



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTABLECIMIENTO DE PARÁMETROS OPERACIONALES DE
BIORREACTOR PARA REMEDIACIÓN DE AGUA CONTAMINADA
CON HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (HAP)**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO QUÍMICO

PRESENTA

ALEJANDRO RAMIREZ MADERA



CDMX.

2020



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: Dr. Víctor Manuel Luna Pabello
VOCAL: Dra. María Del Pilar Cañizares Macías
SECRETARIO: Dra. Martha Patricia García Camacho
1er. SUPLENTE: Dra. Aída Gutiérrez Alejandre
2° SUPLENTE: Dra. Patricia Díaz Arista

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Departamento de Química Analítica. Laboratorio 227, Edificio F2, Facultad de Química,
Circuito Interior Ciudad Universitaria.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Martha Patricia García Camacho

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. María del Rosario Covarrubias Herrera

SUSTENTANTE:

Alejandro Ramirez Madera

AGRADECIMIENTOS

Gracias a la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por brindarme el lugar, las herramientas y los conocimientos necesarios para crecer en todos los ámbitos.

Gracias al proyecto DGAPA-PAPIIT-UNAM IT202718 “Diseño y evaluación de un biorreactor microalgal para la remediación de un medio acuoso contaminado con hidrocarburos aromáticos policíclicos”, por el apoyo presupuestal y la beca otorgada.

Gracias al proyecto CONACyT CB-283377 “Actividad enzimática en la biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos por microalgas” por el apoyo presupuestal.

Asimismo, se agradece al proyecto PAIP 5009034 de la Facultad de Química, UNAM por el apoyo presupuestal.

Quiero dar un especial agradecimiento a mi tutora la Dra. Martha Patricia García Camacho por la oportunidad de integrarme a su investigación, el aprendizaje y la guía en el desarrollo de este proyecto.

A la M. En C. María del Rosario Covarrubias Herrera por su guía y apoyo.

DEDICATORIAS

Finalizar una actividad trae consigo un momento de reflexión y agradecimiento. Son esos pequeños pasos finales los que nos hacen valorar el esfuerzo de un largo camino por lo que hacer un balance de lo logrado y de las personas que tocaron nuestra vida resulta muy satisfactorio y necesario.

Para mis padres Manuela y Darío a quienes decir gracias no es suficiente para demostrar lo mucho que los quiero y lo infinitamente agradecido que estoy por ser su hijo, porque son mi luz y mi guía. Quienes con su ejemplo me han dado grandes lecciones de vida. Gracias porque cada día no puedo sino sentirme más orgulloso de ustedes.

A Antonio por la sonrisa compartida y el abrazo diario. Porque juntos las sonrisas son más sinceras y los problemas más pequeños.

Quiero dar un agradecimiento muy especial a las personas sin las cuales no hubiera podido siquiera comenzar esta aventura.

Para mi tía Carmen quien me apoyo y me enseñó que a los problemas se les pone un alto para demostrar de que estamos hechos. Gracias por ser ese increíble ser humano.

Para la familia Arellano López, por mostrarme que el ser familia no solo es cuestión de lazos sanguíneos. Para la señora Teresa y el señor Néstor, así como mis amigos Ulises, Alejandro, Eréndira y Mayte porque no podría haberlo logrado sin su ayuda.

Para Lilia quien con su apoyo y confianza ayudo no solo a terminar un proyecto sino a comenzar una nueva etapa. Gracias.

Finalmente quisiera dedicar este trabajo a las ganas de no darse por vencido porque aunque la vida parece difícil no existe mejor recompensa que terminar un proyecto y marcar un camino para los que siguen.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
OBJETIVOS.....	5
Capítulo 1 MARCO TEÓRICO.....	6
1.1 HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS.....	6
1.2 ANÁLISIS DE LOS HAPs EN EL AGUA.....	11
1.3 MÉTODOS DE REMOCIÓN DE CONTAMINANTES EN MEDIOS ACUOSOS.....	18
1.4 INMOVILIZACIÓN.....	21
1.5 INGENIERÍA DE REACTORES.....	23
1.6 ESCALAMIENTO.....	27
Capítulo 2 EQUIPOS, MATERIALES.....	33
2.1 EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS.....	33
Capítulo 3 DESARROLLO EXPERIMENTAL	39
3.1 METODOLOGÍA ANALÍTICA.....	39
3.1.1. Separación cromatográfica y detección	39
3.1.2. Validación del sistema cromatográfico	40
3.1.3. Optimización del método de EFS-CLAR-UV	42
3.1.4. Remanente de HAPs contenidos en las perlas de alginato	46
3.2 MANEJO DE CULTIVOS E IMOVILIZACIÓN.....	48
3.2.1. Crecimiento de microalgas.....	48
3.2.2. Inmovilización.....	51
3.3 DISEÑO Y EVALUACIÓN DE BIORREACTORES	55
3.3.1. Diseño de reactores	55
3.3.2. Establecimiento de las condiciones de operación de los biorreactores	59
3.3.2.1 Ensayos con agitación orbital	59
3.3.2.2 Remoción abiótica	59
3.3.2.3 Estudio de remoción por <i>Selenastrum capricornutum</i> inmovilizada	60
3.3.2.4 Estudio de la remoción con dos especies de microalgas inmovilizadas	61
3.3.2.5 Estudio de la posición de la salida del reactor	62
3.3.2.6 Estudio del flujo en las diferentes posiciones de salida del reactor	63
3.3.2.7 Estudio del incremento de volumen (similaridad de condiciones).....	63
3.3.2.8 Estudio del aumento de volumen y flujo(escalamiento a 30, 45 y 60 mL).....	64
3.3.2.9 Implementación de un ensayo en un volumen de 2,880 mL.....	66
Capítulo 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	69
4.1 METODOLOGÍA ANALÍTICA.....	69

4.1.1. Separación cromatográfica y detección	69
4.1.2. Validación del sistema cromatográfico	71
4.1.2.1 Benzo[a]antraceno.....	72
4.1.2.2 Benzo[a]pireno	74
4.1.3. Optimización del método de EFS-CLAR-UV	77
4.1.3.1 Recobro.....	77
4.1 MANEJO DE CULTIVOS	83
4.2 EVALUACIÓN DE BIORREACTORES.....	84
4.2.1. Ensayos con agitación orbital	84
4.2.2. Remoción abiótica	87
4.2.3. Estudio de remoción por <i>Selenastrum capricornutum</i> inmovilizada	90
4.2.4. Estudio de la remoción con dos especies de microalgas inmovilizadas	93
4.2.5. Estudio de la posición de la salida del reactor	97
4.2.6. Estudio del flujo en las diferentes configuraciones de salida de recirculación	101
4.2.7. Estudio del incremento de volumen (similaridad de condiciones).....	104
4.2.8. Estudio aumento de volumen y flujo (escalamiento de 30 a 45 y 60 mL con flujos de 2, 3 y 4 mL/min respectivamente).....	108
4.2.8.1 Comparación de la remoción con el volumen de muestra 4V (<i>S. capricornutum</i> y una mezcla de perlas de las especies <i>S. capricornutum</i> y <i>S. acutus</i> con el RSI)	110
4.2.9. Implementación de un ensayo en un reactor RSI4000 con volumen de muestra de 2,880 mL	112
4.2.9.1 Análisis HAPs del alginato, la biomasa y la muestra acuosa en el reactor de RSI4000 con 2,880 mL de muestra	117
Conclusiones.....	122
Referencias.....	125
Anexo 1.....	133

