando una disolución del alginato al 4% se realizó la mezcla de alginato-alga de 2 mL de re-suspensión y 4 mL de alginato, como se ejemplifica en el esquema 2.9. Antes de meter la mezcla al recipiente se colocó una capa delgada de CaCl_2 en el fondo de un vaso de precipitado de 50 mL con ayuda de un aspersor con el propósito de evitar que la mezcla alginato/alga que se agrega al vaso se adhiriera al fondo. El siguiente paso fue agregar al vaso 2 mL de mezcla y rociar aproximadamente 5 mL de CaCl_2 a esta mezcla de alginato/alga, asegurándonos que el rocío fuera continuo y evitando gotas grandes ya que esto afecta la calidad de la superficie y por lo tanto la repetibilidad de los discos. Después de esperar 50 s, se agregaron entre 15 y 20 mL de la misma solución de CaCl_2 con ayuda del aspersor. Se recomienda que la adición de este volumen se haga sobre las paredes del vaso con cierta presión, ya que esto permite evitar la adhesión entre el alginato y el vidrio asegura que la cara del disco que da hacia el fondo del vaso tenga una entrada suficiente de CaCl_2 para su gelificación adecuada. Este procedimiento se repitió para formar otros dos discos cada uno con 2 mL de mezcla. Al pasar 2 minutos de la segunda adición de CaCl_2 , se removi6 cada disco de su respectivo vaso para colocarlos en una caja Petri, para que no se comprimieran. Los discos tuvieron un diámetro de 3.7 cm, una altura de 0.5 cm y un volumen de 2 cm^3 , teniendo un cuerpo translúcido y una superficie uniforme. Entonces, para cada exposición en matraz se utilizaron 3 discos, los cuales contuvieron $9.2 \times 10^7 \pm 134075$ células totales para *S. acutus* (teniendo 3.06×10^7 cel/disco, 1C) y $1.01 \times 10^8 \pm 80167$ células totales para *S. capricornutum* (3.3×10^7 cel/disco, 1C). En lo que respecta a la formación de

perlas, se prepararon igualmente 6 mL de mezcla alginato-alga y se gotearon en cloruro de calcio con una pipeta graduada para obtener alrededor de 90 perlas. En este caso se manejaron el mismo número de células totales que para los discos.

Desinmovilización algal.

Para la desinmovilización algal, una vez terminada la exposición, se tomó la forma de inmovilización trabajada (perla o disco) y se sometió al método planteado por Bernal-Toris (2015), en el que se toma la forma de inmovilización trabajada correspondiente a 1 ensayo (3 discos o 90 perlas) y se sumergen en 10 mL de citrato de sodio 10% m/v, dejando pasar varios minutos y bajo agitación orbital hasta asegurar la completa disolución del gel. Posteriormente se centrifugó esta mezcla durante 15 min a 3 000 rpm, para obtener un botón con la biomasa liberada. El botón de biomasa se trabajó por DMFS como se menciona en el 2.5.3 y el sobrenadante con el alginato disuelto como se menciona en el punto 2.5.2.

A continuación, se presenta el Figura 2.9 que consiste en ejemplificar el proceso completo de preparación de discos para los bioensayos.

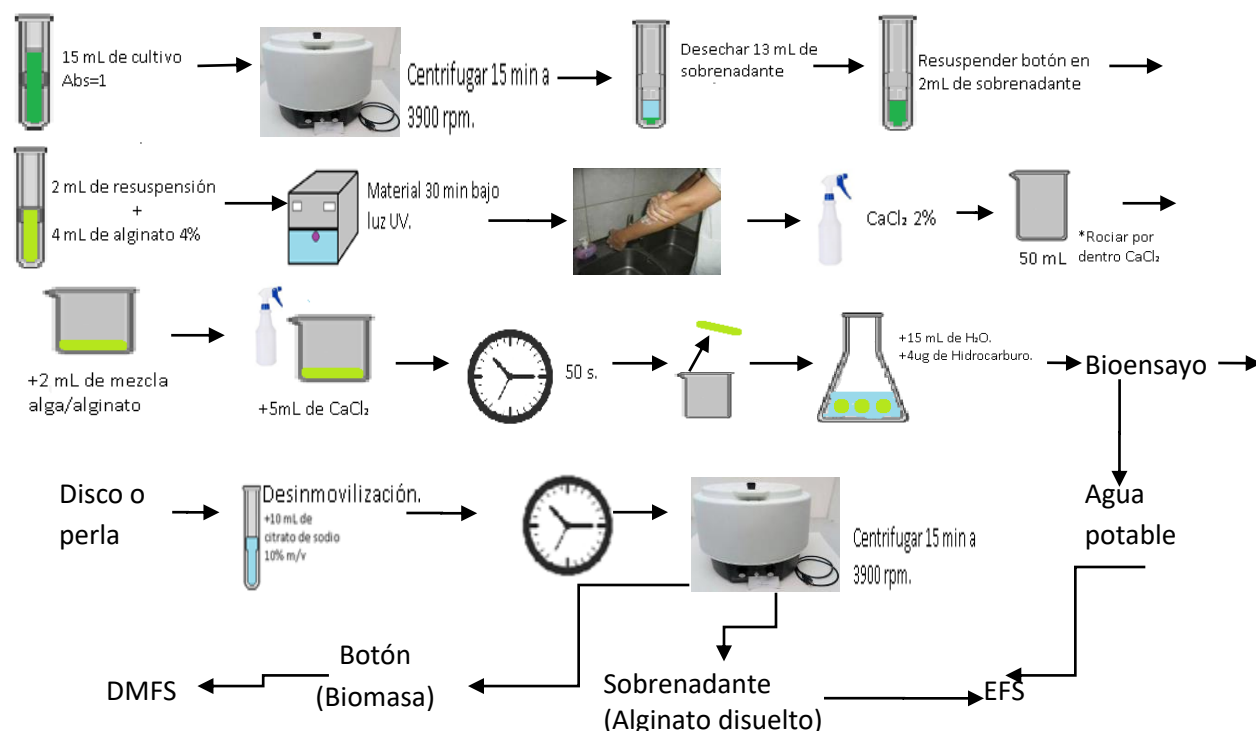


Figura 2.9. Descripción del proceso para la preparación de discos-bioensayos-extracción

2.10 Bioensayos de exposición

Como ya se mencionó, los discos se formaron de acuerdo al mismo procedimiento que la formación de las perlas (punto 2.7). La excepción de que, en lugar de producir el goteo de la mezcla de alginato/algas como en las perlas, se vertían 2 mL en un vaso de precipitado de 50 mL para después rociar un volumen de aproximadamente 5 mL de CaCl₂ al 1%, utilizando como molde el vaso de precipitados. Se realizaron tres tipos de bioensayos de exposición a los HAPs: 1) en matraces (con perlas y discos), 2) en columna estática (con discos) y 3) en columna con recirculación (con discos), los cuales se describen a continuación.

2.11 Bioensayos en matraces

Para realizar una comparación de la remoción de las microalgas con ambas formas de inmovilización (perlas y discos) y ambas especies por separado, se realizaron bioensayos de exposición preliminares en matraces con cada una de las formas y cada especie de microalgas por separado con un tiempo de incubación de 1 h. Se colocaron 15 mL de agua potable en un matraz Erlenmeyer de 50 mL para añadir posteriormente 4 µg de BaP solo, obtenidos de una solución estándar, y dejar en un agitador orbital SI-600R a las microalgas inmovilizadas expuestas a luz amarilla durante una 1 hora a temperatura ambiente. También se realizaron pruebas para cada forma del alginato en donde solo se colocaban discos o perlas de alginato con HAPs pero sin microalgas (blancos) y discos o perlas de alginato con microalgas sin HAPs (controles). La extracción y tratamiento del BaP para su posterior cuantificación se realizó de acuerdo con lo mencionado en la sección 2.5. El porcentaje de recobro se calculó con la siguiente fórmula: porcentaje de recuperación= $100 \times (\text{ng recuperados del medio líquido}) \div \text{ng adicionados}$.

Posteriormente se realizaron exposiciones a diferentes tiempos con las condiciones de preparación óptimas de los discos: 4 cm de diámetro, 4% de alginato, 2% de CaCl₂. Las concentraciones de células usadas fueron para *S.capricornutum* de 6.6×10^6 células/mL (1.01×10^8 células totales) identificada

como 1C; 13.2×10^6 células/mL (2.01×10^8 células totales) identificada como 2C. Para *S.acutus* se utilizó 6.25×10^6 células/mL (9.2×10^7 células totales en 15 mL) identificada como 1C y 12.5×10^6 células/mL (1.01×10^8 células totales en 15 mL); identificado como 2C por tener el doble de la cantidad inicial probada (1C) . Se expuso a los discos con cada una de las especies de microalgas a $0.266 \mu\text{g/mL}$ de BaP y BaA por separado en 15 mL de agua potable contenidos en un matraz Erlenmeyer de 250 mL. Se utilizó un agitador orbital SI-600R para realizar los ensayos.

Se manejaron tiempos de incubación de 3, 6 y 15 horas. El porcentaje de remoción se calculó con la siguiente fórmula: porcentaje de remoción = $100 \times (\text{ng adicionados} - \text{ng recuperados del medio líquido}) \div \text{ng adicionados}$. El porcentaje (%) de degradación se calculó con la siguiente fórmula: % de degradación = $100 \times (\text{ng adicionados} - \text{ng recuperados totales}) \div \text{ng adicionados}$, cuando se habla de ng recuperados totales se refiere a la suma de lo encontrado en medio líquido más lo encontrado en biomasa.

2.12 Bioensayos de exposición en columna estática

Una vez determinadas las condiciones óptimas para el trabajo con discos en matraz (15 h, 1C), obtenidas de los resultados de los experimentos de la sección anterior, se comenzó el trabajo con la columna estática. La columna tiene la capacidad de contener 6 discos soportados por rejillas de metal (Figura 2.12.1), lo que corresponde al doble de discos que se utilizaron en los bioensayos en matraces. Por lo tanto, se hizo lo mismo con la cantidad de hidrocarburo añadido por lo que para cada ensayo con columna se añadieron $8 \mu\text{g}$ del hidrocarburo, obtenidos de una solución estándar, en cuestión en vez de $4 \mu\text{g}$. En la columna se pudieron colocar 74 mL de agua potable con los discos y las rejillas dentro de la misma.

Se realizaron exposiciones para observar la remoción cuando:

- a. No se colocaban microalgas en los discos (blancos).
- b. Cuando se colocaban cada una de las dos especies de algas en diferentes posiciones dentro de la columna.
- c. Cuando se mezclaban las algas dentro del mismo disco.

Para poder mantener la reproducibilidad en los ensayos en columna, y así realizar comparaciones entre los experimentos, se manejó a la columna en 2 secciones para su análisis cuantitativo y determinación de la remoción. De esta manera se analizaron los 3 discos de la sección A (posiciones 1, 3, 5) y 3 discos de la sección B (posiciones 2, 4, 6) por lo que las cantidades de biomasa obtenidas con la variable de su posición y especie trabajada fueron evidenciadas.

En la Figura 2.12.1 se muestra la fotografía de la columna y en la Figura 2.12.2 el esquema de localización de las posiciones de los discos y su relación con los ensayos respectivamente. Las exposiciones con las dos especies colocadas en diferente, posiciones se les ha identificado como “Alternado” cuando se inició en la parte superior con un disco de *S.acut* para inmediatamente debajo colocar uno de *S.cap* y así sucesivamente: El ensayo *S.cap/S.acut* contiene a todos los discos de *S.cap* en la parte superior (las tres primeras posiciones) y a *S.acut* en la inferior (las tres últimas posiciones). El ensayo *S.acut/S.cap* presenta lo contrario ya que los discos de *S.acut* se encuentran en la parte superior mientras que los de *S.cap* está en la inferior. Finalmente el ensayo “Mezcla de especies” trata a ambas especies incluidas en cada uno de los discos; se divide en A y B por la posición impar y par respectivamente para efectos de referencia del análisis de tres en tres de los discos.

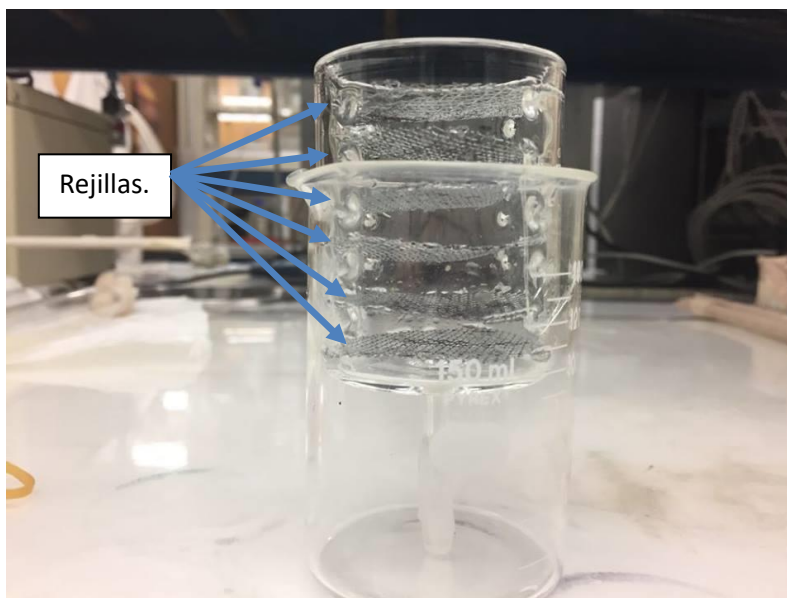


Figura 2.12.1. Columna con alambre metálico dentro de un vaso de precipitado para exposición con flujo, la columna tiene capacidad para 74 mL.

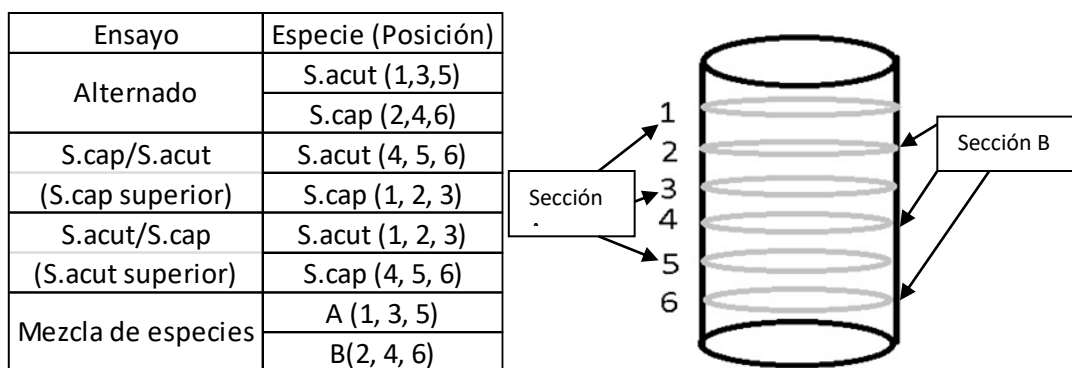


Figura 2.12.2. Esquema de posiciones y ensayos.

2.13 Bioensayos de columna con flujo en recirculación

Una vez que se identificó la combinación más efectiva de especies y su ubicación en la columna para la remoción de hidrocarburos en los resultados de los ensayos

descritos en la sección anterior (la cuál fue *S.cap/S.acut*), se decidió probarla en modo de recirculación en una columna con un flujo de 0.1 mL/min, con un volumen de recirculación de 90 mL con 15 horas de exposición a los hidrocarburos en una concentración de 0.0881 $\mu\text{g/mL}$ (8 μg totales) , el flujo fue controlado por una bomba BECKMAN 110B Solvent Delivery Module. Se evaluaron los porcentajes de remoción al finalizar las exposiciones.

A continuación en la Fig. 2.13.1 se presenta la configuración de la bomba y columna para realizar los bioensayos con flujo en recirculación.



Figura 2.13.1 Montaje para los bioensayos de columna con flujo.

3. Resultados:

3.1 Metodología analítica

Con las condiciones de análisis cromatográfico descritas en la metodología y las longitudes de onda de detección que se optimizaron (que se presentaran en la sección siguiente), se obtuvieron los cromatogramas de la figura 3.1.1 y 3.1.2 de donde se obtuvieron los tiempos de retención (t_r), tiempo muerto (t_m), utilizando para su medición nitrato de sodio, y se calcularon los factores de capacidad (k') para el Benzo(a)pireno y Benzo(a)antraceno. Se realizaron análisis individuales para cada HAP, dado que así se manejaron las exposiciones.

El factor de capacidad (k') para cada uno de los compuestos, que se presentan en la figura 3.1.1 y 3.1.2, se calculó con la fórmula siguiente.

$$k' = (t_r - t_m) / t_m$$

Donde:

k' = factor de capacidad.

t_r = tiempo de retención del compuesto.

t_m = tiempo muerto.

Para BaP se obtuvieron valores de $t_r = 9$ min, $t_m = 1.25$ min, $k' = 6.2$.