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Diagrama de los componentes de CLAR.....	12
Figura 1.2 Etapas de Extracción en Fase Sólida inspirada en Žwir Ferenc y Bizuik, 2006	16
Figura 1.3 Clasificación de los reactores de acuerdo a su operación A) Discontinuo (Batch): B) Semicontinuo (Fed-batch) C) Continuo (Continuos)	26
Figura 1.4 Modelo de escalamiento empírico por similaridad utilizado en este trabajo	29
Figura 1.5 Similaridad geométrica tomada de Anaya Durand y Pedroza Flores, 2008.....	30
Figura 2.1 Cromatógrafo de líquidos de alta resolución KNAUER, con dos bombas modelo Smartline 1000	33
Figura 2.2 Cepas de las microalgas <i>Selenastrum capricornutum</i> izquierda y <i>Scenedesmus acutus</i> derecha. Adquiridas de la colección de cultivos de algas de la Universidad de Austin, Texas (UTEX, EUA).....	37
Figura 2.3 Esquema de los reactores utilizados. Reactores de salida inferior de 50 y 170 mL A y C . Reactores de salida lateral de 50 y 170 mL B y D	38

Figura 3.1 Esquema general de experimentación.....	39
Figura 3.2 Esquema de la metodología de extracción.....	45
Figura 3.3 Análisis de remanente de hidrocarburos en perlas de alginato	47
Figura 3.4 Medios de cultivo sólidos (Tubos cultivados en agar) y líquidos (medio Bristol en matraz) sometidos a ciclos de iluminación de 16 horas y agitación semiconstante: A: <i>Selenastrum capricornutum</i> B: <i>Scenedesmus acutus</i>	51
Figura 3.5 Metodología para la inmovilización de microalgas en alginato de calcio.....	52
Figura 3.6 Ensayos en reactor con agitación orbital.....	56
Figura 3.7 Reactor tipo tanque con salida inferior RSI50, Reactor de vidrio con salida inferior conectado a una bomba peristaltica mediante una manguera de Viton blanco	61
Figura 3.8 Puesta en marcha de reactores (RSI50 1V y RSI170 2V, 3V y 4V). Construidos de vidrio y conectados a una manguera de Viton blanco	66
Figura 3.9 Montaje del reactor RSI4000. Vaso de precipitado con salida interior sobre base de madera conectado a dos bombas peristalticas MasterFlex mediante una tubería Viton blanca y una conexión "T" de vidrio, Ensayo expuestó a luz amarilla mediante un foco de 10 watts. En la misma fotografía se aprecian las microalgas inmovilizadas <i>Scenedesmus acutus</i> (lado derecho) y <i>Selenastrum capricornutum</i> (lado izquierdo)	68
Figura 4.1 Espectros UV de los HAPs estudiados 1) Benzo[a]antraceno, 2) Benzo[a]pireno	70
Figura 4.2 Cromatograma de ambos hidrocarburos utilizando metanol como fase móvil $\lambda=273$ nm y $\lambda=285$ nm. Obtenidos con la columna Hypersil ODS de 150 x 4.6 mm. Disolución de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de BaA y BaP en ACN. Tamaño de partícula de la fase estacionaria $5 \mu\text{m}$ y volumen de inyección $20 \mu\text{L}$; flujo 1 mL/min	71
Figura 4.3 Curva de calibración de respuesta de equipo (áreas) para BaA.....	74
Figura 4.4 Curva de calibración de respuesta de equipo (áreas) para BaP.....	77
Figura 4.5 Linealidad del método de EFS-CLAR-UV para BaA	79
Figura 4.6 Linealidad del método de EFS-CLAR-UV de BaA para visualizar recobro global	80
Figura 4.7 Linealidad del método de EFS-CLAR-UV para BaP	82
Figura 4.8 Linealidad del método de EFS-CLAR-UV de BaP para visualizar recobro global	82
Figura 4.9 Medición del crecimiento de cultivos	83
Figura 4.10 Remoción de BaA y BaP en reactor con agitación orbital en 3 y 6 horas. Volumen muestra=15 mL. Concentración de HAPs $266 \mu\text{g/L}$ (resultado promedio +/- desviación estándar, n=3).....	85
Figura 4.11 Remoción abiótica de BaA y BaP en RSI50 en 3, 6 y 24 horas. Volumen de muestra 15 mL. Concentración de HAPs $266 \mu\text{g/L}$ (resultado promedio +/- desviación estándar, n=3).	88
Figura 4.12 Porcentajes de remoción de BaA y BaP en RSI50 a 3, 6 y 15 horas, volumen de muestra 15 mL. Concentración de HAPs $266 \mu\text{g/L}$ (resultado promedio +/- desviación estándar, n=3)	91
Figura 4.13 Porcentajes de remoción de BaA y BaP en 6 y 15 horas, utilizando dos especies de microalgas inmovilizadas y un flujo de recirculación de 1 mL/min , volumen de muestra 15 mL. Concentración de HAPs $266 \mu\text{g/L}$ (resultado promedio +/- desviación estándar, n=3)	94
Figura 4.14 Porcentajes de remoción de BaA y BaP en 6 horas, flujo de 1 mL/min , en RSI50 y RSL50 utilizando dos especies de microalgas inmovilizadas por separado y	

en mezcla, volumen de muestra 15 mL. Concentración de HAPs 266 µg/L (resultado promedio +/- desviación estándar, n=3).....	98
Figura 4.15 RSL y RSI de 50 mL En ella se observa el montaje de los reactores: A reactor de salida inferior. B reactor de salida inferior en él se considera tener un mezclado mas homogéneo por la caída del medio acuoso en la parte central y el paso de este para la recirculación promoviendo un mejor mezclado y agitación.....	100
Figura 4.16 Porcentajes de remoción de BaA y BaP en RSI50. t=6 horas, utilizando microalgas inmovilizadas de la especie <i>S. capricornutum</i> modificando el flujo del reactor, volumen de muestra 15 mL. Concentración de HAPs 266 µg/L (resultado promedio +/- desviación estándar, n=3)......	102
Figura 4.17 Reactores utilizados en el estudio del incremento de volumen RSI170 y RSL170. Reactores de vidrios con modificación para producir la recirculación del medio acuosos conectados mediante manguera Viton blanca a bombas peristálticas MasterFlex	105
Figura 4.18 Porcentajes de remoción de BaA y BaP en RSI170 y RSL170. Muestra de 30 mL (2V), t=6 horas, utilizando microalgas inmovilizadas de la especie <i>S. capricornutum</i> . Concentración de HAPs 266 µg/L (resultado promedio +/- desviación estándar, n=3).	106
Figura 4.19 Porcentajes de remoción de BaA y BaP en RSI170 y RSL170, t=6 horas, utilizando microalgas inmovilizadas de la especie <i>S. capricornutum</i> . Aumento de volumen de muestra y flujo 1V=1mL/min; 2V=2mL/min; 3V=3mL/min; 4V=4mL/min. Concentración de HAPs 266 µg/L (resultado promedio +/- desviación estándar, n=3)	109
Figura 4.20 Puesta en marcha del reactor de salida inferior de 4,000 mL con adaptación de salida inferior a dos bombas peristálticas MasterFlex.....	115
Figura 4.21 Porcentajes de remoción de BaA y BaP RSI4000 a 96 y 240 horas utilizando microalgas inmovilizadas de las especies <i>S. capricornutum</i> y <i>S. acutus</i> en perlas de alginato de calcio. Volumen de muestra 2 880 mL, concentración de HAPs 266 µg/L	116
Figura 4.22 Porcentaje remanente de BaA y BaP en las diferentes fases de la muestra en el RS4000. Tiempo 96 y 240 horas, utilizando mezcla de microalgas inmovilizadas de las especies <i>S. capricornutum</i> y <i>S. acutus</i> en cuentas de alginato de calcio	117