Mientras que para BaA se obtuvieron $t_r = 4.9$ min, $t_m = 1.25$ min $k' = 2.9$

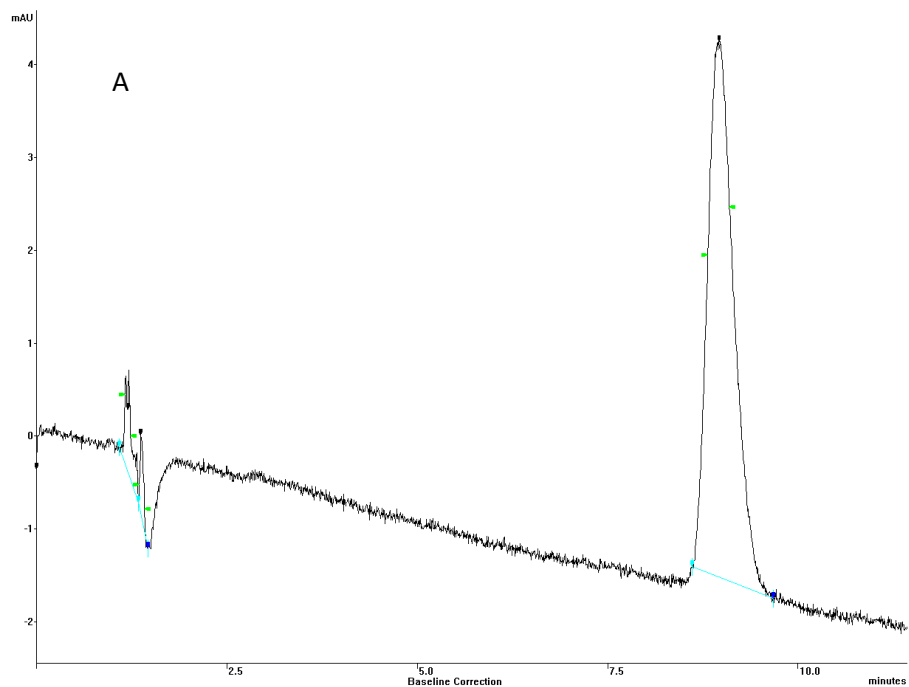


Figura 3.1.1 Cromatograma de estándar del BaP estudiado.

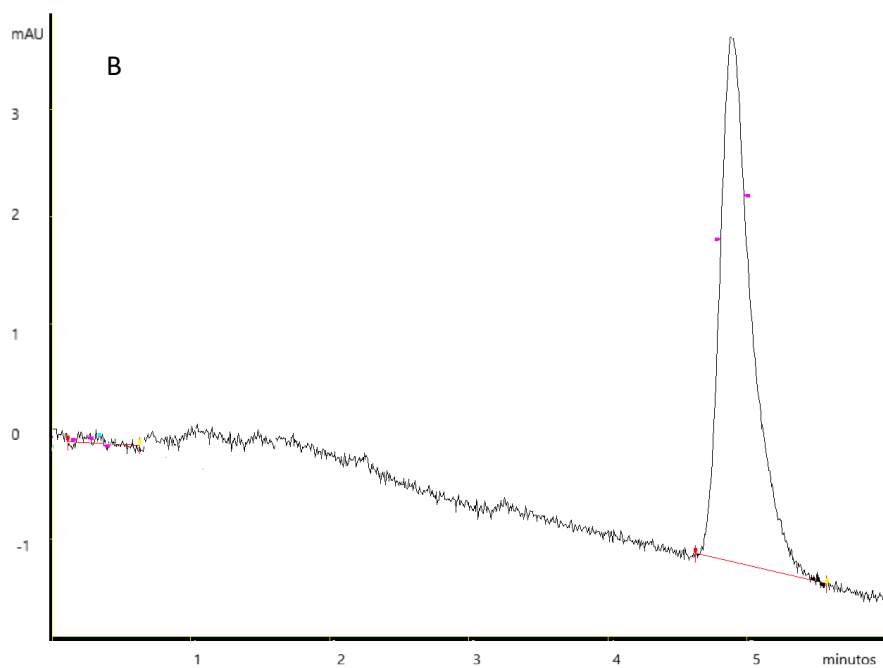


Figura 3.1.2 Cromatograma de estándar del BaA estudiado.

Los resultados encontrados coinciden con lo esperado, esto siendo que el BaP tenga mayor tiempo de interacción con la fase estacionaria debido a su mayor peso molecular y naturaleza hidrófoba más afín a la fase estacionaria, recordando que se trabaja con una columna C18, esto se ve reflejado en su t_r y por lo tanto en su k' . Mientras que el BaA teniendo un tamaño menor y menos anillos bencénicos que el BaP tiene menor interacción con la fase estacionaria. Como se puede apreciar ambos valores de factor de capacidad tienen un valor menor a 10, por lo que el análisis se realiza en tiempos óptimos de corrida.

3.2.1 Selección de longitud de onda. Límites de detección y cuantificación.

Los espectros de absorción para los HAPs trabajados se presentan a continuación en la figura 3.2.1

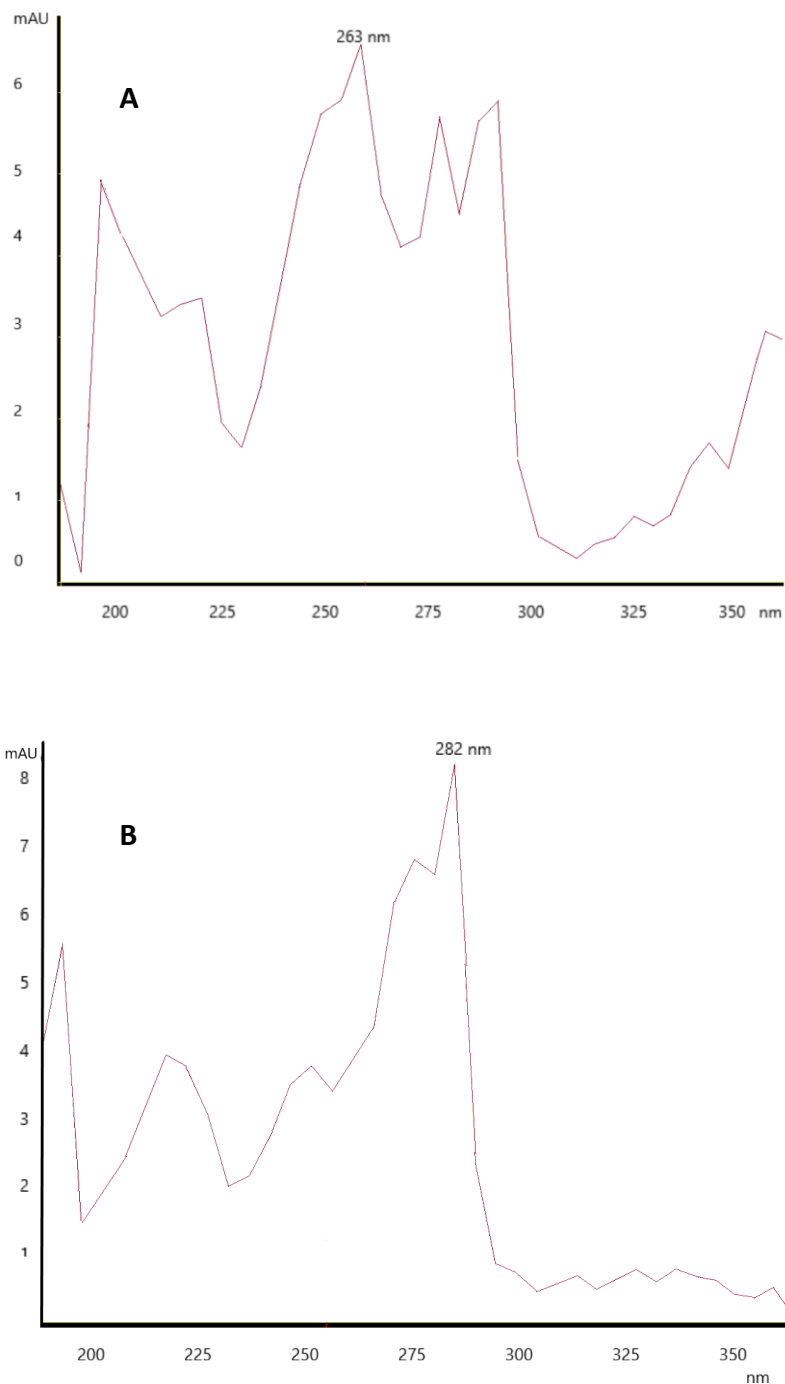


Figura 3.2.1 Espectros UV de los HAPs estudiados a 1 mg/L.
A) BaP B) BaA.

Para el BaP se decidió utilizar 263 nm porque a esta longitud de onda está su pico máximo de absorción y es la que se ha utilizado en el laboratorio con anterioridad, esto permite la comparación de resultados con otros trabajos.

Para el caso del BaA se utilizó una longitud de onda de 282 nm que es su máximo punto de absorción como se puede observar en la figura 3.2.1.B y se ha utilizado en trabajos anteriores por el grupo de trabajo. Se eligieron estas longitudes de onda ya que tienen mayor respuesta. Se sabe que el detector utilizado tiene buena capacidad para fijar la longitud de onda por lo que el error se reduce a un mínimo, lo cual conlleva en tener buena reproducibilidad.

Límites de cuantificación y límites de detección

Los valores obtenidos para LD y LC en este estudio (tabla 3.5.2.), teniendo un coeficiente de variación menor a 10%, quedaron cercanos a los ya reportados por León-Santiago (2016) quien encontró límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) también mostrados en la tabla 3.5.2. Por lo tanto, se puede confiar en los resultados obtenidos en este método.

Tabla 3.5.2. LD y LC para comparación entre trabajos de BaA y BaP.

	L.D.				L.C.				Ec.recta		r ²	
	mg/L	%CV	mg/L	%CV	mg/L	%CV	mg/L	%CV	Este trabajo	León-Santiago	Este trabajo	León-Santiago
	Este trabajo		León-Santiago		Este trabajo		León-Santiago					
BaA	0.0089	7.5	0.0086	9.29	0.028	7.9	0.026	4.42	y=4.3771x-0.5390	y=4.4666x-0.5983	0.9998	0.9969
BaP	0.01	8.1	0.009	8.5	0.03	8.6	0.0274	6.95	y=5.2011x-0.879	y=5.181x-0.8176	0.9995	0.9971

3.5.2 Extracción de los HAP

3.5.3 EFS

La metodología de Extracción en Fase Sólida (EFS) de los HAPs en agua potable fue validada previamente por León-Santiago (2016) y reporta un porcentaje de recobro de 75 ± 3.8 %. Este valor se encuentra dentro del intervalo recomendado por USEPA (70-130%). Con una variación baja se puede asumir buena repetitividad y se puede confirmar una buena reproducibilidad por los trabajos basados en dicha metodología realizados en el laboratorio.

3.5.4 DMFS

Para la extracción de HAPs de la biomasa algal por Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS) se utilizó la metodología planteada por Díaz-Flores (2013), en ésta se reporta un porcentaje de recobro del 73 % con un coeficiente de variación porcentual de 10.8%. Estos resultados son satisfactorios ya que se encuentran dentro del intervalo recomendado por USEPA (70-130%). Esta también estipula un coeficiente de variación menor al 15%, lo cual cumple la metodología trabajada.

3.6. Microorganismos

Gracias al alto nivel de clorofila que contienen ambas especies trabajadas se pudo monitorear su crecimiento mediante un espectrofotómetro UV/Vis a una longitud de onda de absorción de 685 nm.

El monitoreo se realizó de manera periódica midiendo la absorbancia del medio de cultivo en crecimiento hasta que ésta llegara a la absorbancia de trabajo, igual a 1, esta lectura se realizó de las mediciones en el medio de cultivo en crecimiento se muestran en la Fig. 3.6 para cada una de las especies.

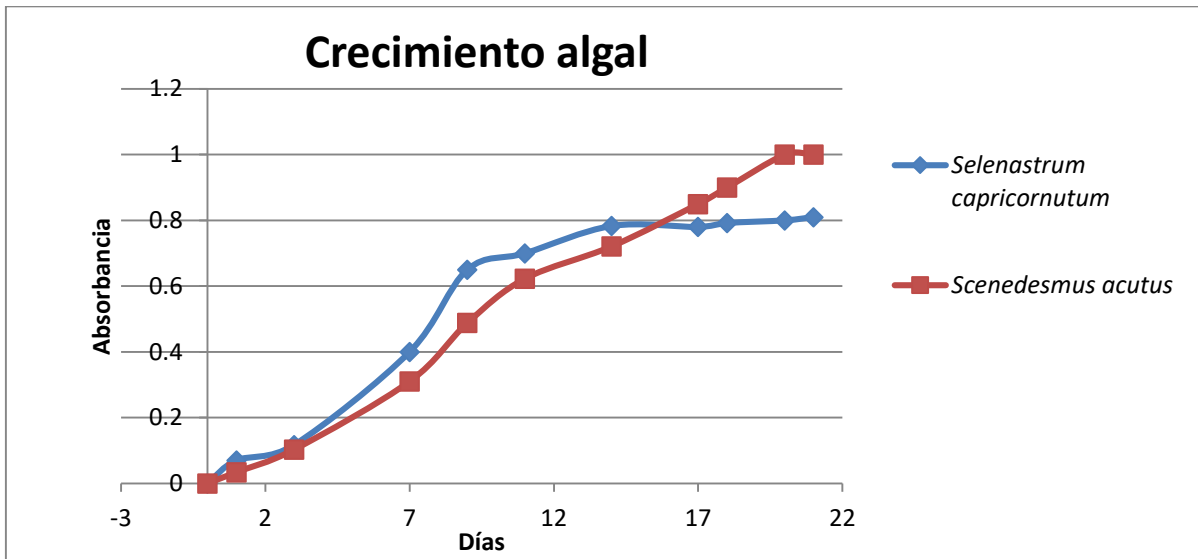


Figura 3.6 Curva de crecimiento de *Selenastrum capricornutum* y *Scenedesmus acutus* a 21 días.

Como se puede observar, ambas especies tienen ritmos de crecimiento similares aunque no iguales. *Selenastrum capricornutum* tiene un ritmo de crecimiento más rápido que *Scenedesmus acutus*.

3.7 Optimización del disco

3.7.1 Tamaño

Se exploraron 3 tamaños diferentes de disco, analizando las características de interés para su óptimo funcionamiento que se mencionan en la tabla 3.8 manejándose una escala cualitativa de 3 niveles, señalada con cruces (+). Estas pruebas se realizaron con 4% de alginato y 2% de CaCl_2 .

Tabla 3.7.1 Optimización de tamaño de los discos de alginato

Cualidades Tamaño	Manejo	Reproducibilidad	Estructura	Gelificación
10 cm	+	++	+	+
6 cm	+	++	+	++
4 cm	++	+++	+++	+++

Bajo (+), Medio (++), Alto (+++)

Como se puede observar en esta tabla 3.7.1, los tamaños de 10 cm y de 6 cm tienen muy bajas puntuaciones en manejo, esto se debe a que por su tamaño no se poseen las herramientas adecuadas para su traslado o extracción del molde sin que se destruyan o deformen. Cuando se habla de la reproducibilidad se tiene que entender que la estructura y la gelificación son variables que la afectan, por lo tanto una pobre gelificación y/o estructura no pueden llevar una buena reproducibilidad; caso que se presenta para los tamaño de 6 y 10 cm, esto se debe a que por su gran tamaño la permeación y contacto del CaCl_2 a todo el disco es difícil, lo cual deja mucho del alginato sin gelificarse dañando la estructura al no ser homogénea. La reproducibilidad que se menciona anteriormente habla sobre la facilidad que tendría el operario en obtener un disco del mismo tamaño, espesor, dureza y opacidad.

Para el caso del disco de 4 cm, se nota una mejora en la reproducibilidad ya que por su tamaño el CaCl_2 logra penetrar en su totalidad el disco, lo cual impacta en una buena estructura y por lo tanto en una buena reproducibilidad, en los otros casos esto no sucede debido a su volumen. El caso del manejo se ve altamente beneficiado ya que al tener una buena estructura y un tamaño pequeño, el manejarlo es más simple. Con los argumentos anteriores se determinó continuar usando al vaso de precipitado de 50 mL como molde para los discos de 4 cm de diámetro.

3.8.2 Solidez y transparencia

A continuación se presentan los resultados obtenidos para la prueba de optimización de solidez, en donde se buscó la mejor combinación de porcentajes de alginato y CaCl_2 , tratando de lograr un punto medio en donde el disco fuera lo suficientemente sólido como para manipularlo sin destruirlo al sacarlo del molde y a la vez que fuera resistente a las condiciones experimentales. Adicionalmente que fuera lo suficientemente permeable para permitir el paso de los hidrocarburos y nutrientes que necesitan las células algales. Vale la pena mencionar que un alginato en extremo sólido se torna blanco y poco permeable, lo cual no permite el paso de la luz hacia las algas al igual que los hidrocarburos y nutrientes.

Tabla 3.8.2 Optimización de solidez

Alginato CaCl ₂	5%	4%	3%	2%
1.5%	No se disuelve el alginato	*Consistencia débil. *Centro no gelificado. *Mala resistencia. *Translúcidos. *Superficie uniforme.	*Consistencia aceptable. *Centro gelificado. *Resistencia media. *Translúcidos. *Superficie no uniforme.	*Consistencia débil. *Centro no gelificado. *Mala resistencia. *Translúcido. *Superficie no uniforme.
2%	No se disuelve el alginato	*Consistencia buena. *Centro gelificado. *Buena resistencia. *Translúcidos. *Superficie uniforme	*Consistencia buena. *Centro poco gelificado. *Buena resistencia. *Translucidos. *Superficie uniforme.	*Consistencia débil. *Centro poco gelificado. *Buena resistencia. * Ligerito tono blanco *Superficie uniforme.
2.5%	No se disuelve el alginato	*Consistencia buena. *Centro gelificado. *Buena resistencia. *Ligerito tono blanco. *Superficie uniforme	*Consistencia buena. *Centro gelificado. *Buena resistencia. *Tono blanco. *Superficie no uniforme.	*Consistencia mala. *Centro gelificado. *Mala resistencia. *Blancos. *Superficie uniforme.
5%	No se disuelve el alginato	*Mala consistencia. *Centro gelificado. *Mala resistencia. *Muy blancos. *Superficie no uniforme.	*Mala consistencia. *Centro gelificado. *Muy mala resistencia. *Muy blancos. *Superficie no uniforme.	*Mala consistencia. *Centro gelificado. *Muy mala resistencia. *Muy blancos, casi amarillos. *Superficie no uniforme.

Nota: Lo marcado de en **negritas** son las condiciones óptimas.

De acuerdo con las observaciones que se hicieron con las diferentes concentraciones de alginato y cloruro de calcio indicadas en la tabla 3.8.2, la solidez ideal para los discos se encontró tomando en cuenta varias cualidades como son un disco completamente translúcido, un centro gelificado, buena consistencia a través de la totalidad del disco, buena resistencia y que la

superficie al momento de la formación fuera uniforme. Estas variables se encontraron al tener 2% de CaCl₂ y 4% de alginato.

Cuando observamos la tabla 3.8.2 se puede notar que las mejores propiedades se encuentran en concentraciones medias, es decir donde se intersectan 4 y 3 % para el alginato y 2 y 2.5 % para el CaCl₂. Esto se debe a que las condiciones del experimento fueron predeterminadas siguiendo lo descrito para perlas por Bernal-Toris (2015), para la optimización de trabajo con perlas donde se partía de 2% para el CaCl₂ y 3% para el alginato. Cuando nos referimos a las condiciones óptimas hablamos de que el alginato sea translúcido, tenga buena resistencia y buena consistencia; éste punto se puede alcanzar a diferentes concentraciones tanto de alginato como de CaCl₂, pero para que este punto se presente en la forma de inmovilización deseada, tenga un centro gelificado y superficie uniforme, existe solo una concentración de alginato y CaCl₂, esto se debe a que el tamaño de la forma y la facilidad con la cual se expone el alginato al CaCl₂ afectara en qué punto se dará la concentración ideal .

3.8.3 Inmovilización de microalgas y pruebas de viabilidad

Al determinar de manera física cuáles eran las condiciones ideales para la fabricación de los discos, se tuvo que demostrar que existiera buen crecimiento microalgal, asegurando así una buena actividad metabólica en las condiciones a experimentar. La concentración de células de iniciales 1C (Abs=1) en la cual se basó inicialmente este trabajo son cercanos a las planteadas por Olmos-Espejel (2013) con la especie *Selenastrum capricornutum*. Posteriormente, con el fin de seguir la lógica de que la remoción se vería mejorada si se aumentara el número de células, se propuso probar la inmovilización y viabilidad de las microalgas con 2 veces la concentración celular inicial (2 C) y 4 veces la concentración celular inicial (4 C). Se tomaron 15 mL de cultivo y la biomasa separada por centrifugación se inmovilizó en tres discos. Posteriormente, estos discos con microalgas se colocaron en matraces con 15 mL de agua potable. Se valoró el crecimiento en el interior del disco en lo que sería un tiempo normal de exposición a los hidrocarburos de 48 horas o menos, y un tiempo de 160 horas, que pudiera sin

duda alguna evidenciar el crecimiento de las algas en el alginato. Después de estos tiempos de incubación, las células se desinmovilizaron y se contaron en una cámara de Neubauer y se observó que aumentó su número, el cuál se calculó de manera porcentual con base en la cantidad inicial.

Tabla 3.8.3.1 Pruebas de crecimiento

Concentración microalgal celular		% de crecimiento		
		1 C	2 C	4 C
48 horas	<i>S. acutus</i>	1%	1%	0%
	<i>S. capricornutum</i>	1%	0.50%	0%
160 horas	<i>S. acutus</i>	11%	11%	4%
	<i>S. capricornutum</i>	12%	4%	2%

En la tabla 3.8.3.1 podemos observar que para todos los casos el crecimiento fue despreciable a las 48 horas, incluso para la concentración más grande inicialmente 4 C utilizada, no hubo crecimiento lo cual nos lleva pensar que el crecimiento es nulo, aunque sí se observó crecimiento notable a las 160 horas, con 1 C con concentraciones mayores de células fue disminuyendo el % de crecimiento, especialmente con 4 C, en especial para *S. capricornutum*. Esto parece indicar que las células se encuentran muy aglomeradas en la forma de inmovilización bajo esas últimas condiciones, lo que les dificulta seguir desarrollándose y podría también afectar su metabolismo y la degradación que pudiesen efectuar. Por lo tanto, este resultado reforzó la decisión de no trabajar la concentración de 4 C de células en pruebas siguientes.

Con la concentración de 2 C al pasar de 48 a 160 horas, aumentó el crecimiento de *S. acutus*, pero no para *S. capricornutum*. Por el contrario, con 1 C, podemos observar crecimientos similares tanto para ambas especies como para ambos tiempos, por lo que se piensa que ambas especies tienen buen acomodo,

viabilidad y metabolismo en estas condiciones trabajadas y por lo tanto buena capacidad para la remoción de hidrocarburos en conjunto ambas especies o solas.

Después de re-incubarlas a las especies desinmovilizadas en medio sólido de cultivo se observaron vivas al microscopio.

Tabla 3.8.3.2 Pruebas de viabilidad.

Concentración de células		1 C	2 C	3 C
Tiempo	Especie	Viabilidad		
48 horas	<i>S. acutus</i>	+	+	+
	<i>S. capricornutum</i>	+	+	+
160 horas	<i>S. acutus</i>	+	+	+
	<i>S. capricornutum</i>	+	+	+

(+) Células vivas.

En la tabla 3.8.3.2 podemos notar que existe viabilidad a cualquier tiempo y a cualquier concentración celular. Es importante mencionar que la viabilidad no significa que se obtendrán buenos resultados en la remoción de HAPs a dichos tiempos y concentraciones, solo significa que la célula puede sobrevivir a las condiciones ya mencionadas.

3.8.4 Agitación y tamaño de matraz para la incubación

A continuación se presentan los resultados que se obtuvieron al tratar de encontrar el mejor recipiente y velocidad de agitación orbital en revoluciones por minuto (rpm) para realizar las exposiciones en matraces. Se buscó que el recipiente fuera lo suficientemente grande como para no desgastar los discos por su contacto entre ellos o con el recipiente durante el movimiento, pero lo suficientemente pequeño para poderlo comparar con los bioensayos realizados en trabajos anteriores y aplicar las mismas metodologías de extracción y exposición a los contaminantes. Para el caso de la velocidad de agitación se buscaron cualidades similares, permitir la mayor cantidad de movimiento sin comprometer la integridad del disco.

La tabla 3.8.4 Presenta las observaciones en la variación de la agitación y el volumen y tipo de recipiente utilizado.

Tabla 3.8.4 Pruebas para la variación de la agitación y tipo de recipiente.

Vol. de matraz RPM	50 mL	125 mL	250 mL
50	*Desgaste en las orillas. *Pocas grietas. *Frágiles. *No hay partículas de alginato en el agua.	*Desgaste leve en las orillas. *Frágiles. *No hay partículas de alginato en el agua.	*No hay desgaste. *No hay partículas de alginato en el agua.
75	*Desgaste significativo. *Múltiples grietas. *Frágiles. *Muchas partículas en el agua.	*Desgaste leve. *Algunas grietas. *Frágiles. *Bastantes partículas en el agua.	*Desgaste leve. *Frágiles. *Pocas partículas en el agua.
100	*Desgaste drástico. *Múltiples grietas. *Pedazos de discos sueltos.	*Desgaste considerable. *Algunas grietas. *Partículas en el agua	*Desgaste leve. *Los discos se juntan y no están distribuidos. *Pocas partículas en el agua.

Iniciamos el análisis con la variable de rpm aplicadas a cada caso, de 50 y 75 mL, lo cual se presenta en la Tabla 3.8.4. Haciendo notar que con 100 rpm se permitió en los matraces que el disco sufriera desgaste, por lo que se descartó trabajar a esta velocidad aunque pudiera resultar mejor un mayor movimiento para la distribución y permeación de hidrocarburos y compuestos necesarios para el crecimiento de las algas. Para el caso de 75 rpm tenemos un caso similar ya que también se presentó una desgaste significativo a los discos, especialmente en los matraces de 50 y 125 mL. Por el contrario, en el matraz de 250 mL no fue tan significativo el desgaste gracias a que hay mayor espacio dentro de este para el movimiento de los discos. Sin embargo, este tamaño podría traer errores al querer comparar resultados con los otros trabajos anteriores que se han realizado en el laboratorio con matraces de 125 mL.

Por último se observa que el comportamiento de 50 rpm, velocidad a la cual León-Santiago (2016) realizó las exposiciones con cuentas en trabajos anteriores, para

el caso del matraz de 50 mL existe desgaste en las orillas del disco y después de la exposición se vuelve frágil lo cual resultó en que este tamaño no se tomara en cuenta para futuros experimentos. Por lo tanto, se determinó trabajar con el matraz de 125 mL a 50 rpm, ya que es un tamaño suficientemente grande como para no desgastar los discos de manera significativa, pero lo suficientemente pequeño como para permitir comparar y usar las mismas metodologías desarrolladas en este estudio. Con respecto a la velocidad de agitación se consideraron suficientes para la permeación correcta de hidrocarburos sin que dañe a los discos.

3.11 Bioensayos en matraz.

3.11.1 Ensayos preliminares de exposición con perlas y discos

A continuación, se presentan los resultados obtenidos de un ensayo preliminar en matraz de 1 hora para BaP para cada especie trabajada, con el objetivo de comparar las formas de inmovilización en la Fig. 3.11.1

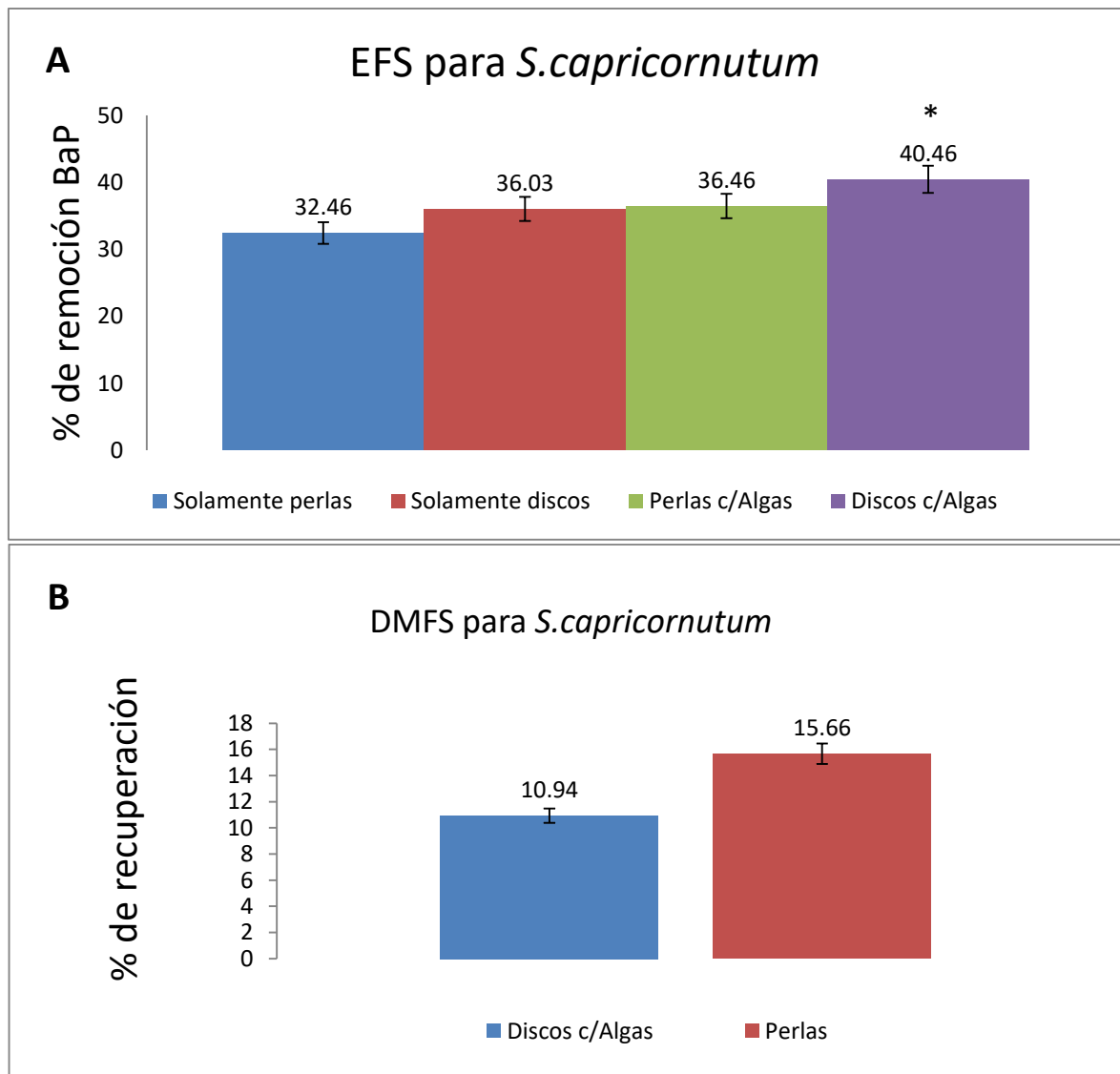


Figura 3.11.1 Porcentaje de remoción de BaP de medio líquido por EFS (A) y recuperación de BaP para biomasa por DMFS (B) con *S. capricornutum*. Comparación de perlas y discos. El asterisco simboliza el mejor porcentaje de remoción. Se trabajó por triplicado.

En la figura 3.11.1 A se muestra que el porcentaje de remoción en medio líquido de *S.capricornutum*, el disco es mayor que el de la perla, ya sea que contenga algas o no. Para el caso de los datos sobre perlas con algas y discos con algas, se podría pensar que teniendo valores tan cercanos no se podría tomar una decisión de cuál remueve mejor, por lo cual se realizó una prueba de “t” con 95 % de confiabilidad para poder decidir esta situación. La prueba “t” demostró que sí hay diferencia significativa entre las poblaciones (Anexo 1). Con el resultado anterior y la amplia diferencia entre las perlas solas y los discos solos, se puede empezar a suponer una mejor remoción por el disco que por la perla. La recuperación del BaP de la biomasa es mayor con las perlas que con los discos (Fig 3.11.1 B)

En la Fig 3.11.2 B del porcentaje de recuperación para DMFS de *S. acutus* se puede también ver diferencias entre ambas formas de inmovilización, ya que se acumula más hidrocarburo en las células que estuvieron en las perlas, lo que lleva a pensar que la forma de inmovilización de perla permite una entrada más abrupta del BaP hacia las algas que a los discos, cosa que no podría ser ideal si su degradación por la microalga es lenta, ya que recordemos que este compuesto es altamente tóxico. El porcentaje de remoción (Fig 3.11.2 A) parece ser mayor con los discos con algas.