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Propiedades fisicoquímicas de los 16 HAPs listados por la EPA.....	8
Tabla 1.2 Límites máximos permisibles para BaP.....	11
Tabla 3.1 Composición del medio de cultivo Bristol	50
Tabla 3.2 Condiciones de los ensayos de remoción abiótica	60
Tabla 3.3 Condiciones de los ensayos para seleccionar el tiempo de exposición utilizando <i>S. cap</i> en RSI50	60
Tabla 3.4 Condiciones de operación de los ensayos en los reactores tipo tanque RSI50 y RSL50, evaluación del tipo de posición.....	62
Tabla 3.5 Condiciones de operación de los ensayos en los reactores tipo tanque RSI50 y RSL50, evaluación del flujo de recirculación.....	63
Tabla 3.6 Condiciones de operación de los ensayos en los reactores tipo tanque RSI170 y RSL170, escalamiento de parámetros operacionales.....	64

Tabla 3.7 Condiciones del estudio del efecto del volumen de muestra y flujo de recirculación	64
Tabla 3.8 Comparación de las condiciones de operación de 4V y 1V60	67
Tabla 4.1 Parámetros cromatográficos	69
Tabla 4.2 Variación en las áreas de los picos cromatográficos en un mismo día para diferentes concentraciones de BaA	72
Tabla 4.3 Variación en las áreas de los picos cromatográficos de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de BaA en 5 días diferentes	73
Tabla 4.4 Variación en áreas de los picos cromatográficos en un mismo día para diferentes concentraciones de BaP	75
Tabla 4.5 Variación en las áreas de los picos cromatograficos de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de BaP en 5 días diferentes	76
Tabla 4.6 Porcentajes de recobro de extracción de BaA y BaP, en tres muestras	78
Tabla 4.7 Variación entre áreas de los picos en inyecciones en un mismo día para el método de EFS-CLAR-UV con diferentes concentraciones de BaA.....	79
Tabla 4.8 Variación del área de los picos entre inyecciones en un mismo día para el método de EFS-CLAR-UV con diferentes concentraciones de BaP	81
Tabla 4.9 Absorbancia para dos cultivos de microalgas <i>Scenedesmus acutus</i> y <i>Selenastrum capricornutum</i> , cultivos con un volumen de 100 mL	83
Tabla 4.10 Porcentajes de remoción en ensayos con agitación orbital (50 rpm), para BaA y BaP, n=3	84
Tabla 4.11 Porcentajes de remoción de BaA y BaP obtenidos en el reactor RSI con un flujo de recirculación de 1 mL/min, remoción abiótica	87
Tabla 4.12 Porcentajes de remoción de BaA y BaP obtenidos en el reactor RSI50 con un flujo de recirculación de 1 mL/min y la especie de microalgas inmovilizadas <i>Selenastrum capricornutum</i> en 3, 6 y 15 horas.....	90
Tabla 4.13 Porcentajes de remoción de BaA y BaP variando la especie de microalgas inmovilizadas en RSI50 a 6 y 15 horas	93
Tabla 4.14 Porcentaje promedio removido de HAPs en las dos configuraciones del reactor, RSI50 y RSL50. Flujo de operación 1 mL/min y diferentes especies de microalgas, solas o en mezcla. Tiempo de 6 h	97
Tabla 4.15 Prueba ANOVA Comparación entre RSI50 y RSL50	99
Tabla 4.16 Porcentajes de remoción obtenidos variando la especie de microalgas inmovilizada y velocidades de recirculación de flujo. Evaluados a 6 horas en los reactores RSI50 y RSL50	101
Tabla 4.17 Porcentajes de remoción de BaA y BaP para una muestra de 30 mL (2V) en RSI170 y RSL170 evaluando diferentes velocidades de recirculación	106
Tabla 4.18 Porcentaje de remoción de BaA y BaP al escalar el volumen de muestra 1V. Evaluación de las posiciones de salida de recirculación. Tiempo 6 horas, flujos: 1V 1 mL/min, 2V 2 mL/min, 3V 3 mL/min y 4V 4 mL/min	109
Tabla 4.19 Propuestas para la implementación del reactor de 4,000 mL	114
Tabla 4.20 Porcentajes remanentes de hidrocarburos en RSI4000, n=3	117

ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrilo
ANOVA	Análisis de la varianza
BaA	Benzo[a]antraceno
BaP	Benzo[a]pireno
C.V.	Coefficiente de variación
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
EFS	Extracción en fase sólida
ELL	Extracción líquido-líquido
H ₂ O	Agua
HAPs	Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos
K	Constante de distribución
k'	Factor de capacidad
L.C.	Límite de cuantificación
L.D.	Límite de detección
N	Número de platos teóricos
r ²	Coefficiente de determinación
Rpm	Revolución por minuto
R	Resolución
RSI	Reactor de salida inferior
RSL	Reactor de salida lateral
S	Desviación estándar
<i>S. ac</i>	<i>Scenedesmus acutus</i>
<i>S. cap</i>	<i>Selenastrum capricornutum</i>
tm	Tiempo muerto
tr	Tiempo de retención
UV	Detector de absorción UV-visible
λ	Longitud de onda de máxima absorción

RESUMEN

En este trabajo se desarrolló una propuesta para el tratamiento de medio acuoso contaminado con Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs), específicamente Benzo[a]antraceno y Benzo[a]pireno. El proceso consistió en la evaluación de biorreactores tipo tanque con agitación mediante recirculación, empacados con esferas de alginato de calcio que contienen las especies inmovilizadas *Scenedesmus acutus* y *Selenastrum capricornutum*.

Para cuantificar los HAPs residuales y determinar la remoción en el medio acuoso por microalgas inmovilizadas en los biorreactores, se utilizó la técnica de Extracción en Fase Sólida (EFS) para el tratamiento de la muestra y Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución y detección espectrofotométrica UV (CLAR-UV) para el análisis de los HAPs estudiados. Previamente se validó la metodología para verificar la linealidad, precisión al igual que el porcentaje de recuperación. Se obtuvieron coeficientes $r^2 > 0.99$, coeficientes de variación $< 6\%$ y recobros cercanos al 83% para B[a]A y 75% para B[a]P. Una vez validado el método de EFS-CLAR-UV, se procedió a evaluar los parámetros operacionales en que las microalgas inmovilizadas removieran mayor porcentaje de HAPs.