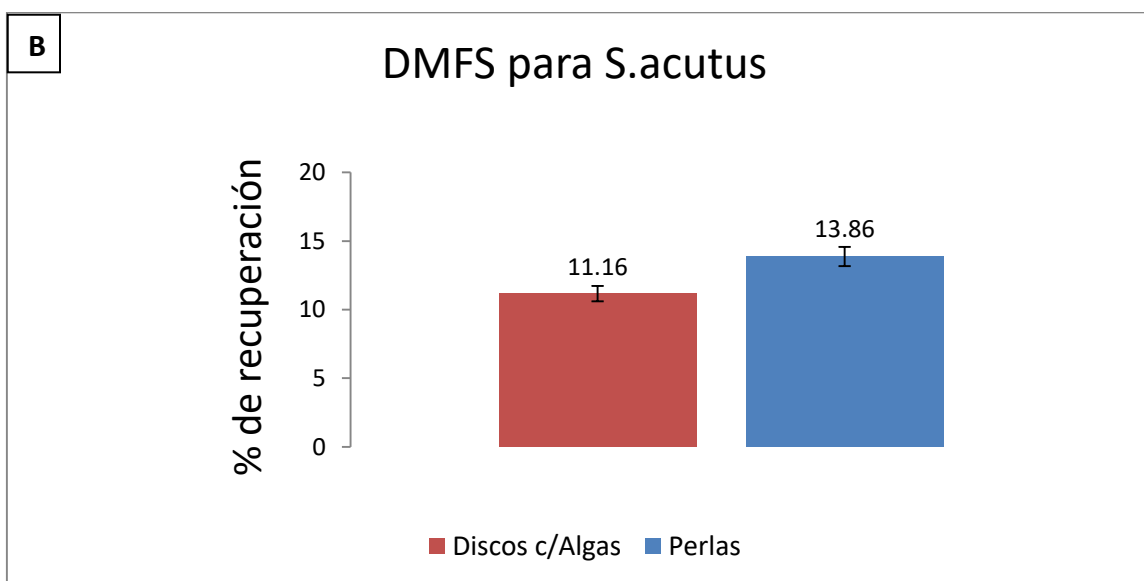
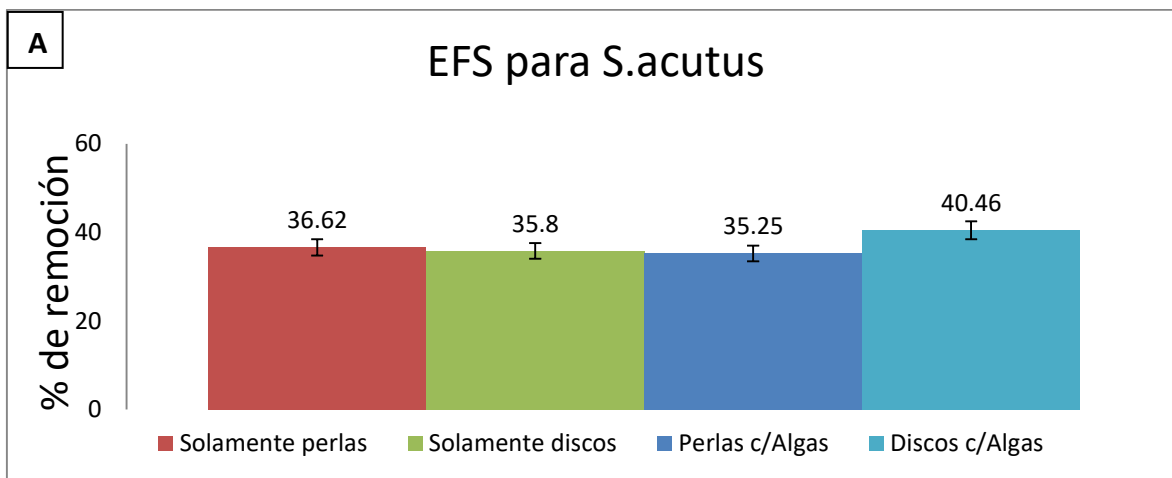


Figura 3.11.2. Porcentaje de remoción de medio líquido por EFS (A) y recuperación para biomasa por DMFS (B) para *S. acutus* para la comparación de tipos de inmovilización previo a la optimización del disco. Se trabajó por triplicado

La diferencia de remoción del medio líquido entre discos y perlas es significativa por lo que indicó la prueba “t” con 95% de confiabilidad (Anexo 1). Atribuyendo que en los resultados analizados para perlas contra discos que contienen a las microalgas, ambos resultan con medias diferentes y cuando se utiliza un disco se tiene un mayor promedio de remoción que con la perla. Por lo anterior, se puede decir que el disco es una forma de inmovilización plausible para la remoción de hidrocarburos. También se encontró que hay diferencia significativa entre la

remoción de los discos o perlas que contienen microalgas y los respectivos blancos que no las contienen (Anexo 1). Lo último indica que la remoción que se lleva a cabo sí es de origen biológico cuando se manejan los organismos inmovilizados. Para el caso *B* el porcentaje de recuperación de los HAPs por DMFS para la biomasa de *S. acutus* se puede observar un comportamiento similar.

En la Fig 3.11.2 B el porcentaje de recuperación de HAPs en la biomasa para *Scenedesmus acutus* resulta bajo, lo cual es positivo, sosteniendo nuevamente que es un compuesto tóxico por lo cual no es ideal que llegue tan velozmente a las células.

Con el trabajo realizado hasta este punto en la investigación, se observó que los discos tenían una posibilidad de funcionar mejor que las perlas, por lo cual se llevó a cabo el proceso de optimización del disco para poderlo colocar en un dispositivo tipo columna.

A continuación se exponen los resultados obtenidos para ensayos de discos en matraz para cada especie e hidrocarburo a diferentes tiempos de exposición y con dos diferentes concentraciones de células (1C y 2C). En la figura 3.11.3 A se presenta el porcentaje de remoción del medio líquido, así como los porcentajes de recuperación del alginato en 3.11.3 B (después de la liberación de las células) y la biomasa para BaP en 3.11.3 C. En la figura 3.11.4, se presenta la misma información para el BaA. En el Anexo 2 se presentan las tablas con los valores de estos experimentos.

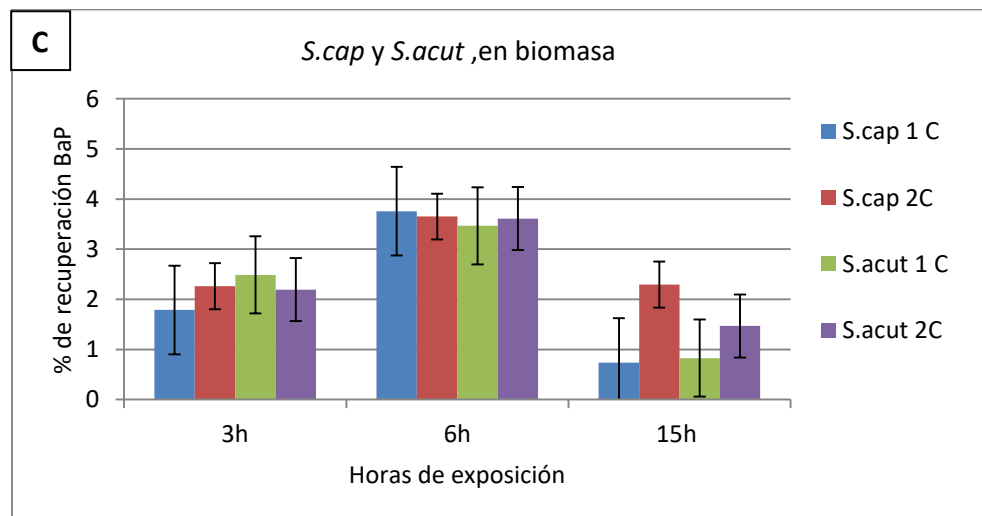
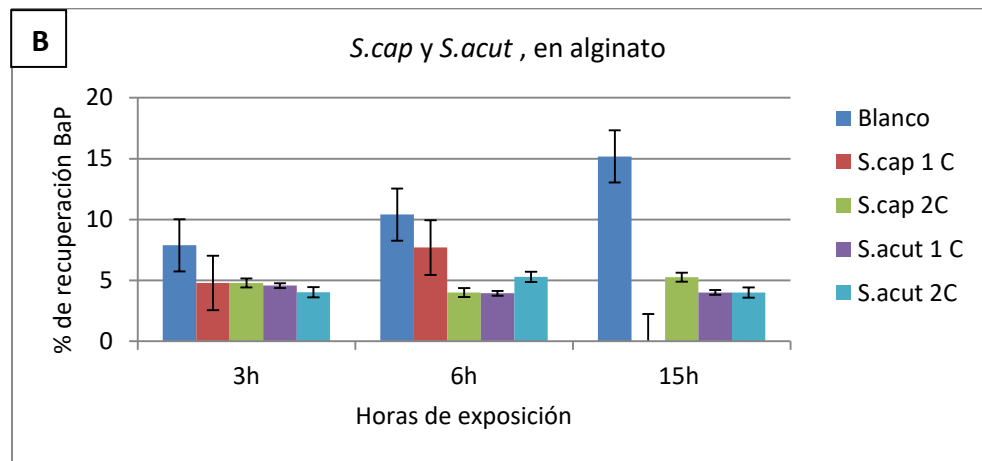
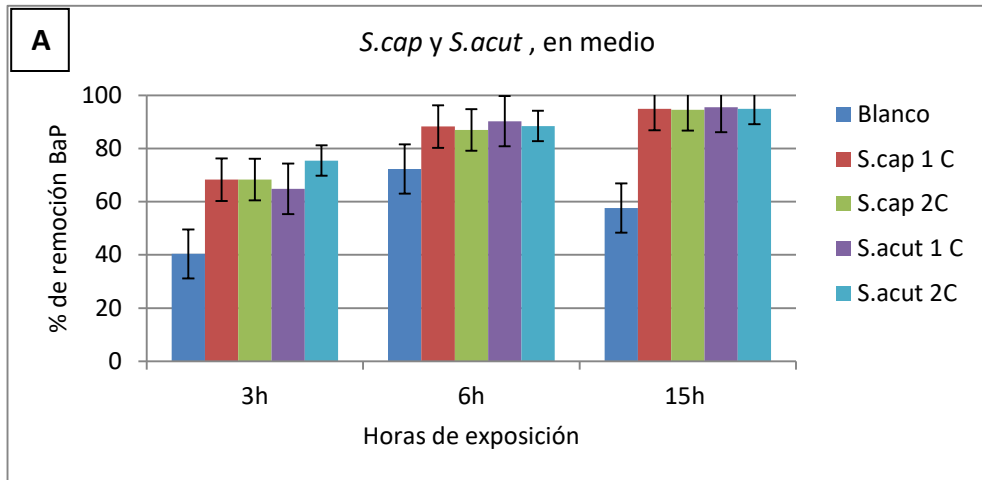


Figura 3.11.3 Porcentajes de A. remoción en el agua potable de BaP; B. recuperación en alginato y C. recuperación en biomasa para ambas especies algales a diferentes tiempos y diferentes cantidades de células.

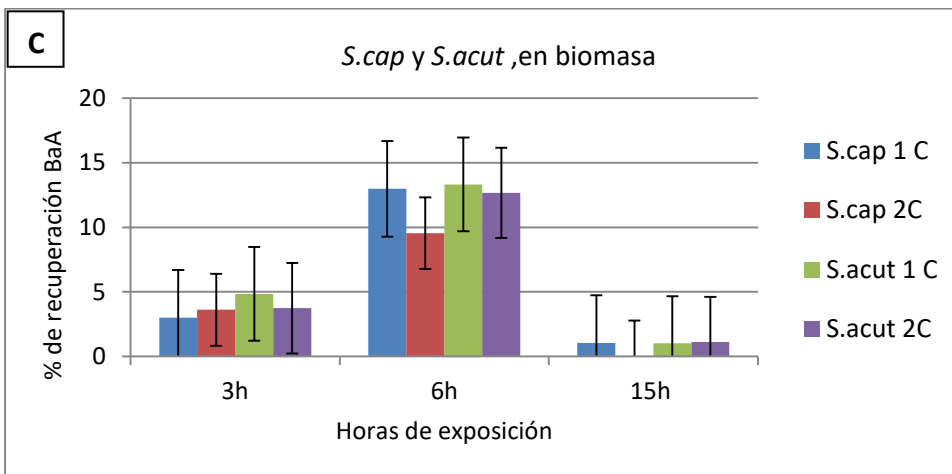
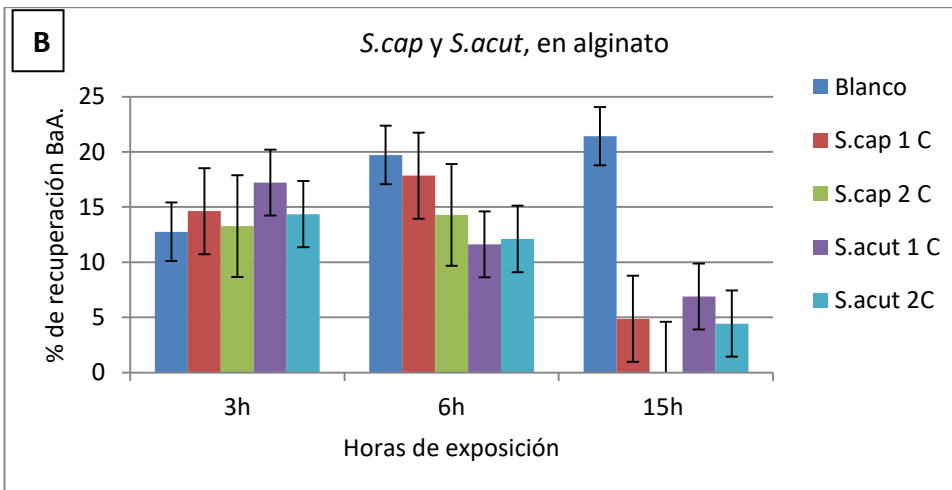
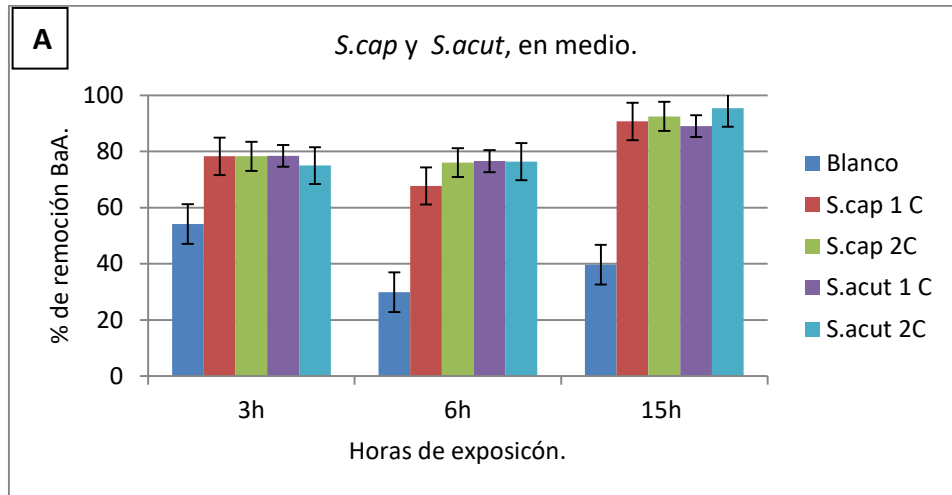


Figura 3.11.4 Porcentajes de *A.* remoción en el agua potable de BaA; recuperación en *B.* alginato y *C.* biomasa para ambas especies algales a diferentes tiempos y diferentes cantidades de células algales.

En referencia a la figuras 3.11.3A y 3.11.4 A en donde se presenta el porcentaje de remoción de BaP y BaA respectivamente, si se realiza una comparación entre los blancos y todas las condiciones trabajadas, se puede notar la capacidad de remoción de las algas en todos los tiempos, ya que los porcentajes de remoción con las microalgas siempre son mayores que en los blancos que no las contienen. Se observa que la máxima remoción se da a las 15 h para ambos HAP y que no hay diferencias en cuanto a manejar 1 C o 2 C. Por otro lado, en las figuras 3.11.3 B y 3.11.4 B que representan a las cantidades de los HAP retenidas en el alginato mismo, se observa que los analitos se retienen aproximadamente entre un 5 y 20% en este material cuando no tuvo microalgas (blancos). Sin embargo, igualmente es notorio que la retención en el alginato que si contuvo microalgas, los porcentajes siempre son menores que en el alginato que no contuvo a las microalgas. Lo anterior podría interpretarse como que aún cuando el material de inmovilización tiene capacidad propia para sorber cierta cantidad de los HAPs, cuando hay microalgas, ésta es captada por los microorganismos en el interior de los discos. Esta suposición parece corroborarse en los tiempos más largos de incubación (15 horas) en donde la diferencia de los HAPs retenidos en el alginato solo y en el alginato con microalgas es mayor.

En las figuras 3.11.3 C y 3.11.4 C que muestran la cantidad de ambos HAP retenida en la biomasa microalgal se observa que se acumula un máximo de los contaminantes en el tiempo de 6 h, pero se nota claramente que esta cantidad disminuye en el tiempo de incubación mayor, correspondiente a 15 h; esta desaparición de la biomasa junto con la del medio de cultivo líquido evidencian que la biodegradación se está efectuando. El comportamiento antes mencionado se puede notar en lo expuesto por Bernal-Toris (2015), en donde se observa una elevación de la cantidad de hidrocarburos en biomasas a tiempos cortos mientras que en tiempos más largos se ve un decrecimiento de la cantidad de hidrocarburo, esto siendo experimentado bajo las mismas condiciones. Si se observan las cantidades acumuladas de ambos hidrocarburos en las biomasas se nota que hay una mayor cantidad de BaP (entre 1 y 2 %) que de BaA ($\leq 1\%$) al tiempo 15 h, esto se debe al peso e hidrofobicidad de los hidrocarburos. En efecto, teniendo el BaP

un peso mayor que y por lo tanto, mayor hidrofobicidad que el BaA, tendrá mayor tiempo de permeación a través del alginato y también una metabolización más lenta por parte de las células, lo cual concuerda con lo expuesto por León-Santiago (2016). La degradación de estos HAP por estas especies de microalgas ha sido evidenciada también en los trabajos del grupo de investigación (Hernández-Blanco y García de Llasera, 2017).

Tabla 3.11.5 Remoción de HAP's a 15 h en ensayos en matraz para las especies algales trabajadas a diferentes cantidades de células algales.

% de Remoción					
HAP	Blanco	<i>S.cap</i>	<i>S.cap</i> 2C	<i>S.acut</i>	<i>S.acut</i> 2C
BaA	40	91	93	88	94
BaP	57.6	94	92	95	93

El porcentaje de remoción se calcula mediante la siguiente fórmula: $100 \times (\text{cantidad añadida} - \text{cantidad recuperada a través del medio}) / \text{cantidad añadida}$. *S.cap* = *Selenastrum capricornutum*, *S.cap* 2C = *Selenastrum capricornutum* con doble de concentración celular o 2 C, *S.acut* = *Scenedesmus acutus*, *S.acut* 2C = *Scenedesmus acutus* con el doble de concentración celular o 2 C. Se trabajó por triplicado.

En la anterior se exponen los porcentajes de remociones porcentuales para ambos hidrocarburos a 15 horas de exposición. Se puede notar que bajo la presencia de microalgas siempre se obtiene mejor remoción, por la amplia diferencia entre los blancos y el resto de experimentos con microorganismos. Cuando se analiza la diferencia entre las cantidades celulares utilizadas se ve que hay poca o ninguna diferencia entre la capacidad de remoción de una y de otra cantidad, por lo que no se justifica el trabajo de usar el doble de células. Por lo anterior, se compararon estadísticamente los resultados obtenidos de remoción en 15 horas para ambas cantidades celulares, 1C y 2C en *S. capricornutum* mediante una ANOVA con 95% de confiabilidad (Anexo 1), dando como resultado que no había diferencia significativa entre ambas cantidades de células.

Finalmente, para poder seleccionar cuáles serían las mejores condiciones a seguir en cuanto a las cantidades de células para el trabajo con la columna de discos, se decidió usar 1 C y no continuar trabajando con 2 C ya que ésta concentración celular implica mayor cantidad de cultivo y mayor tiempo para obtener la Abs=1, y ningún beneficio significativo en la remoción de hidrocarburos. Una explicación al

hecho de que se obtengan remociones parecidas con las diferentes cantidades de células, en vez de que se observara un aumento de la remoción al aumentar la cantidad de células, puede darse porque debe de existir una cantidad de células óptima para el tamaño del disco de alginato utilizado, en donde todos los individuos reciban la misma cantidad de luz para desarrollarse y logren captar sin problemas a los contaminantes que difunden al interior del disco. Al estar muy concentradas las células en el disco de alginato, es posible que los HAPs no lleguen tan eficientemente a las células que están más al interior como a las que a las que están más al exterior.

3.12 Bioensayos de exposición en columna estática

A continuación se presentan los resultados obtenidos de los experimentos realizados con columna estática para ambas especies e hidrocarburos seleccionados, analizando a los HAPs remanentes en el medio, el alginato y la biomasa después de realizar una incubación de 15 h. Se manejaron diferentes posiciones de los discos con las dos especies para poder encontrar la mejor combinación de posicionamiento favorable a la remoción de los hidrocarburos (Fig. 3.12.1 y Fig.3.12.2).

En la Fig 3.12.1 se presentan el porcentaje de remoción del medio líquido (A), así como los porcentajes de recuperación del alginato (B) y la biomasa para BaP (C). En la figura 3.12.2, se presenta la misma información para el BaA. Cabe destacar que en el ensayo del alginato y de la biomasa se analizaron los discos de tres en tres, es decir que en los ensayos *S.cap/S.acut* y *S.acut/S.cap* se diferenciaron los 3 discos que contienen a *S.capricornutum* y los 3 discos que contenían a *S.acutus*. En el anexo 2 se presentan las tablas con los valores de estos experimentos.

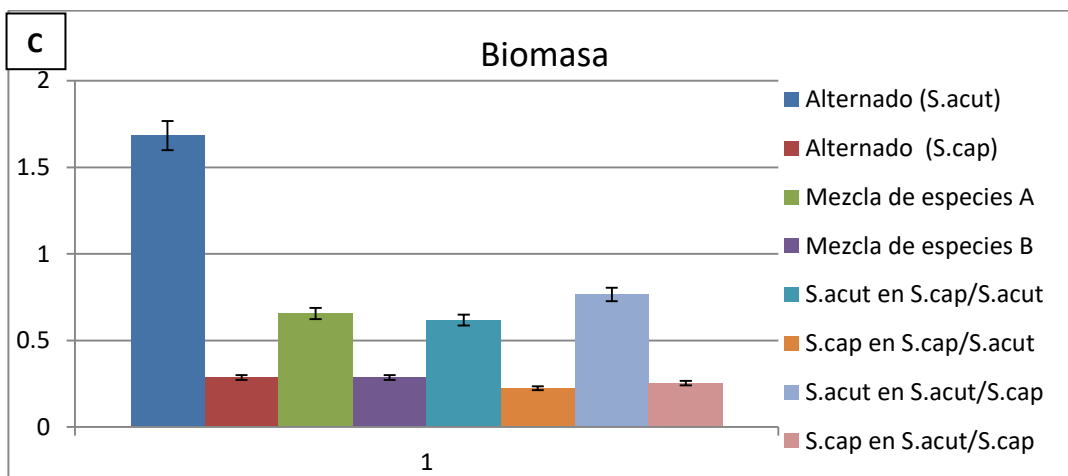
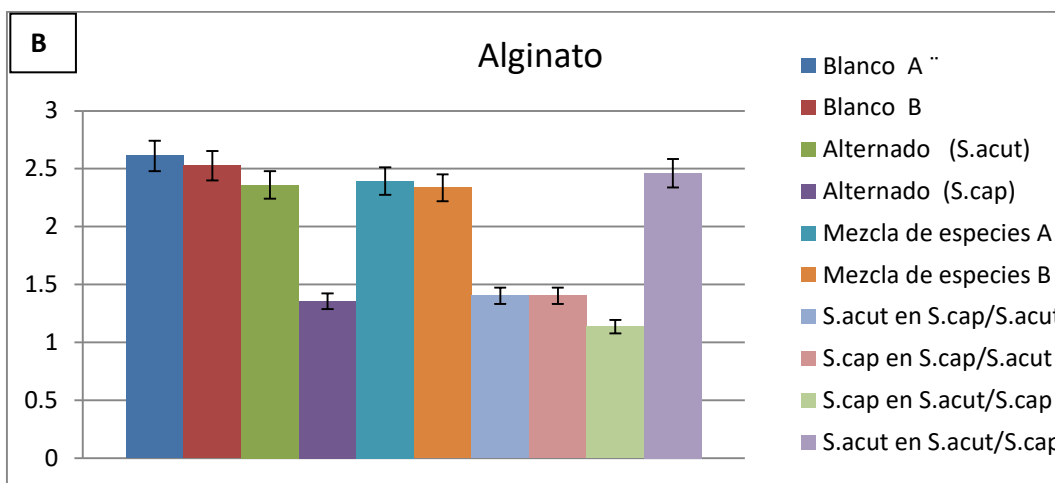
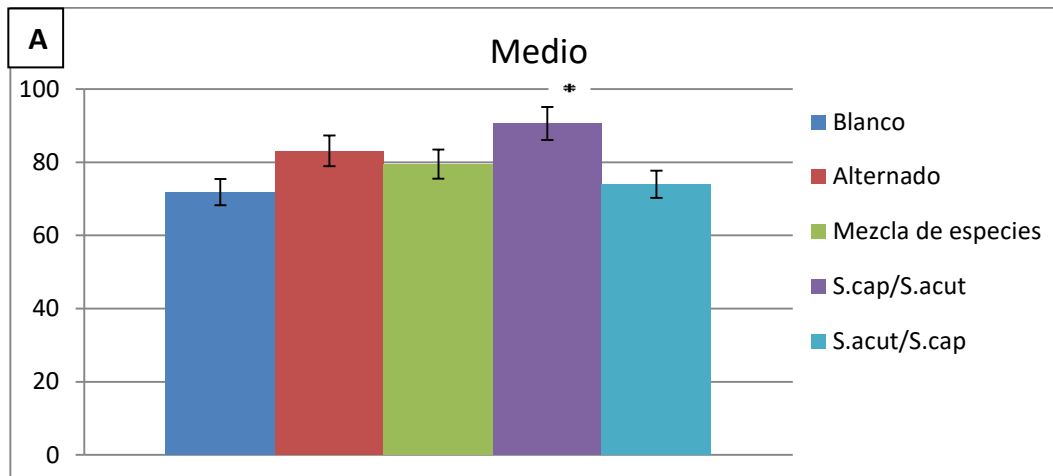


Figura 3.12.1. Porcentajes de A. remoción en el agua potable de BaP; B recuperación en alginato y C. biomasa para ambas especies algales con diferentes posiciones dentro de la columna. Se trabajó por triplicado.*= posicionamiento que resultó con la mejor remoción.

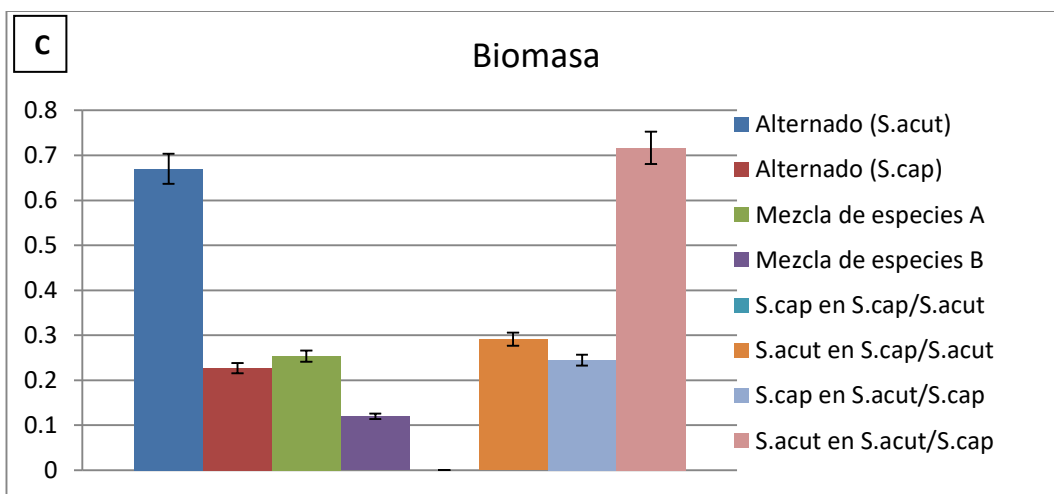
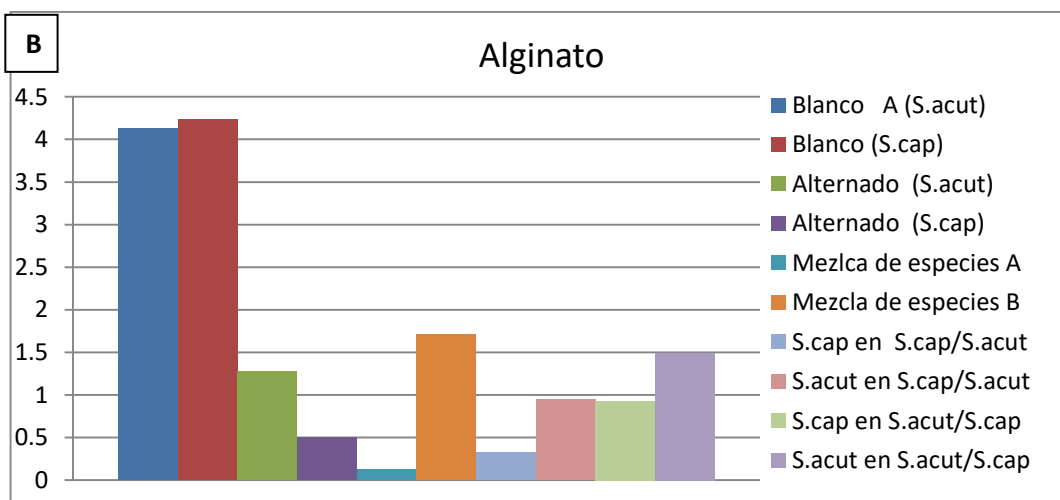
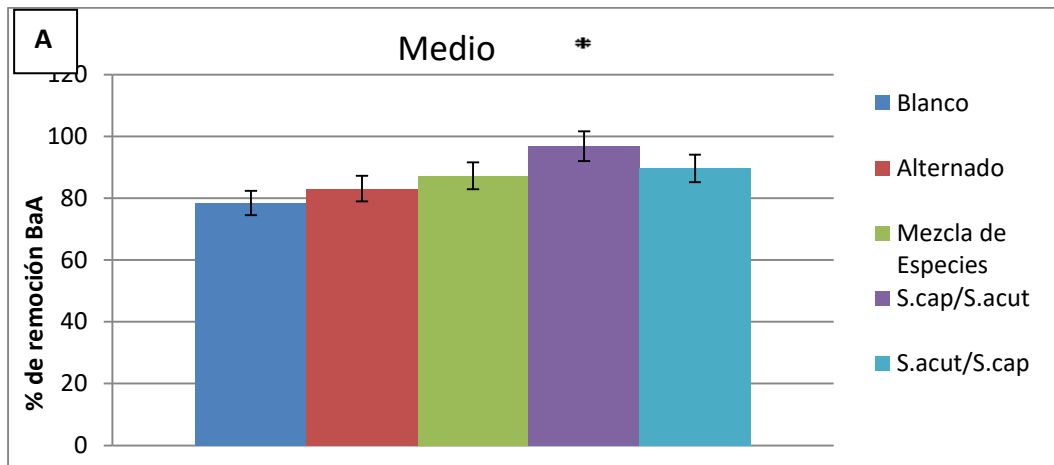


Figura 3.12.2. Porcentajes de a. remoción en el agua potable de BaA; recuperación en b. alginato y c. biomasa para ambas especies algales en diferentes posiciones dentro de la columna. Se trabajó por triplicado. *= posicionamiento que resultó con la mejor remoción.

En la Fig 3.12.1A, se puede notar que en S.cap/S.acut existe una mejor remoción del BaP. El ensayo “alternado” es el que se acerca más al porcentaje de remoción obtenido en S.cap/S.acut. Por lo tanto, para poder determinar cuál de estos dos ensayos es el que remueve mejor, se decide hacer una prueba “t” con 95% de confiabilidad entre ambas poblaciones (Anexo 1), dando como resultado que sí existe una diferencia significativa entre las poblaciones, determinando que S.cap/S.acut resulta ser un mejor arreglo de las posiciones de los discos. Es interesante notar que la posición de las especies si tiene influencia en la remoción porque el ensayo contrario (S.acut/S.cap) no resultó ser muy diferente del Blanco. En el caso del BaA, figura 3.12.2 a, se observa que con S.cap/S.acut se obtiene la mayor remoción, aunque con S.acut/S.cap se obtiene % de remoción muy cercano, por lo que se realiza una prueba “t” con 95% de confiabilidad (Anexo 1), la cual determinó que las poblaciones no son diferentes. En este caso del BaA, no hay diferencia en la remoción debido a la especie de microalga que se encuentra en los lugares de arriba de la columna, contrariamente al caso del BaP, donde sí se observó claramente que es mayor la remoción “cuando *S. cap* es superior” que “cuando *S. acut* es superior”. La explicación a esta diferencia en la remoción de los compuestos puede deberse a que el BaP es un compuesto más pesado e hidrófobo que el BaA y por lo tanto más difícil de biodegradar; considerando esto, se evidencia que *S. capricornutum* es más eficiente para la remoción de estos hidrocarburos. Lo anterior se refuerza con los resultados que se obtienen al analizar las cantidades remanentes de los HAP en el alginato mismo, las cuales se exponen a continuación:

Antes que nada se recuerda que los ensayos de la recuperación de los HAPs del alginato tienen dos tipos de blancos, A y B, esto se debe a que se analizaron los blancos para cada posición; es decir que una columna con 6 lugares, enumerándolos de la parte superior de la columna como 1 a la parte inferior como 6, se tomó a el blanco A como las posiciones nones (1,3 y 5) y a el blanco B como las posiciones pares (2,4 y 6), como se describió en la Fig.2.12.2 de la metodología:

En las figuras 3.12.1 B y 3.12.2 B se observa que los porcentajes de recuperación de los blancos A y B no resultaron ser diferentes entre sí, ya sea para BaP o BaA.

Al comparar los porcentajes de remoción de los blancos de alginato y los del alginato proveniente de ensayos con algas para BaP (Fig. 3.12.1B) se puede notar que la diferencia es exigua con los ensayos “Alternado *S. acut*”, “Mezclas de especies (A y B) y “*S. acut* en *S. acut/S.cap*”; esto se debe también a la gran hidrofobicidad del BaP cuyo proceso de migración del medio líquido a través del alginato hacia las células no ha llegado a su fin porque *S. acutus* al parecer los toma más lentamente e influye en una remoción más lenta cuando está hasta arriba de la columna. Por el contrario, en los ensayos “Alternado *S. cap*”, “*S.cap* cuando *S. cap/S.acut*”, “*S.cap* cuando *S.acut/S.cap*” y “*S. acut* cuando *S. cap/S.acut*” sí se ven diferencias en el porcentaje recuperado del alginato en comparación con el de los Blancos, En estos casos la participación de la especie *S. capricornutum* (ya sea en parte superior o inferior) parece acelerar la captura y degradación de los HAPs adsorbidos al alginato y por lo tanto se ven cantidades remanentes en el alginato menores que los Blancos. Este efecto es más notorio para el BaP que para el BaA (Figura 3.12.2 B).