Inicialmente se realizó la evaluación de la sorción de HAPs presentes en la muestra acuosa sobre el material utilizado en la construcción del biorreactor, es decir el contenedor de vidrio y la manguera Viton. Posteriormente, se optimizó su operación haciendo modificaciones en los flujos de recirculación, el tiempo de exposición, las especies de microalgas inmovilizadas y la posición de salida del flujo de recirculación (inferior o lateral). Con el uso del biorreactor con agitación mediante recirculación de salida inferior (RSI) se obtuvieron porcentajes de remoción del 67% en tiempos de exposición de 6 horas y flujo de recirculación de 1 mL/min utilizando la especie *S. capricornutum*. Dichas condiciones fueron extrapoladas a biorreactores de mayor tamaño mediante el principio de similitud obteniendo mayores porcentajes de remoción, los cuales llegaron hasta 91% y 84% para BaA y BaP respectivamente con un volumen de agua de la llave de 60 mL.

El apartado final de este trabajo incluyó el acercamiento a la implementación de un biorreactor con capacidad de 4,000 mL utilizando la extrapolación de los parámetros operacionales. El análisis tanto del medio acuoso como la biomasa mediante EFS-CLAR-UV y DMFS-CLAR-UV permitieron hacer un balance de materia cuantificando la remoción, ya sea por bio-acumulación o biodegradación de los HAPs presentes.

INTRODUCCIÓN

Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) reagrupan un conjunto de compuestos orgánicos constituidos por al menos dos anillos aromáticos fusionados (Mi et al., 2001). Los HAPs son contaminantes ambientales que se encuentran en el aire, agua y suelos. Sus propiedades varían de acuerdo con el compuesto, pero en general presentan poca solubilidad en agua y una propensión a absorberse a la materia orgánica (Slooff et al., 1989). Su generación puede atribuirse tanto a fuentes antropogénicas como naturales; por la quema de combustibles fósiles y material orgánico, así como por las emisiones de automóviles, plantas generadoras de energía y quema de desperdicios; de manera natural, en erupciones volcánicas y durante la formación del petróleo (McElroy y Sisson, 1989).

La toxicidad de los HAPs es reconocida y clasificada como cancerígena y mutagénica, sin embargo, sus características varían de un compuesto a otro. Su alta toxicidad justifica su clasificación como contaminantes orgánicos persistentes y su registro como contaminantes prioritarios en las listas de la Comisión Europea, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos y la Organización Mundial de la Salud, las cuales han clasificado 16 HAPs en su lista de contaminantes prioritarios. Particularmente, el Benzo[a]antraceno (BaA) es clasificado como probable precursor del cáncer, mientras que el Benzo[a]pireno (BaP) como compuesto cancerígeno.

Si bien existen diferentes métodos físicos y químicos que han sido planteados para tratar los medios contaminados con HAPs, tales como, flotación, desorción térmica, extracción con disolventes, ultrasonido y tratamiento electroquímico entre otros (Wilson y Jones, 1992), el uso de estos tipos de tratamientos presentan diferentes desventajas: el alto costo de los reactivos a utilizar, el desconocimiento de la cantidad necesaria (a fin de evitar defectos u excesos) y los efectos secundarios ligados a las propiedades de los reactivos que podrían causar la formación de nuevos contaminantes.

Por lo que las búsquedas actuales se orientan hacia la remoción de los HAPs mediante bioprocesos, teniendo como ventajas su aspecto no contaminante y la ausencia de productos químicos (Hotfritcher et al., 1999). Al respecto, la mayor parte de los estudios de biodegradación de HAPs han estado enfocados al uso de microorganismos como bacterias y hongos (Hong et al., 2008). No obstante, se conoce también el poder de algunas especies de microalgas para remover e incluso degradar los HAPs. Especies como *Chlorella minutissima*, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus platydiscus*, *Scenedesmus quadricauda*, *Scenedesmus acutus*, *Selenastrum capricornutum*, *Skeletonema costatum* y *Nitzschia* han sido utilizadas en la remoción de HAPs (Warchawssky et al., 1990; Olmos Espejel et al., 2012; García de Llasera, et al., 2016; Lei et al., 2007; Hong et al., 2008).

Si bien el gasto de la biomasa utilizada y su separación representa uno de los grandes problemas al trabajar con microorganismos en bioprocesos, en la actualidad el uso de biorreactores empacados con organismos inmovilizados es una técnica que toma fuerza al resultar un método no invasivo y económico desde el punto de vista operativo al permitir la separación de la biomasa y los productos o desechos finales, así como una protección a los organismos de la depredación y las condiciones ambientales (Noüe y Proulx, 1988).

El tratamiento y remoción de Benzo[a]pireno y Benzo[a]antraceno en medios acuosos utilizando mini biorreactores empacados con microalgas tanto libres como inmovilizadas ha proporcionado resultados favorables en el grupo de trabajo (García de Llasera et al., 2018). El uso de microalgas inmovilizadas de las especies *Selenastrum capricornutum* y *Scenedesmus acutus* han sido aplicado a la remoción de BaA y BaP mediante ensayos en matraces con agitación orbital (Olmos Espejel et al., 2012; García de Llasera et al., 2016), al igual que en biorreactores tipo tanque con agitación magnética (Loera Flores, 2017) y biorreactores tubulares (León Santiago, 2016), demostrando que las condiciones de operación son características del tipo de reactor utilizado y de los materiales de construcción.

Dado que las condiciones de operación son características del tipo de reactor, es necesario ahondar en la investigación para determinar parámetros que conlleven a

las condiciones óptimas de trabajo (Blanco Álvarez y Linarte Lazcano, 1978). Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es diseñar un biorreactor tipo tanque con agitación mediante recirculación y determinar los parámetros óptimos, como son el tiempo de exposición, la velocidad y recirculación de flujo, la relación de muestra acuosa/materia orgánica, la posición de la salida de recirculación y los materiales de construcción, para su manejo con microalgas inmovilizadas de las especies *Selenastrum capricornutum* y *Scenedesmus acutus*. Inicialmente se manejaron volúmenes pequeños (15-60 mL) hasta finalizar en el escalamiento a nivel laboratorio de los parámetros obtenidos en un reactor con capacidad de cuatro litros para la remoción eficiente de Benzo[a]pireno y Benzo[a]antraceno, el cual se trabajó a temperatura ambiente. El escalamiento se realizó mediante el concepto de similaridad en tamaño, geometría y forma (Anaya Durand y Pedroza Flores, 2008) de las condiciones óptimas obtenidas.

Para evaluar cuantitativamente las concentraciones de los HAPs del medio acuoso, es decir, la remoción de los HAPs mediante microalgas inmovilizadas y la valoración de los parámetros operacionales en el biorreactor, fueron empleadas técnicas analíticas como la Extracción en Fase Sólida (EFS) para la concentración y aislamiento de los remanentes de los HAPs de estudio en los biorreactores y la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con un detector espectrofotométrico UV (CLAR-UV) para el análisis cuantitativo de los HAPs.

OBJETIVOS

General

Establecer los parámetros óptimos en la implementación y escalamiento a nivel laboratorio de un biorreactor tipo tanque con agitación mediante recirculación, para la remoción en medio acuoso de Benzo[a]antraceno y Benzo[a]pireno, mediante las microalgas *Selenastrum capricornutum* y *Scenedesmus acutus* inmovilizadas en perlas de alginato.

Particulares

- Evaluar la capacidad de remoción por factores abióticos (luz) y materiales de construcción (manguera Viton y vidrio) en biorreactores con agitación orbital y biorreactores con agitación mediante recirculación.
- Comparar la capacidad de remoción de Benzo[a]antraceno y Benzo[a]pireno mediante microalgas inmovilizadas en un biorreactor con agitación orbital y un biorreactor tipo tanque con agitación mediante recirculación.
- Evaluar la remoción de Benzo[a]antraceno y Benzo[a]pireno en un biorreactor tipo tanque con agitación mediante recirculación con la variación de los parámetros operacionales (tiempo de exposición, presencia de alginato, especies de microalgas inmovilizadas, posición de salida del biorreactor y flujo de recirculación).
- Evaluar los parámetros óptimos de flujo de recirculación encontrados para la remoción en diferentes volúmenes de medio acuoso y masa de hidrocarburos, incrementando el tamaño del biorreactor mediante el principio de similaridad.
- Utilizar el principio de similaridad y la información comparativa obtenida para realizar el escalamiento a nivel laboratorio de un ensayo en un reactor de 4,000 mL de capacidad para la remoción de BaA y BaP en medio acuoso mediante microalgas inmovilizadas.

Capítulo 1 MARCO TEÓRICO

1.1 HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS

Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) agrupan un extenso conjunto de compuestos orgánicos constituidos por anillos aromáticos fusionados en arreglos lineales, de racimo o arreglos angulares (Neff, 1979; Slooff et al., 1989). La mayoría son sustancias lipófilas compuestas de Carbono e Hidrógeno creando estructuras polinucleares por lo que también se les conoce como “Hidrocarburos Polinucleares”, generalmente presentados en mezclas complejas de numerosos compuestos diferentes.

Los HAPs puros son sólidos habitualmente cristalinos que presentan un color blanco o amarillo claro. Las propiedades físicas de sus compuestos varían según su masa molecular y su estructura. En general presentan inestabilidad fotoquímica, por lo que se degradan con la luz, además de baja solubilidad en agua, así como altos puntos de fusión y ebullición (Behymer y Hites, 1988; Lawal, 2017).

También se caracterizan por ser hidrofóbicos, presentando una fuerte afinidad por la materia orgánica y un Kow elevado, lo que indica un alto potencial de adsorción a partículas de materia suspendida en aire y agua, además de un fuerte potencial de bioacumulación en los organismos (Slooff et al., 1989).

1.1.1 Origen de los HAPs

Los HAPs presentan una principal fuente de producción por pirólisis, combustión incompleta de materia orgánica a altas temperaturas (McElroy y Sisson, 1989; Lawal, 2017). Su origen puede ser tanto natural (fuegos forestales, erupciones volcánicas) o mayormente por actividades antropogénicas (actividad industrial, emisiones de automóviles, plantas generadoras de energía y quema de desperdicios al igual que en una gran cantidad de alimentos al ser ahumados por tiempos largos) (IARC, 1983; Slooff et al., 1989).

Los HAPs pueden ser también de origen petrogénico, como resultado de la maduración lenta de la materia orgánica en el ambiente sedimentario profundo y en

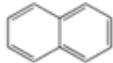
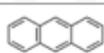
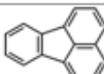
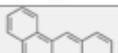
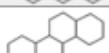
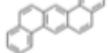
menor medida de modificaciones químicas durante la diagénesis temprana de precursores naturales, pigmentos, esteroides y quinonas acumuladas en depósitos sedimentarios (Aizenshtat et al., 1973; Laflamme y Hites, 1978; Neff, 1979, Wakeham et al., 1980).

1.1.2. Toxicidad de los HAPs

La toxicidad es la capacidad inherente a una sustancia de producir un efecto dañino en un organismo. La toxicidad de los HAPs es ampliamente conocida por sus propiedades cancerígenas, mutagénicas y dañinas al ambiente, dada su baja solubilidad y por ello su persistencia en los ecosistemas.

Si bien en general los HAPs son denominados tóxicos, existen 16 que son clasificados como contaminantes orgánicos persistentes y catalogados como sustancias prioritarias en la lista de la Comisión Europea (JOCE, 2004), así como en la Organización Mundial de la Salud, en inglés World Health Organization (WHO, 1998) y la Agencia de Protección del Ambiente de los Estados Unidos, EPA por sus siglas en inglés Environmental Agency Protection (Grova et al., 2002). A nivel nacional, México regula las cantidades mínimas permisibles de acuerdo con la NOM-138-SEMARNAT/SS-2003. En la Tabla 1.1 se presentan las propiedades fisicoquímicas de los 16 HAPs que son clasificados como contaminantes persistentes inspirada en Mackay et al., 1992; Grova, 2002.

Tabla 1.1 Propiedades fisicoquímicas de los 16 HAPs listados por la EPA

Estructura	Compuesto	Número de Anillos	Masa molecular (g/mol)	Solubilidad en agua (mg/L a 25°C)	Log K _{ow}
	Naftaleno	2	128.2	31	3.37
	Acenaftaleno	3	154.2	3.8	3.92
	Acenaftileno	3	152.2	16.1	4.06
	Fluoreno	3	166.2	1.9	4.18
	Fenantreno	3	178.2	1.1	4.5
	Antraceno	3	178.2	0.045	4.45
	Fluoranteno	4	202.3	0.26	5.2
	Pireno	4	202.3	0.123	4.88
	Benzo[a]antraceno	4	228.3	0.011	5.7
	Criseno	4	228.2	0.002	5.61
	Benzo[a]pireno	5	252.3	0.0038	6.31
	Benzo[b]fluoranteno	5	252.3	0.0015	6.8
	Benzo[k]fluoranteno	5	252.3	0.0008	6.31
	1,2:5,6-dibenzoantraceno	5	278.4	0.0006	6.5
	Benzo[g,h,i]perileno	6	276.3	0.00026	7.2
	Indeno[c,d]pireno	6	276.3	0.0005	6.58

1.1.3. Efecto sobre la salud humana y el medio ambiente

La acumulación y la persistencia de los HAPs presentan un riesgo para la salud humana y el ambiente, por una parte, por las características propias de los compuestos pero también a causa de las fuentes de exposición.

Los seres humanos pueden estar expuestos a HAPs a través del aire, agua y los alimentos mediante diferentes vías como lo son: respiratoria (por la inhalación de partículas atmosféricas contaminadas o por fumar cigarrillos), digestiva (por la ingestión de productos alimentarios contaminados, cocinados a la parrilla o ahumados), e incluso la piel. En 1993 se demostró que el BaP, HAP aislado del alquitrán de hulla, era cancerígeno (Mastandrea et al., 2005). Además, se han asociado con diferentes tipos de cáncer como lo son el de vejiga, laringe, escroto, mama, esófago, próstata, riñón, piel y páncreas.

Los HAPs son capaces de suprimir el sistema inmunológico y son sospechosos de ser disruptores endocrinos. Se han estudiado y probado las propiedades cancerígenas y mutagénicas de Criseno, Dibenzoantraceno, el Naftaleno, el Benzo[a]flouranteno, el Flouranteno y el Indeno (IARC, 1983; Bourcereau, 2010).