Por otra parte, al analizar las biomásas obtenidas de los ensayos con BaP, figura 3.12.1C, se puede notar que el “Alternado (*S.acut*)” tiene por mucho la mayor cantidad de hidrocarburo, esto se debe a que como esta especie es la que menos capacidad tiene para degradar hidrocarburos, este se le acumula más tiempo. Esta afirmación se refuerza ya que en las otras posiciones trabajadas con *S. acutus* también se observan los más altos niveles del hidrocarburo, como por ejemplo *S.acut* cuando *S.cap/S.acut* comparado con *S.cap* cuando *S.cap/S.acut*.

Por lo tanto, en los resultados para el BaA de la figura 3.12.2 C se puede recalcar lo ya mencionado anteriormente sobre la capacidad de remoción de cada una de las especies. *S.acut* demostrando valores más altos de hidrocarburo retenido en todas las combinaciones en las que participa; inclusive se observa en esta figura que en el ensayo *S.cap* cuando *S.cap/S.acut*, el % de recuperación se encontró por debajo

del límite de detección. Se demuestra nuevamente que *S.capricornutum* es la especie que mejor degrada a los hidrocarburos. Lo anterior se ha reportado en un estudio comparativo con *S. capricornutum* que degrada más rápidamente al BaP que *S. acutus* (García de Llasera *et al.*, 2016) y por lo mismo *S. acutus* mantiene mayor tiempo a los HAPs acumulados en sus células; ésta especie requiere más tiempo para transformarlos y deshacerse de estos contaminantes de sus células y el medio en general.

Con los resultados anteriores que muestran que la capacidad de remoción de la especie *S. capricornutum* se presentó como más alta para ambos hidrocarburos cuando se utilizó la combinación de S.cap/S.acut. Por lo tanto, se tomó la decisión de utilizarla en las columnas con flujo.

3.13 Bioensayos de columna con flujo en recirculación

En las figuras 3.13.1 y 3.13.2 se presentan los resultados obtenidos para una columna con flujo bajo la combinación de S.cap/S.acut es decir *S.capricornutum* superior (tres discos posiciones 1,2,3) y *S. acutus* inferior (tres discos posiciones 4,5,6) para la remoción y recuperación de ambos hidrocarburos analizando el medio, el alginato y la biomasa resultante de los ensayos con recirculación.

En la figura 3.13.1 A se presenta el porcentaje de remoción del medio líquido comparado con el del Blanco, así como los porcentajes de recuperación del alginato (3.13.1 B) y la biomasa (3.13.1 C) para BaP. En la figura 3.8.2, se presenta la misma información para el BaA.

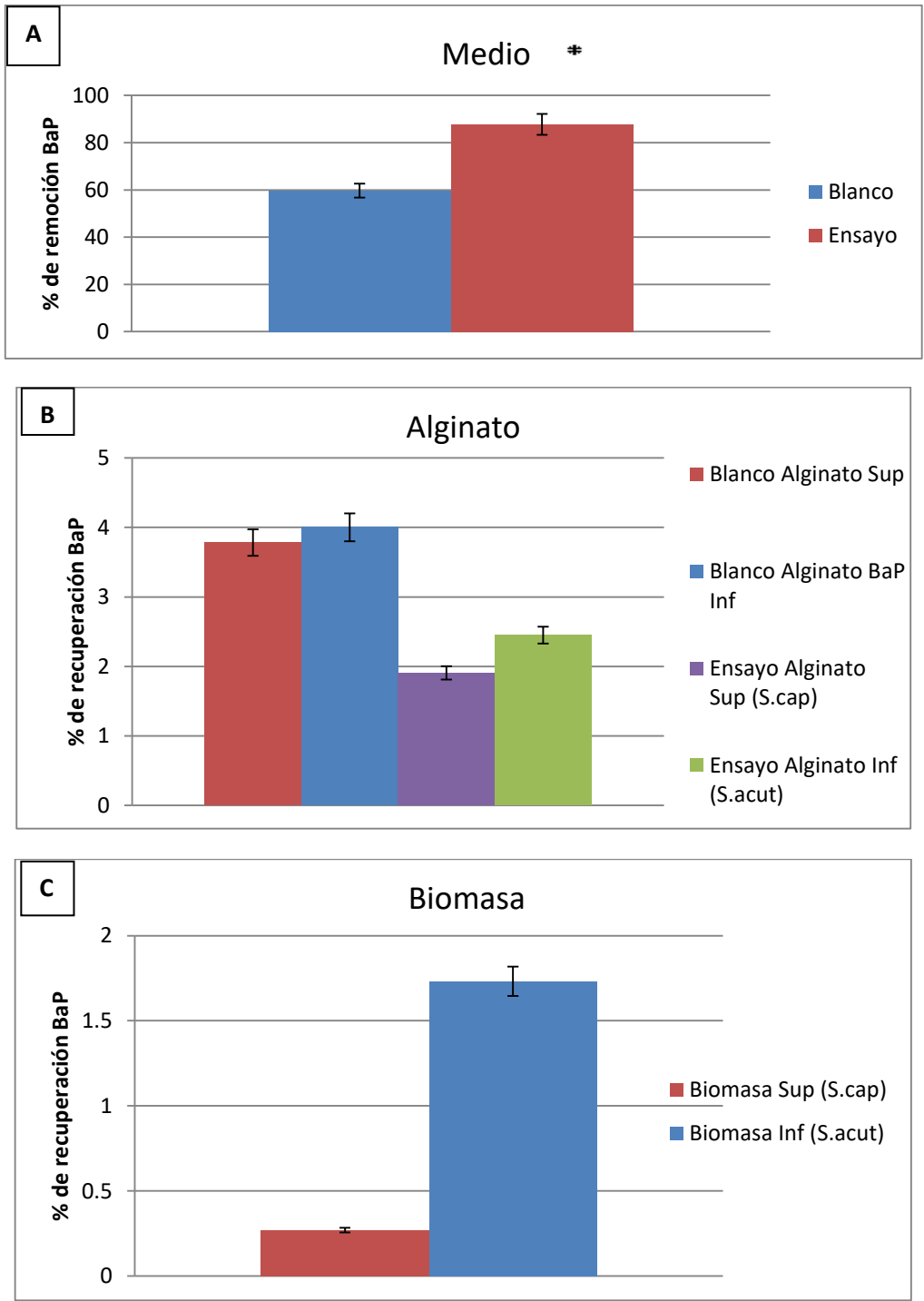


Figura 3.13.1 Porcentajes de A. remoción en el agua potable de BaP; recuperación en B. alginato y C biomasa para ambas especies algales en columna con recirculación. Se trabajó por triplicado. .*= posicionamiento que resultó con la mejor remoción.

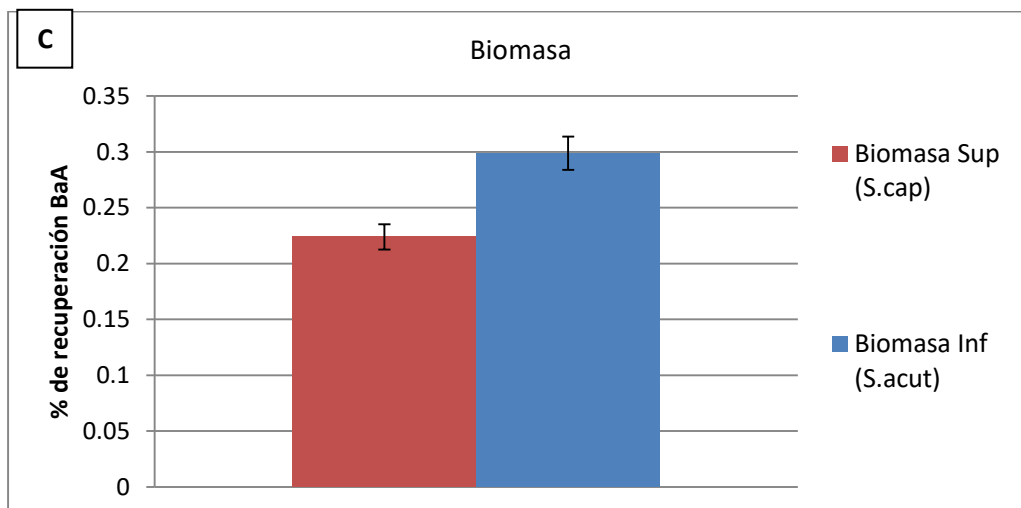
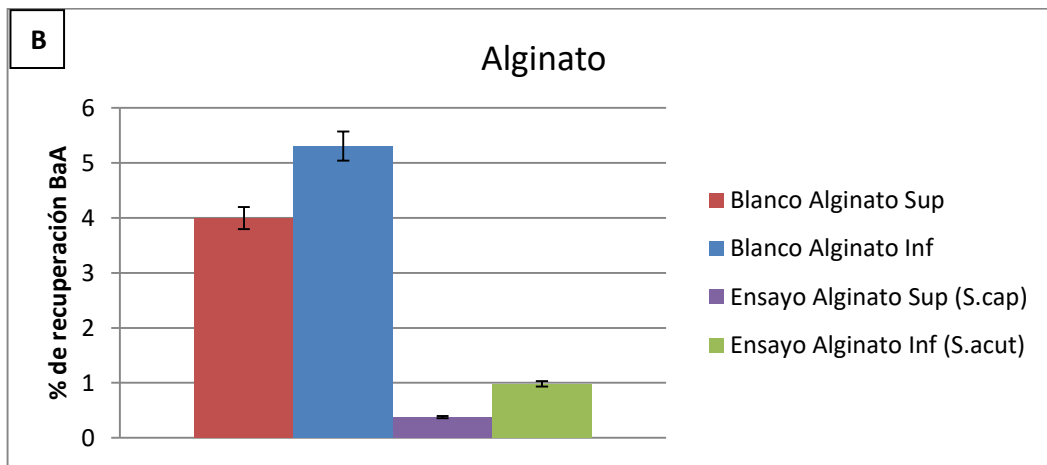
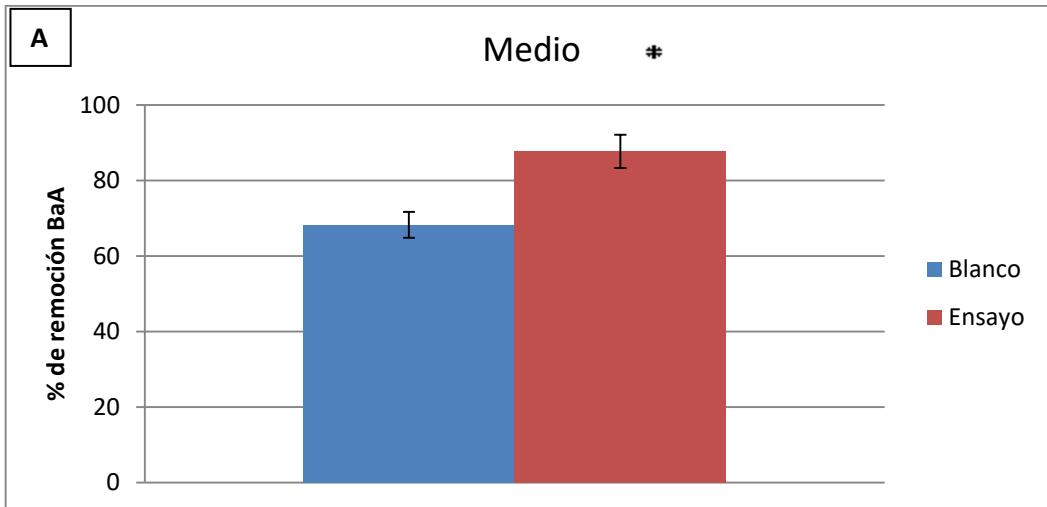


Figura 3.13.2 Porcentajes de A. remoción en el agua potable de BaA; recuperación en B. alginato y C biomasa para ambas especies algales en columna con recirculación. Se trabajó por triplicado.

Para las figuras 3.13.1A y 3.13.2A podemos observar que la diferencia entre los blancos y los bioensayos realizados es notoria, sin embargo, se toma la decisión de hacer una prueba “t” para comprobar dicha declaración con 95% de confiabilidad y se encuentra que las muestras son diferentes (Anexo 1). En ambos hidrocarburos se observa una remoción significativa para la columna con microalgas (bioensayos). La remoción del BaA llega a valores mayores que la del BaP (85% vs. 88%), lo que coincide con las diferencias de tamaño e hidrofobicidad. En el caso del alginato y biomasa se puede corroborar que *S. capricornutum* tiene mejor capacidad de remoción que *S. acutus* como ya se mencionó anteriormente. La combinación con las dos especies, colocando a *S. capricornutum* arriba parece funcionar bien y ser eficiente aún cuando también se incluye discos con *S. acutus* más lento en degradar. Si solamente *S. capricornutum* en la columna, resultaría más difícil desde el punto de vista práctico la obtención de las microalgas para inmovilizar, dado que su crecimiento es más lento que el de *S. acutus*.

Como la capacidad de remoción de *S. capricornutum* es mayor podemos observar, en cuando se analiza su biomasa (Fig. 3.13.1C), que contiene menor cantidad de hidrocarburo que si se compara con la de *S. acutus*. Esto es un reflejo de la capacidad que hemos observado de las microalgas a través de todo el experimento y concuerda con lo esperado. Al compararlo con lo observado en la figura 3.13.2C, podemos ver que en el caso del BaA la diferencia es menor entre ambas especies, esto se cree se debe a el peso de cada hidrocarburo y la facilidad que tienen estas especies algales a procesar cada uno de ellos. El BaA es más fácil de metabolizar debido a su menor peso molecular y así podemos entender el porqué es que ambas especies tienen una capacidad de remoción similar para dicho hidrocarburo.

A continuación se realiza una comparación entre los resultados obtenidos con y sin flujo, los cuales se recopilan en la Tabla 3.13.

Tabla 3.13 Comparación de ensayos con y sin flujo

Ensayo (<i>S.cap/S.acut</i>)	HAP									
	BaP					BaA				
	% de remoción		% de recuperación			% de remoción		% de recuperación		
	Medio	Alginato		Biomasa		Medio	Alginato		Biomasa	
<i>S.cap</i>		<i>S.acut</i>	<i>S.cap</i>	<i>S.acut</i>	<i>S.cap</i>		<i>S.acut</i>	<i>S.cap</i>	<i>S.acut</i>	
Columna estática)	90.6±0.35	1.4±0.08	1.4±0.08	0.22±0.01	0.61±0.01	96.7±0.08	0.32±0.01	0.94±0.03	0.008±0.0	0.24±0.019
Columna con flujo	87.7±0.12	1.9±0.02	2.4±0.06	1.7±0.01	0.26±0.03	85±1.08	0.37±0.01	0.98±0.03	0.29±0.004	0.22±0.003

Al analizar Los datos de la tabla 3.13 se puede observar que en el alginato y biomasa, para ambos hidrocarburos en sistemas con flujo, se obtienen porcentajes de recuperación mayores que en columna estática, aunque la diferencia es exigua. Una vez más se puede deducir la mejor remoción de *S.capricornutum* sobre *S.acutus*, ya que en la mayoría de los casos se tiene un menor porcentaje de hidrocarburos retenidos en células cuando se trabaja con esta especie. Podríamos preguntarnos por qué no se utilizó solamente *S.capricornutum* en todo el trabajo una vez que ya se había determinado que era la mejor especie para remover hidrocarburos. La respuesta es que su tiempo de crecimiento es mayor que el de *S.acutus* y se experimentaron mayor número de contaminaciones con *S.cap* que con *S.acutus* durante el trabajo experimental, por lo que pareció más práctico manejar *S.acutus* en combinación con *S.capricornutum*

Cuando se comparan los porcentajes de remoción para los dos HAP en la columna estática y la de recirculación, la columna estática obtiene mejores resultados que la columna con flujo y al realizar una prueba “t” para el caso BaP (Anexo 1), se evidencia que las medias son diferentes por lo cual se puede decir que la columna estática tiene mejor capacidad para la remoción que la columna con flujo, en especial cuando se trata de BaA. Esto puede resultar ilógico ya que a mayor movimiento se obtendría una mejor permeación y por lo tanto mejor remoción pero puede ser que el uso de flujos no resulte idóneo para los discos porque la

permeación del hidrocarburo podría ser dependiente del tiempo en contacto que pasa con el alginato y al haber un flujo este no tiene la capacidad de permear hacia el alginato y eventualmente el alga.

Para poder entender aún más qué es lo que afecta al disco, podríamos plantear como perspectiva el tratar con varios flujos y variar el tiempo para buscar determinar cuáles son las variables del proceso de migración que experimentan los HAPs a través del alginato.

Sería interesante medir los metabolitos de los HAPs porque podemos saber si es que se está realizando una metabolización o solamente una captura por parte de las algas y de los discos.

Conclusiones

Se encontró que los discos logran tener una mejoría del 5% en la remoción de hidrocarburos en relación con las perlas.

Se optimizaron las mejores condiciones para inmovilizar y asegurar la viabilidad celular de las algas *S.capricornutum* y *S.acutus*, con discos de 4 cm, con concentración de alginato de 4% y de CaCl_2 2%, con una densidad celular de 6.25×10^6 células/mL por disco, agitación 50 rpm en un matraz de 125 mL

Se confirmó que *S.capricornutum* tiene mayor capacidad para remover hidrocarburos que *S.acutus*. Se encuentra que el tiempo para que ocurra la mayor remoción es de 15 h y que la concentración celular más eficiente, debido al tiempo de crecimiento celular y el trabajo que esto implica, es de 1 C por disco.