En medios acuáticos la mayor parte de los HAPs se encuentran absorbidos en los sedimentos y en los organismos vivos por bioacumulación, la cual designa la capacidad de los organismos de concentrar y acumular una sustancia en concentraciones superiores a aquellas del agua en donde se encuentran, posteriormente juegan un papel de bioamplificación mediante la cadena alimentaria, resultando en niveles terminales más elevados (Lee et al., 1972)

Los niveles de bioacumulación dependen de las características fisicoquímicas de los HAPs (Chahin, 2010):

- De acuerdo con su estabilidad química y metabólica, explicando su baja degradación en el ambiente y su acumulación en los seres vivos
- El nivel lipofílico de las sustancias, permitiendo una transferencia pasiva entre la membrana biológica de los seres vivientes y su posterior paso por la mucosa digestiva al ser ingeridos
- Por la capacidad de los organismos acuáticos a biodegradar los HAPs

1.1.4. Límites máximos permisibles para HAPs

Las características de estos contaminantes han sido causantes de la existencia de legislaciones y normatividades, que rigen y delimitan las cantidades máximas permisibles en sistemas acuosos de acuerdo con la agencia regulatoria, Figura 1.2.

En EUA la Occupational Safety and Health Administration (OSHA, 1997) estableció un límite de exposición permitido de 0.2 mg/m³ en el ambiente de trabajo para el BaP mientras que la EPA contempla un límite máximo de 0.0002 mg/L para el mismo hidrocarburo.

La EPA no es la única organización en declarar a estas sustancias como dañinas. El Centro Internacional de Búsqueda contra el Cáncer (IARC, 1983) ha establecido una clasificación donde organiza el peligro de exposición a las sustancias en tres categorías:

1. Corresponde a sustancias cancerígenas comprobadas (entre ellos el BaP)
2. Incluye a las sustancias posiblemente cancerígenas (entre ellos el BaA)
3. Productos que no pueden considerarse cancerígenos para el hombre

En Francia, el Decreto N°2001-1220, relativo a las aguas destinadas a consumo humano, designa un valor límite de 0.01 µg/L para BaP, mientras que la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1998) impone en el agua potable un valor límite de 0.2 µg/L para Fluoranteno, Benzo[b]fluoranteno, Benzo[k]fluoranteno, Benzo[g, h,i]perileno, Indeno[1,2,3,cd]pireno y un valor límite de 0.7 µg/L para el Benzo[a]pireno.

En México la Comisión Nacional del Agua rige los parámetros de la calidad del agua y los clasifica en inorgánicos, orgánicos, físicos y microbiológicos. Los HAPs son clasificados dentro de los parámetros orgánicos y la norma mexicana que rige sus niveles máximos permisibles en suelos es la NOM-138-SEMARNAT/SS-2003 de acuerdo con el tipo de suelo. Para BaP y BaA los límites máximos permisibles en suelos son 2 mg/kg base seca para uso de suelo agrícola, forestal, pecuario, de conservación, residencial, creativo; y 10 mg/kg base seca para el uso de suelo industrial y comercial.

Los límites para Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en materia de aguas son regidos por la Ley Federal de Derechos y Disposiciones dependiendo del uso del agua. Los límites para los HAPs son 0.0001 mg/Kg para abastecimiento de tipo urbano y 0.1 mg/Kg para protección a la vida acuática: aguas costeras y estuarios.

En la Tabla 1.2 se presentan los Límites máximos permisibles para BAP de diferentes entidades como los son México, Estados Unidos de Norteamérica y Francia.

Tabla 1.2 Límites máximos permisibles para BaP

Entidad	Legislación	Valor Límite BaP
México	Ley Federal de Derechos y Disposiciones	0.0001 mg/kg
EUA	Administración de Seguridad y Salud Ocupacional	0.2 mg/m ³
	Agencia de Protección Ambiental	0.2 µg/L
Francia	Decreto n°2001-1220	0.01 µg/L
	Organización Mundial de la Salud	0.7 µg/L

1.2 ANÁLISIS DE LOS HAPs EN EL AGUA

Muchos métodos son utilizados para el análisis cuantitativo y cualitativo de los HAPs entre ellos pueden distinguirse los basados en la separación de los HAPs en fase líquida o fase gaseosa.

En la fase líquida se lleva generalmente a cabo mediante cromatografía líquida de fase inversa, en la cual la fase estacionaria es de naturaleza apolar (sílice modificada con cadenas hidrocarbonadas) y la fase móvil está constituida por un disolvente polar; existen una gran cantidad de columnas específicamente diseñadas para la separación de HAPs (Wise et al., 2018).

1.2.1. Cromatografía de líquidos

La cromatografía de líquidos es una técnica de análisis químico mediante la cual se separan físicamente los diferentes compuestos de una solución por la adsorción

selectiva de los constituyentes de una mezcla. Consta de dos fases, una fija denominada fase estacionaria y una fase móvil la cual fluye permanentemente durante el análisis. La afinidad de los analitos a estas dos fases provoca su migración diferencial a lo largo de la columna mediante el proceso de elución (Synder et al., 1979). En la migración de los componentes, el tiempo de recorrido de un componente a través de una columna se denomina “tiempo de retención” (t_r), y mediante la diferencia de los tiempos de retención entre componentes se puede saber qué tan buena es la separación de una mezcla en un sistema cromatográfico.

Un cromatógrafo de líquidos consta de una serie de elementos indispensables: Sistema de suministro de fase móvil (con depósitos de disolvente(s)), bomba de alta presión, sistema de inyección de muestra, columna cromatográfica, detector e integrador. Estos elementos constituyen módulos bien definidos entre los cuales circula la fase móvil a través de conductos tubulares.

En la Figura 1 se incluye un diagrama de los componentes del sistema de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR).

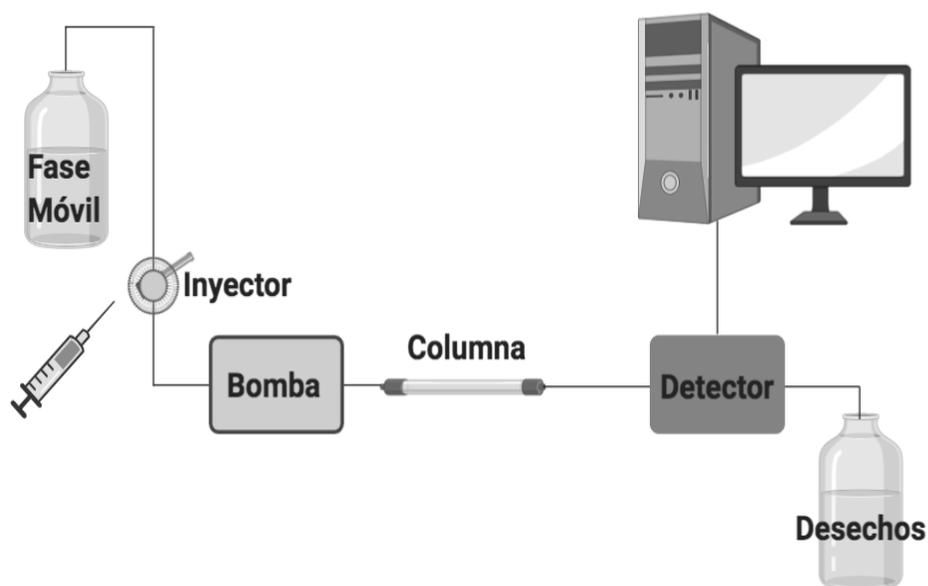


Figura 1.1 Diagrama de los componentes de CLAR

Los detectores más comúnmente utilizados para el análisis de los HAPs en la cromatografía de líquidos son: el detector por fluorescencia (Gündel et al., 1996), el

cual ofrece una mayor sensibilidad y selectividad para la detección de hidrocarburos policíclicos aromáticos en matrices complejas, el detector UV-Visible y el detector UV de arreglo de diodos (Menichini et al., 1999). Con estos detectores la selección de las longitudes de onda adecuadas permite alcanzar un elevado grado de selectividad para cada HAP individual o para varios HAPs que eluyen en un tiempo próximo. Por otra parte, la cromatografía de líquidos asociada a espectrometría de masas (LC-MS) permite un análisis directo de la muestra porque puede deducir la estructura de las moléculas detectadas (Marcé y Borrull, 2000; Huynh et al., 2007, Soriano Sanz, 2009). La cromatografía de líquidos tiene diferentes tipos, siendo los más comunes, la cromatografía en fase normal donde se emplean fases estacionarias polares y la fase móvil es poco polar, y la cromatografía en fase inversa en donde la fase estacionaria es apolar y la fase móvil es polar. Por lo que en esta última, los compuestos polares son eluidos más rápido que los apolares.