Se obtiene que la capacidad de remoción se vea un poco afectada negativamente al haber recirculación, encontrando una diferencia entre recirculación y no recirculación de entre 3 y 9 %, aunque se debería hacer más investigación al respecto del flujo.

Se logró la remoción de Benzo(a)Pireno y Benzo(a)Antraceno en medio acuoso por medio de las algas *Selenastrum capricornutum* y *Scenedesmus acutus* inmovilizadas en discos de alginato a través de una columna, llegando a un valor máximo de remoción del 97%.

Se podría buscar realizar una aplicación para limpiar aguas provenientes de procesos industriales o de la extracción de hidrocarburos. Para escalar el proceso el paso más difícil sería la producción masiva de los discos, se puede pensar en un molde que permita el paso del CaCl_2 manteniendo una cierta forma, por ejemplo membrana para dializar. Otro método podría ser el realizar una mezcla de todos los componentes y de manera rápida colocarla en un molde para su posterior endurecimiento.

Bibliografía:

- Achten, C., Hofmann, T. 2009. Native polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in coals – A hardly recognized source of environmental contamination, *Science of the Total Environment*, 407. pp:4 6 1 – 2 4 7 3.
- Agirman, N., Bedil, B., Kendirlioglu, G., Cetin, K.2015. Toxic Effects of Fungicides (Penconazole and Triadimenol) on Growth and Protein Amount of *Scenedesmus acutus*. *Journal of the Chemical Society of Pakistan.*, Vol. 37, No. 06,pp: 1220-1225.
- Akyuz M, Cabuk H. 2010. Gas-particle partitioning and seasonal variation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the atmosphere of Zonguldak, Turkey. *Sci Total Environ.*22.pp:8.
- Almaul, S.2005. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Steelmaking, *Environmental Forensics*. 6.pp:143–150.
- An-Ping L., Zhang-Li H., Yuk-Shan W., Nora Fung-Yee T.2007. Removal of Xoranthene and pyrene by diferent microalgal species. *Bioresource Technology.*98.pp: 273–280.
- Armstrong, B., Hutchinson, E., Unwin, J., Fletcher, T.2004. Lung Cancer Risk after Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: A Review and Meta-Analysis. *Environmental Health Perspectives.*112.pp:970-978.
- Baklanov A., Hänninen O., Slørdal LH., Kukkonen J., Bjergene N., Fay B., *et al.* 2007.Integrated systems for forecasting urban meteorology, air pollution and population exposure. *Atmospheric Chemistry and Physics.*7.pp:855–74.
- Barker,S.2006. Review Matrix solid phase dispersion (MSPD). *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 70. pp: 151–162.
- Barker, S.2000. Applications of matrix solid-phase dispersion in food analysis. *Journal of Chromatography A.*,880. pp:63-68.
- Bernal-Toris D.(2015).Evaluación de la capacidad de *Selenastrum capricornutum* inmovilizada en alginato para remover Benzo(a)pireno de medio de cultivo acuoso(Tesis de licenciatura), Facultad de Química, UNAM.
- Bischoff, H., Bold, H.1963. Phycological studies 4.Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species.University of Texas Publication, 6318, pp: 95.

Borde, B., Guieysse, O., Delgado, R., Munoz, R., Kaul, C., Nugier-Chauvin, H., Patin, B., Mattiasson, 2003. Synergistic relationships in algal-bacterial microcosms for the treatment of aromatic pollutants. *Bioresource Technology*. 86 293.

Brinkhuis, P. 2001. Toxicology information from US government agencies. *Toxicology*. 157. pp: 25-49.

Buseti, F., Heitz, A., Cuomo, M., Badoer, S., Traverso, P. 2006. Determination of Sixteen Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Aqueous and Solid Samples from an Italian Wastewater Treatment Plant. *Journal of Chromatography A* .1102, pp:104 – 115.

Camel, V. 2003. Solid phase extraction of trace elements, *Spectrochimica Acta Part B*, 58. pp:1177–1233

Canadian Council of Ministers of the Environment. 2010. Canadian Soil Quality Guidelines for the Protection of Environmental and Human Health. pp:01.

Cassidy, M., Lee, H., Trevors, T., 1996. Environmental application of immobilized cells: a review. *Journal of Industrial Microbiology*. 16, 79–100.

Cerniglia, E. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation*. 3: 351-368.

Cerniglia, E. 1984. Microbial Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. 30. pp: 33-34.

Croftcheck, C., Shea, A., Montross, M., Crocker, M., Andrews, R. 2012. Influence of media composition on the growth rate of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus* utilized for CO₂ mitigation. *Journal of Biochemistry and Technology*. 4. pp:589-594.

De-Bashan, E., Bashan, Y. 2010. Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects. *Bioresource Technology*. 101. pp:1611-1627.

Diaz-Flores, G. Evaluación de la biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos por la microalga *Selenastrum capricornutum* mediante la metodología de extracción en fase sólida y dispersión de matriz en fase sólida acoplado a CLAR-UV (Tesis de licenciatura). Facultad de Química UNAM. Ciudad de México.

Dijkman, A., Peter, I., Vlaardingen, L., Admiraal, A. 1996. Biological variation in sensitivity to n-heterocyclic PAH's; effects of acridine on seven species of microalgae. *Environmental Pollution*. 1. pp:121-126.

Environmental Protection Agency Office of Solid Waste. 2008. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons PAH's. pp: 1-3.

García-Falcoá, S., Rez-Lamela, P., Simal-Gaá, J.2004. Comparison of Strategies for Extraction of High Molecular Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Drinking Waters, *Journal of Agriculture Food and Chemistry*, 52,pp: 6897-6903.

García de Llasera, M., Olmos-Espejel, J., Díaz-Flores, G., Montaña-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*. 23. pp: 3365–3375.

García de Llasera, M., García-Cicourel, A. 2017. On-line SPE chromatography with spectrophotometric diode array detection as a simple and advantageous choice for the selective trace analysis of benzo(a)anthracene degradation products from microalgae. *Talanta*.165.p: 584-592.

Gauthier, T., Norwood, P., Prepas, E., Pyle, G.2014. Metal-PAH mixtures in the aquatic environment: A review of co-toxic mechanisms leading to more-than-additive outcomes. *Aquatic Toxicology*. 154: 253-269.

Gramss, G., Kirsche, B., Voigt, K., Gunther, T., Fritsche, W.1999. Conversion rates of five polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid cultures of fifty-eight fungi and the concomitant production of oxidative enzymes. *Mycological Research* .103. pp: 1009-1018.

Gupta, H., Pathak, B., Fulekar, M.2015. Molecular approaches for biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon compounds: a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*.14.p:241–269.

Hagen, J.2012. Five Kingdoms, More or Less: Robert Whittaker and the Broad Classification of Organisms. *BioScience* .62. pp:67-74.

Haritash, A.,Kaushik, C. 2009. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials*.169. pp:1-15.

Harrak, R., Calull, M., Marce, M., Borrull, F.1998. Influence of the Organic Solvent in On-Line Solid Phase Extraction for the Determination of PAHs by Liquid Chromatography and Fluorescence Detection. *Journal of Separation Science*.21. 667-670.

Hernández Blanco, F., García de Llasera, M.2016. Monitoring dihydrodiol polyaromatic hydrocarbon metabolites produced by the freshwater microalgae *Selenastrum capricornutum*,Chemosphere. 158, pp: 80-90.

Hong Y., Yuan D., Lin Q., Yang T.2008. Accumulation and biodegradation of phenanthrene and fluoranthene by the algae enriched from a mangrove aquatic ecosystem. Marine Pollution Bulletin.56.pp:1400-1405.

Jeffrey, W., Gail,S .,Irvine, V., Daniel, H., Jacek, M., Maselko, J., Pella, R., Lindeberg, James., William, P.,Stanley, P.2007. Slightly Weathered Exxon Valdez Oil Persists in Gulf of Alaska Beach Sediments after 16 Years. Environmental Science and Technology. 41.pp: 1245-1250.

Jie, W., Xin, L., Dong, L., Yan, D., Liang, M., Wenjian, L., Jihong, C., Fuli, L., Yong, F., Guangrong, H., Jufang, W.2016. Photosynthetic Effect in *Selenastrum capricornutum* Progeny after Carbon-Ion Irradiation.pp:1-14.

Karel, F., Libicki, B., Robertson, R.1985. The immobilization of whole cells-engineering principles. Chemical Engineering Science. Sci. 40. pp:1321–1354.

Kayillo, S., Gary, R., Dennis, R., Shalliker, A. 2006. An assessment of the retention behaviour of polycyclic aromatic hydrocarbons on reversed phase stationary phases: Selectivity and retention on C18 and phenyl-type surfaces.Journal of chromatography A.1126. 283-297.

Kayillo, S., Gary, R., Dennis, R., Shalliker, A.1997. An assessment of the retention behaviour of polycyclic aromatic hydrocarbons on reversed phase stationary phases: Selectivity and retention on C18 and phenyl-type surfaces. Journal of Chromatography A. 1126.pp:284-296.

Ke, K., Luo, L., Wang, P., Luan, T., Fung-Yee, N.2010. Effects of metals on biosorption and biodegradation of mixed polycyclic aromatic hydrocarbons by a freshwater green alga *Selenastrum capricornutum*. Bioresource Technology. 101.pp:6950-6961.

Ki-Hyun, K., Shamin, A., EhsanulKabir, C.2013. A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. Environment International.60.pp:71–80.

Kirk, T., Semple, B., Cain, S.1999. Biodegradation of aromatic compounds by microalgae.FEMS Microbiology letters 170.pp: 291-300.

Landrum, P., Bartell, M., Giesy, P., Bowling, W. 1984. Fate of anthracene in an artificial stream: A case study, *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Volume 8, pp:183-201.

León-Santiago, M. 2016. Bioremoción de contaminantes orgánicos de medio acuoso con sistemas algales (Tesis de maestría). UNAM. Ciudad de México.

Ley federal de derecho/disposiciones aplicables en materia de agua nacionales”, Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales (SEMARNAT), Comisión Nacional del Agua (CONAGUA).

Leversee, G., Giesy, J., Landrum, P., Gerould, S., Bowling, J., Fannin, T., Haddock, J., Bartell, S. 1982. Kinetics and Biotransformation of benzo(a)pyrene in *Chironomus riparius*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 11, pp:25-31.

Lei, Y., Tam, N. 2007. Removal of pyrene by different microalgal species. *Water Science and Technology*. 46, pp: 195–201.

Lijuan, L., Ping, W., Li, L., Tiangang, L., Lin, K., Fung, T. 2014. Removal and transformation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons in water by live and dead microalgae. *Process Biochemistry*. 49, pp: 1723–1732.

Lin, K., Lijuan, L., Ping, W., Tiangang, L., Fung-Yee, T. 2010. Effects of metals on biosorption and biodegradation of mixed polycyclic aromatic hydrocarbons by a freshwater green alga *Selenastrum capricornutum*. *Bioresource Technology*. 101, pp: 6950–6961.

Lindquist, B., Warshawsky, D. 1985. Identification of the 11,12-dihydro-11,12-dihydroxybenzo(a)pyrene as a major metabolite produced by the green alga, *Selenastrum capricornutum*. *Biochemical and biophysical research communications*. 130, pp: 71-75.

Madigan, T., Martinko, M., Dunlap, V. 2009. En *Biología de los microorganismos* 51. España: PEARSON.

Marce, M., Borrull F. 2000. Solid-phase extraction of polycyclic aromatic compounds, *Journal of Chromatography A*. 885, pp: 273–290.

Moreno-Garrido, I. 2008. Microalgae immobilization: Current techniques and uses. *Bioresource Technology*. 99, pp.3949-3964

Moreno-Garrido, I., Campana, O., Lubián, L., Blasco, J. 2005. Calcium alginate immobilized marine microalgae: Experiments on growth and short-term heavy metal accumulation. *Marine Pollution. Bull.* 51, pp:823–929.

Nicole, A., Dijkman, I., Peter L., Vlaardingen, V., Admiraal, A.1996. Biological variation in sensitivity to n-heterocyclic PAHs; effects of acridine on seven species of micro-algae. *Environmental Pollution*. 95. pp. 121-126.

Ning, Q., Wei, H., Xiang-Zhen, K., Wen-Xiu, L., Qi-Shuang, H., Bin, Y., Qing-Mei, W., Chen, Y., Yu-Jiao, J., Jorgensen, E., Fu-Liu, X., Xiao-Li, Z.2014. Distribution, partitioning and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in the water-SPM-sediment system of Lake Chaohu, China. *Science of the Total Environment*.496.pp: 414-423.

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.

Oliferova, L., Statkus, M., Tsysin, G., Zolotov, Y.2005. On-line solid-phase extraction and HPLC determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water using fluorocarbon polymer sorbents, *Analytica Chimica Acta* 538:pp35-40.

Olmos Espejel, J. 2013. Metodologías cromatográficas en línea para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en cultivos de microorganismos. Tesis de doctorado Facultad de Química. UNAM.

Patrick, T., Gauthier, A., Warren, P., Norwood B., Ellie, E., Prepas, A., Greg, G .2014. Metal-PAH mixtures in the aquatic environment: A review of co-toxic mechanisms leading to more-than-additive outcomes. *Aquatic Toxicology*.154. pp: 253-269.

Pena, T., Casais, C., Mejuto, C., Cela, R. 2007. Optimization of the matrix solid-phase dispersion sample preparation procedure for analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils: Comparison with microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 1165, pp: 32-38.

Pena, M., Casais, M., Mejuto, M., Cela, R. 2008, Development of a matrix solid-phase dispersion method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge samples, *Analytica Chimica Acta*. 626 , pp: 155-165.

Pettit, E .2008. Organic matter, humus, humate, humic acid, fulvic acid and humin: their importance in soil fertility and plant health, Internal Publication of Texas A&M University.1. pp:1-17.

Pica, Y., Ronco, A., Diaz, M.2004. Ensayo de toxicidad crónica con el alga *Selenastrum capricornutum* (*Pseudokirchneriella subcapitata*) por el método de enumeración celular basado en el uso de hemocitometro Neubauer.2.pp:69-87.

Ping, W., Lijuan, L., Lin, K., Tiangang, L., Fung-Yee, T. 2013. Combined toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals to biochemical and antioxidant responses of free and immobilized *Selenastrum capricornutum*.32.pp: 673-683,

Ramesh, A., Archibong, A., Hood, D., Guo, Zhongmao, G., Loganathan, B. 2011. Global Environmental Distribution and Human Health Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Research Gate. 10. pp: 95-125.

Rubio-Clemente, A., Torres-Palma R., Peñuela G. 2014. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous environment by chemical treatments: A review. Science of the Total Environment. 478. pp: 201–225.

Sánchez-Brunete, C., Miguel, E., Tadeo, J. 2007, Analysis of 27 polycyclic aromatic hydrocarbons by matrix solid-phase dispersion and isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry in sewage sludge from the Spanish area of Madrid, Journal of Chromatography A, 1148 , pp: 219–227.

Snyder, L. 1992. Chromatography, Part A: fundamentals and techniques. Del Journal of Chromatography Library. 5. pp: A25-A26.

Snyder, R., Kirkland, J., Glajch, L. 1997. Practical HPLC Method Development.

Smidsrød, O., Skjak-Braek, G. 1990. Alginate as immobilization matrix for cells. Tibtech. 8. pp: 71–78.

Szu-Chich, C., Chung-Min, L. 2006. Health risk assessment on human exposed to environmental polycyclic aromatic hydrocarbons pollution sources. Science of the Total Environment. 366. pp: 112-123.

Tampion, J. (1987). Immobilized Cells: Principles and Applications. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 257 pp.

Thomson, Skoog, West, Holler, Crouch. Fundamentos de Química Analítica. International Thomson Editores S. A. de C.V., 8ª Edición, México, p.p. 970, 2005.

UNAM. Facultad de Química. 2007. Técnicas Cromatográficas. Ciudad de México. Publicaciones internas FQ. pp. 1-123.

United States Environmental Protection Agency. 1986. METHOD 8100 POLYNUCLEAR AROMATIC HYDROCARBONS. pp. 1-10. <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/8100.pdf>

United States Environmental Protection Agency. 1986. METHOD 8310 POLYNUCLEAR AROMATIC HYDROCARBONS. pp. 1-13. <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/8310.pdf>

Vale´rie, C. 2003. Solid phase extraction of trace elements. Spectrochimica Acta Part B 58. pp. 1177–1233.

Warshawsky, D., Cody, T., Radike, M., Reilman, R., Schumann, B., LaDow, K., Schneider L. 1995. Biotransformation of benzo[a]pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic analogs by several green algae and other algal species under gold and white light. *Chemico-Biological Interactions*. 97.pp: 131 – 148.

World Health Organization International Agency For Research for Cancer. 2010. Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 92 pp: 776.

Y, Kourkoutas., Bekatorous, A., Banat, M., Marchant, R., Koutinas, A. 2004. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review *Food Microbiology*. 21 .pp: 377–397.

You-Wei, H., Dong-Xing, Y., Qing-Mein, L., Ting-Lin, Y. 2008. Accumulation and biodegradation of phenanthrene and fluoranthene by the algae enriched from a mangrove aquatic ecosystem. *Marine Pollution Bulletin* .56.pp: 1400–1405

Żwir-Ferenc , A., Biziuk, M. 2006. Solid Phase Extraction Technique – Trends, Opportunities and Applications. *Polish J. of Environ. Stud.* 15: 677-690.

Anexo 1.

Prueba de normalidad para los datos trabajados.

Hipótesis para prueba de normalidad:

H₀: La distribución observada se asemeja a la normal.

H₁: La distribución observada no se asemeja a la normal.

Se trabaja con un alfa de 0.05.

Pruebas de normalidad

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
DiscosalgasS.cap	.303	3	.	.909	3	.414
PerlasalgasS.cap	.292	3	.	.923	3	.463
BaPDiscosenmedioS. capC	.337	3	.	.854	3	.250
BaPDiscosenmedioS. cap2C	.215	3	.	.989	3	.799
BaADiscosenmedioS. capC	.176	3	.	1.000	3	.987
BaADiscosenmedioS. cap2C	.286	3	.	.931	3	.494
BaPcolumSS.cap	.242	3	.	.973	3	.685
BaPcolumSAlternado	.178	3	.	1.000	3	.960
BaAcolumnSS.cap	.228	3	.	.982	3	.744
BaAcolumnSS.acut	.191	3	.	.997	3	.898
BaPblancoFlujo	.262	3	.	.956	3	.596
BaPensayoFlujo	.178	3	.	.999	3	.952

Pruebas de normalidad

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
SolamentePerlas	.367	3	.	.792	3	.096
PerlasAlgas	.385	3	.	.750	3	.000
SolamenteDiscos	.367	3	.	.794	3	.100
DiscosAlgas	.367	3	.	.793	3	.098

a. Corrección de significación de Lilliefors

Figura A.1 Prueba de normalidad para datos con prueba t.

Pruebas de normalidad						
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
S.acutBaPC	.334	3	.	.860	3	.266
S.acutBaP2C	.239	3	.	.975	3	.696
S.acutBaAC	.219	3	.	.987	3	.780
S.acutBaA2C	.357	3	.	.816	3	.152

a. Corrección de significación de Lilliefors

Figura A.2 Prueba de normalidad para ANOVA.

Pruebas de normalidad							
VAR00001		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
BaPSinF	1.00	.242	3	.	.973	3	.685
BaASinF	1.00	.228	3	.	.982	3	.744
BaPconF	1.00	.178	3	.	.999	3	.952
BaAconF	1.00	.354	3	.	.822	3	.169

Figura A.3 Prueba de normalidad para comparación de columna estática y con flujo.

Con una significación de contraste (Sig) mayor a 0.05 en todas las pruebas no se rechaza H_0 , las pruebas de normalidad indican que no hay prueba suficiente para rechazar la normalidad de la variable.

Comparación de medias.

Prueba t para Perlas vs Perlas con algas, *S.acutus*:

Hipótesis:

H_1 =Existe una diferencia significativa entre la media de remoción de Perlas y Perlas con algas.

H_0 =No existe una diferencia significativa entre la media remoción de Perlas y Perlas con algas

Se trabaja con un alfa de 0.05.

Prueba de muestras independientes										
		Prueba de Levene de calidad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
Perlas	Se asumen varianzas iguales	2.244	.208	-3.533	4	.024	-3.96000	1.12095	-7.07226	-.84774
	No se asumen varianzas iguales			-3.533	3.121	.036	-3.96000	1.12095	-7.45017	-.46983

Con una significancia de contraste (Sig) menor a 0.05 en la prueba, se rechaza H_0 . Determinando que hay una diferencia entre las medias de Perlas y Perlas con algas.

Prueba t para Discos vs Discos con algas, *S.acutus*:

Hipótesis:

H_1 =Existe una diferencia significativa entre la media de remoción de Discos y Discos con algas.

H_0 =No existe una diferencia significativa entre la media remoción de Discos y Discos con algas

Se trabaja con un alfa de 0.05.

Prueba de muestras independientes										
		Prueba de Levene de calidad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
Discos	Se asumen varianzas iguales	.337	.593	-6.425	4	.003	-5.66667	.88192	-8.11526	-3.21807
	No se asumen varianzas iguales			-6.425	3.815	.004	-5.66667	.88192	-8.16272	-3.17062

Con una significancia de contraste (Sig) menor a 0.05 en la prueba, se rechaza H_0 . Determinando que hay una diferencia entre las medias de Discos y Discos con algas.

Prueba t para Discos con algas vs Perlas con algas, *S.cap*:

Hipótesis:

H_1 =Existe una diferencia significativa entre la media de porcentaje de recuperación de Perlas y los Discos.

H_0 =No existe una diferencia significativa entre la media de porcentaje de recuperación de Perlas y los Discos.

Se trabaja con un alfa de 0.05.

Prueba de muestras independientes

	Prueba de Levene de calidad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
								Inferior	Superior
VAR00002 Se asumen varianzas iguales	.569	.493	4.350	4	.012	4.00000	.91954	1.44695	6.55305
No se asumen varianzas iguales			4.350	3.318	.018	4.00000	.91954	1.22607	6.77393

Con una significancia de contraste (Sig) menor a 0.05 en la prueba, se rechaza H_0 . Determinando que hay una diferencia entre las medias de perlas y discos.

Prueba t para Discos vs Perlas, BaA:

Hipótesis:

H_1 =Existe una diferencia significativa entre la media de porcentaje de recuperación de discos y la de perlas.

H_0 =No existe una diferencia significativa entre la media de porcentaje de recuperación de discos y la de perlas

Se trabaja con un alfa de 0.05.

Prueba de muestras independientes									
	Prueba de Levene de calidad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
								Inferior	Superior
HAPs Se asumen varianzas iguales	.898	.397	4.690	4	.009	6.93667	1.47913	2.82996	11.04338
No se asumen varianzas iguales			4.690	3.086	.017	6.93667	1.47913	2.30303	11.57030

Con una significancia de contraste (Sig) menor a 0.05 en la prueba se rechaza H_0 . Determinando que hay una diferencia entre las medias de perlas y discos.

ANOVA, concentraciones celulares.

Hipótesis:

H_1 =Existe una diferencia significativa entre la media de porcentaje de recuperación para las concentraciones celulares de *S. capricornutum*.

H_0 =No existe una diferencia significativa entre la media de porcentaje de recuperación para las concentraciones celulares de *S. capricornutum*.

Se trabaja con un alfa de 0.05.

Prueba de homogeneidad de varianzas

VAR00002

Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
2.590	3	8	.125

ANOVA

VAR00002

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1.507	3	.502	1.311	.336
Dentro de grupos	3.065	8	.383		
Total	4.572	11			

Con una significancia de contraste (Sig) mayor a 0.05 en la prueba, no se rechaza H_0 . Determinando que no hay una diferencia entre las medias de las diferentes concentraciones para *S. capricornutum*

Prueba t, BaP, S.cap superior vs Alternado:

Hipótesis:

H_1 =Existe una diferencia significativa entre la media de porcentaje de recuperación de *S. capricornutum* superior y Alternado.

H_0 =No existe una diferencia significativa entre la media de porcentaje de recuperación de *S. capricornutum* superior y Alternado.

Se trabaja con un alfa de 0.05.

Prueba de muestras independientes										
		Prueba de Levene de calidad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
HAPS	Se asumen varianzas iguales	1.903	.240	33.279	4	.000	7.41951	.22295	6.80050	8.03851
	No se asumen varianzas iguales			33.279	2.750	.000	7.41951	.22295	6.67200	8.16702

Con una significancia de contraste (Sig) menor a 0.05 en la prueba se rechaza H_0 . Determinando que hay una diferencia entre las medias de S.cap y Alternado.

Prueba t, BaA, *S. capricornutum* superior vs *S. acutus* superior:

Hipótesis:

H_1 =Existe una diferencia significativa entre la media de porcentaje de recuperación de *S. cap ricornutum* superior y *S. acutus* superior.

H_0 =No existe una diferencia significativa entre la media de porcentaje de recuperación de *S. capricornutum* superior y *S. acutus* superior.

Se trabaja con un alfa de 0.05.

Prueba de muestras independientes										
		Prueba de Levene de calidad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
HAPS	Se asumen varianzas iguales	1.562	.280	-2.104	4	.103	-1.80470	.85759	-4.18574	.57634
	No se asumen varianzas iguales			-2.104	2.428	.147	-1.80470	.85759	-4.93637	1.32697

Con una significancia de contraste (Sig) mayor a 0.05 en la prueba, no se rechaza H_0 . Determinando que no hay una diferencia significativa entre los ensayos.

Prueba t, columna con flujo, BaP ensayo vs blancos:

Hipótesis:

H_1 =Existe una diferencia significativa entre la media de porcentaje de recuperación de ensayo y la de blancos.

H_0 =No existe una diferencia significativa entre la media de porcentaje de recuperación de ensayo y la de blancos.

Se trabaja con un alfa de 0.05.

Prueba de muestras independientes										
		Prueba de Levene de calidad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
HAPS	Se asumen varianzas iguales	1.903	.240	33.279	4	.000	7.41951	.22295	6.80050	8.03851
	No se asumen varianzas iguales			33.279	2.750	.000	7.41951	.22295	6.67200	8.16702

Con una significancia de contraste (Sig) menor a 0.05 en la prueba se rechaza H_0 .Determinando que hay una diferencia significativa entre la media de porcentaje de recuperación.

Prueba t, columna con flujo BaA, ensayo vs blancos:

Hipótesis:

H_1 =Existe una diferencia significativa entre la media de porcentaje de recuperación de blancos y la de ensayos.

H_0 =No existe una diferencia significativa entre la media de porcentaje de recuperación de blancos y la de ensayos.

Se trabaja con un alfa de 0.05.

Prueba de muestras independientes										
		Prueba de Levene de calidad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
HAPS	Se asumen varianzas iguales	.000	.999	102.346	4	.000	7.17433	.07010	6.97971	7.36896
	No se asumen varianzas iguales			102.346	3.994	.000	7.17433	.07010	6.97960	7.36907

Con una significancia de contraste (Sig) menor a 0.05 en la prueba se rechaza H_0 .Determinando que existe una diferencia entre el porcentaje recuperado de blancos y ensayos.

Prueba t, BaP, columna con flujo vs columna sin flujo:

Hipótesis:

H_1 =Existe una diferencia significativa entre la media de porcentaje de recuperación de columna con flujo y columna sin flujo.

H_0 =No existe una diferencia significativa entre la media de porcentaje de recuperación de columna con flujo y columna sin flujo.

Se trabaja con un alfa de 0.05.

	Prueba de Levene de calidad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
								Inferior	Superior
VAR00002 Se asumen varianzas iguales	3.725	.126	13.639	4	.000	2.87230	.21059	2.28760	3.45700
No se asumen varianzas iguales			13.639	2.262	.003	2.87230	.21059	2.05967	3.68492

Con una significancia de contraste (Sig) menor a 0.05 en la prueba se rechaza H_0 .

Determinando que existe una diferencia significativa entre la media de porcentaje de recuperación de columna con flujo y columna sin flujo.

Anexo 2.

Datos Brutos.

Tabla A 1. Crecimiento algal.

# de toma de lectura	días transcurridos	Selenastrum capricornutum (Abs)	Scenedesmus acutus(Abs)
1	0	0	0
2	1	0.072	0.034
3	3	0.117	0.103
4	7	0.4	0.31
5	9	0.65	0.488
6	11	0.7	0.623
7	14	0.783	0.721
8	17	0.78	0.85
09	18	0.792	0.9
10	20	0.8	1
11	21	0.81	1

Tabla A 2. Pruebas de crecimiento

S.acutus			Concentración despues de dilución.		Concentraciones reales.		Cálculo de %	
#células /mL			promedio #células /mL		promedio #células /mL			
Iniciales	48	168	48 h	168 h	48 h	168 h	48 h	168 h
1C	6.00E+06	6.00E+06	6.00E+06	6.96E+06	6.00E+06	6.96E+06	95.97	111.39
	6.00E+06	7.93E+06						
2C	6.45E+06	7.06E+06	6.19E+06	6.97E+06	1.24E+07	1.39E+07	98.98	111.49
	5.92E+06	6.87E+06						
4C	5.80E+06	6.50E+06	6.24E+06	6.51E+06	2.50E+07	2.60E+07	99.91	104.14
	6.69E+06	6.51E+06						

S.capricornutum			Concentración despues de dilución.		Concentraciones reales.		Cálculo de %	
#células /mL			promedio #células /mL		promedio #células /mL			
Iniciales	48	168	48 h	168 h	48 h	168 h	48 h	168 h
1C	6.08E+06	7.04E+06	6.10E+06	7.04E+06	6.10E+06	7.04E+06	97.65	112.68
	6.12E+06	7.04E+06						
2C	6.11E+06	6.81E+06	6.25E+06	6.54E+06	1.25E+07	1.31E+07	99.98	104.65
	6.39E+06	6.27E+06						
3C	6.22E+06	6.83E+06	6.33E+06	6.46E+06	2.53E+07	2.58E+07	101.22	103.29
	6.43E+06	6.08E+06						

Ensayos de discos en matraz para cada especie e hidrocarburo a diferentes tiempos de exposición y con dos diferentes concentraciones de células (1C y 2C).

Tabla A 3. BaP, valores promedio

% de remoción	Blanco	S.cap 1 C	S.cap 2C	S.acut 1 C	S.acut 2C
3h	40.36	68.30	68.30	64.85	75.47
6h	72.33	88.31	87.02	90.28	88.44
15h	57.62	94.92	94.62	95.59	94.92
% de recuperacion, en alginato	Blanco	S.cap 1 C	S.cap 2C	S.acut 1 C	S.acut 2C
3h	7.89	4.79	4.79	4.57	4.03
6h	10.41	7.70	4.01	3.94	5.28
15h	15.19	0.00	5.27	4.01	4.00
% de recuperacion, en biomasa	S.cap 1 C	S.cap 2C	S.acut 1 C	S.acut 2C	
3h	1.79	2.26	2.49	2.19	
6h	3.76	3.65	3.47	3.61	
15h	0.74	2.29	0.83	1.47	

Tabla A 4. BaA, valores promedio

% de remoción	Blanco	S.cap	S.cap 2C	S.acut	S.acut 2C
3h	54.19	78.29	78.29	78.48	75.00
6h	29.94	67.72	76.09	76.57	76.40
15h	39.69	90.71	92.52	89.04	95.40
% de recuperacion	Blanco	S.cap	S.cap 2C	S.acut	S.acut 2C
3h	12.76	14.62	13.27	17.23	14.35
6h	19.72	17.84	14.29	11.63	12.11
15h	21.42	4.87	0.00	6.89	4.44
% de recuperacion, en biomasa	S.cap	S.cap 2C	S.acut	S.acut 2C	
3h	2.99	3.62	4.85	3.74	
6h	12.98	9.54	13.31	12.66	
15h	1.04	0.00	1.03	1.11	

Tabla A 5. Bioensayos de exposición en columna estática

BaP	Blanco		Alternado		Mezcla		S.cap/S.acut		S.acut/S.cap	
% de remoción	71.86±0.46		83.11±0.11		79.45±0.94		90.61±0.035		73.95±0.57	
	A	B	S.acut	S.cap	A	B	S.acut	S.cap	S.acut	S.cap
% de recuperación en alginato	2.61±0.07	2.52±0.03	2.36±0.08	1.35±0.03	2.39±0.03	2.33±0.02	1.81±0.08	1.40±0.08	2.46±0.02	1.13±0.008
% de recuperación en biomasa			1.68±0.06	0.28±0.01	0.65±0.02	0.28±0.01	0.61±0.01	0.22±0.01	0.76±0.02	0.25±0.01

BaA	Blanco		Alternado		Mezcla		S.cap/S.acut		S.acut/S.cap	
% de remoción	78.45±1.09		95.11±0.14		87.26±0.26		96.78±0.08		89.61±0.12	
	A	B	S.acut	S.cap	A	B	S.acut	S.cap	S.acut	S.cap
% de recuperación en alginato	4.12±0.11	4.2±0.13	1.27±0.005	0.50±0.01	1.71±0.12	0.87±0.04	0.94±0.03	0.32±0.01	1.49±0.07	0.92±0.01
% de recuperación en biomasa			0.67±0.005	0.22±0.008	0.25±0.005	0.11±0.001	0.29±0.01	0.00	0.71±0.003	0.24±0.002

Tabla A6. Ensayo de columna con flujo.

BaP	Blanco		Ensayo	
% de remoción	59.71±1.23		87.7±0.12	
	A	B	S.acut	S.cap
% de recuperación en alginato	4.00±0.20	3.78±0.31	2.44±0.06	1.90±0.02
% de recuperación en biomasa			1.73±0.03	0.26±0.01

BaA	Blanco		Ensayo	
% de remoción	68.28±1.65		85.07±1.08	
	A	B	S.acut	S.cap
% de recuperación en alginato	5.30±0.02	3.99±0.11	0.98±0.03	0.37±0.01
% de recuperación en biomasa			0.29±0.003	0.22±0.004