1.2.2. Parámetros cromatográficos

Los parámetros cromatográficos se describen a continuación:

Tiempo de retención (t_r): Tiempo transcurrido entre el instante de introducción de la muestra en la columna y el momento en que dicho constituyente alcanza el máximo de señal en el detector.

Tiempo muerto (t_m): tiempo necesario para que un constituyente no retenido llegue al detector.

Factor de capacidad (k'): es utilizado para describir las velocidades de migración de los analitos en las columnas y se interpreta considerando que mientras mayor sea el valor de este factor, menor es la velocidad de migración de un analito en la columna.

$$k' = \frac{KV_s}{V_m} = \frac{t_r - t_m}{t_m}$$

Donde:

K constante de distribución

V_s Volumen de fase estacionaria

V_m Volumen de fase móvil

Selectividad (α): es la capacidad del sistema cromatográfico para distinguir entre los componentes de una muestra. Se mide como una relación de los factores de capacidad (k') de los componentes en cuestión y se puede visualizar como la distancia entre los vértices de los picos correspondientes. Por lo que valores altos de α indican una buena separación de los dos picos.

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A} = \frac{t_{rB} - t_m}{t_{rA} - t_m}$$

Donde:

k'_B es el factor de capacidad de la sustancia con mayor tiempo de retención y t_{rB} su respectivo tiempo de retención

k'_A es el factor de capacidad de la sustancia con menor tiempo de retención y t_{rA} su respectivo tiempo de retención

t_m el tiempo muerto

Eficiencia de la columna: Es un parámetro relacionado directamente con el ensanchamiento de un pico en un cromatograma, ya que una columna poco eficiente presentará picos muy ensanchados que podrían traslaparse con otros de diferentes tiempos de retención aunque se tenga buena selectividad. Dicha eficiencia se simboliza con la letra N y está estrictamente relacionada con el número de platos teóricos, que representan a las unidades de equilibrio que se tienen en la columna.

$$N = \frac{L}{H}$$

Donde L representa la longitud de la columna y H la altura de cada plato teórico de la columna.

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

$$N = 16 \left(\frac{t_r}{W} \right)^2$$

Donde t_r es el tiempo de retención y W es el ancho a la base de la banda para cada analito.

Resolución (R_s): constituye una medida cuantitativa de la capacidad de una columna para separar dos analitos. Cuanto mayor sea la resolución mejor separados estarán los picos cromatográficos de los componentes A y B.

$$R_s = \frac{2(tr_B - tr_A)}{W_A + W_B}$$

1.2.3. Extracción

Existen diferentes técnicas para extraer los contaminantes orgánicos del agua, entre las más comúnmente utilizadas se encuentran dos tipos:

- Extracción Líquido-Líquido (ELL), la cuál es quizá la más ampliamente utilizada. Consiste en mezclar la muestra de agua con un disolvente orgánico inmiscible por el cual los HAPs tienen una mayor afinidad (Manoli y Samara, 1996).
- Extracción en Fase Sólida (EFS), la cuál corresponde al uso de un adsorbente para realizar al mismo tiempo una extracción y concentración de los HAPs en una muestra líquida. Dado que este fue el sistema utilizado durante el desarrollo de este trabajo a continuación ahondaremos en su explicación.

La extracción en fase sólida (EFS) consiste en aplicar una muestra líquida a través de una columna, un cartucho o pre-columna que contiene un adsorbente. Los

adsorbentes más utilizados son alúmina o sílice unida a octadecil (C18) u octil (C8). Los analitos de la muestra se retienen al pasar por el adsorbente para posteriormente ser recuperados con un disolvente apropiado. Por lo que esta técnica permite la purificación y la concentración de los analitos a nivel trazas de manera simultánea. También tiene otras ventajas como la posibilidad de ser aplicada en el lugar de muestreo e incluso usarla en métodos automatizados y en línea con cromatografía de líquidos de alta resolución o cromatografía de gases. La EFS es una técnica aceptada por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América (USEPA, por sus siglas en inglés) como una técnica alternativa a la extracción líquido-líquido para la preparación de muestras de agua potable y agua residual en el análisis de contaminantes orgánicos (Hennion, 1999; Camel, 2003).

La extracción en fase sólida se maneja comúnmente en cartuchos empacados con el adsorbente, y consiste en cuatro pasos sucesivos, los cuales son presentados de manera gráfica en la Figura 1.2.

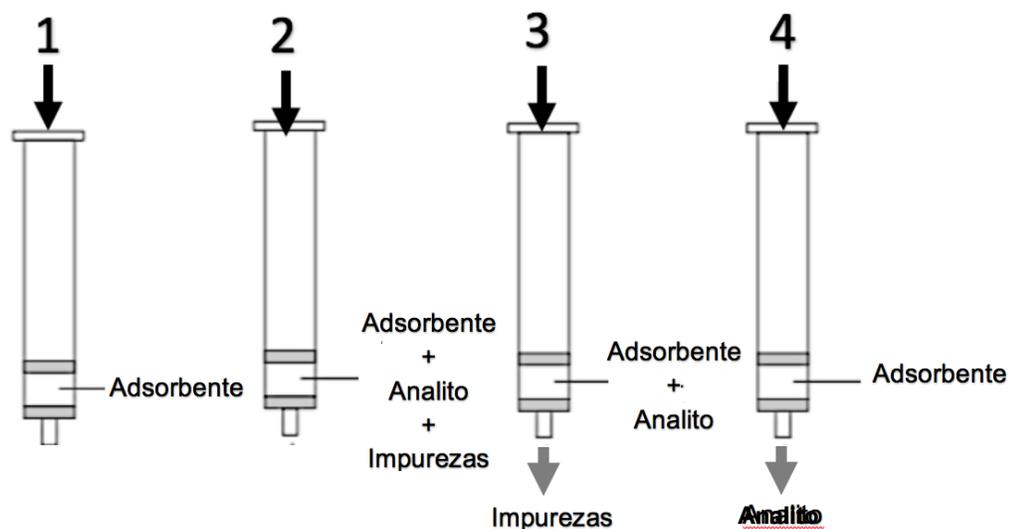


Figura 1.2 Etapas de Extracción en Fase Sólida inspirada en Żwir Ferenc y Bizuik, 2006

Los pasos son los siguientes:

1. Acondicionamiento y lavado: el acondicionamiento se realiza con un disolvente o mezcla de disolventes a fin de solvatar los grupos funcionales de la fase estacionaria, humectar el empaque y eliminar las impurezas y aire que se encuentren retenidas en la fase, a fin de facilitar la transferencia de la muestra.
2. Carga de la muestra: se aplica la muestra en la parte superior del cartucho a fin de retener el analito de interés en la fase.
3. Lavados (clean up): se realiza utilizando disolventes apropiados con el objetivo de eliminar interferencias e impurezas sin desplazar a los analitos.
4. Elución: consiste en la elución de los analitos de interés utilizando un disolvente fuerte y apropiado para la muestra.

La extracción de hidrocarburos aromáticos policíclicos mediante EFS puede efectuarse exitosamente, aún cuando se puedan presentar problemas de adsorción a la superficie de los contenedores o cartuchos donde se realiza la extracción, como consecuencia de la alta hidrofobicidad de los contaminantes. Para evitar la adsorción a los materiales, se adiciona a la muestra un disolvente orgánico como el acetonitrilo, 2-propanol, metanol o un tensoactivo para aumentar la solubilidad de los hidrocarburos (Marcé y Borrull, 2000). Lo anterior debe tomarse en cuenta para la toma de la muestra, el almacenamiento y el desarrollo del método de extracción con el fin de llevar a cabo un análisis cuantitativo confiable.

La técnica de EFS ha sido aplicada para la extracción tanto de HAPs como de sus metabolitos en matrices biológicas como orina, leche, aceite y extracto de pescado. Los recobros obtenidos varían entre 23 % y 127 %, cabe mencionar que estos resultados dependen del tipo de matriz analizada y del compuesto determinado (Velasco Cruz, 2011).

1.3 MÉTODOS DE REMOCIÓN DE CONTAMINANTES EN MEDIOS ACUOSOS

Los métodos de remoción de contaminantes de medios acuosos, a grandes rasgos, se pueden dividir en tres tipos de tratamientos:

➤ **Métodos de tratamiento físicos**

Los métodos físicos, son dados principalmente por mecanismos de filtración y sedimentación, en ellos se utilizan las propiedades físicas para inmovilizar, separar o concentrar los contaminantes presentes en el agua.

➤ **Métodos de tratamiento químicos**

El principio de los tratamientos químicos consiste en utilizar reactivos con el objetivo de provocar una reacción o una serie de reacciones para transformar los contaminantes en compuestos menos tóxicos, extraerlos o hacerlos biodegradables (coagulación, floculación, adsorción, intercambio iónico y desinfección).

➤ **Métodos de tratamiento biológicos**

El principio de los tratamientos biológicos se basa en la eliminación de contaminantes orgánicos o la reducción de su concentración en el medio, para ello se utilizan organismos que tienen la capacidad de remover o en el mejor de los casos degradar los contaminantes en compuestos menos tóxicos.

1.3.1. Remoción de HAPs

Diferentes soluciones han sido propuestas para el tratamiento de los HAPs en el ambiente; de los cuales pueden agruparse procesos tanto físicos como químicos, tales como: la flotación, los lavados, la desorción térmica, la extracción con solventes, la oxidación, el tratamiento con ultrasonido, así como los tratamientos electroquímicos (Sloof et al., 1989). Sin embargo, aunque funcionales, los métodos antes descritos implican riesgos, desde la regulación de reactivos a utilizar, evitando excesos o defectos de los compuestos químicos, hasta daños ambientales por

barreras físicas, causando daños secundarios por la formación de nuevos contaminantes.

Es por ello que las vías de investigación actuales orientan su búsqueda a la eliminación de estos hidrocarburos mediante procesos denominados de biorremediación, siendo el principal punto de interés por ser métodos no contaminantes y por la ausencia de sustancias químicas en su implementación (Faham, 2013). La biorremoción es la aplicación tecnológica que utiliza organismos y microorganismos vivos para destruir o remover contaminantes orgánicos e inorgánicos, aprovechando una modificación adecuada del medio ambiente (EPA, 2013).

La EPA reporta el potencial de organismos vivos tales como plantas, bacterias, hongos y microalgas empleados para la biorremediación. El potencial de microorganismos del reino vegetal y bacterias para la degradación de HAPs puede ser ejemplificados para Naftaleno, Acenaftileno, Fenantreno, Antraceno, Pireno, Fluoranteno y Criseno (Lawal, 2017). Otro ejemplo de biorremediación es el uso de microalgas *Chlorella minutissima*, para la remediación de aguas de desecho de alcantarillas (Sharma et al., 2008).

En los últimos años se ha logrado el aislamiento de diversas especies de bacterias, hongos y algas capaces de degradar HAPs encontrándose que la facilidad de remoción y degradación es inversamente proporcional al número de anillos de la molécula de HAP (Cerniglia, 1993). Sin embargo, la remoción y degradación de estos HAPs depende de sus propiedades fisicoquímicas, su concentración, la tasa de difusión en el medio y su disponibilidad.

1.3.2. Microalgas

Las microalgas pueden definirse como organismos unicelulares eucariotas y fotosintéticos; son esenciales en la producción primaria dentro de la cadena trófica, que es al mismo tiempo la primera formadora de materia orgánica; generalmente son fotoautótrofas (organismos que obtienen la energía de la luz solar y se desarrollan a partir de la materia inorgánica existente), sin embargo, algunas

especies pueden crecer en condiciones heterótrofas (obteniendo la energía de la luz solar y empleando compuestos orgánicos como fuente de carbono), poseen un tamaño promedio entre 5 y 10 μm y usualmente presentan apariencia esférica o cilíndrica, lo que las hace fácilmente digeribles por muchos organismos, cuya principal fuente alimenticia es el fitoplancton.

La clasificación de estos organismos permanentemente sufre modificaciones, en parte por la aceptación o no de los criterios de clasificación según los diferentes autores y en parte por evidencias de su estructura gracias a los adelantos de la microscopía electrónica. De acuerdo con ello es posible clasificar a las algas con base en su forma externa, presencia o ausencia de flagelo, tipo de sustancia de reserva alimenticia, moléculas presentes en su pared celular, tipo de reproducción y ciclo de vida (Guamán Bumeo y González Romero, 2016).

Una clasificación muy aceptada es por su coloración pudiendo encontrar algas verdes, azules, rojas o amarillas. Entre las especies de microalgas verdes más utilizadas para la remoción de HAPs de alta masa molecular se encuentran: *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus platydiscus*, *Scenedesmus quadricauda*, *Selenastrum capricornutum*, *Skeletonemacostatum* y *Nitzschias*. (Lei et al., 2007; Hong et al., 2008; Ghosal et al., 2016).

1.3.2.1. Especies utilizadas

Durante el desarrollo de este trabajo fueron utilizadas las especies *Selenastrum capricornutum* y *Scenedesmus acutus* a continuación se hace una descripción de ambas especies, de las cuales se conoce su capacidad de remoción y degradación de BaA y BaP (Warshawsky et al., 1990; Olmos-Espejel et al., 2012; García de Llasera et al., 2016; García de Llasera y García Cicourel, 2017).

La microalga *Selenastrum capricornutum* cuyo nombre fue formalmente modificado a *Pseudokirchneriella subcapitata* presenta la siguiente *clasificación taxonómica* *Eukaryota; Plantae; Viridiplantae; Chlorophyta; Chlorophyceae; Sphaeropleales; Selenastraceae; Selenastrum*. Es una microalga unicelular verde (clorófita) de agua

dulce con dimensiones entre 12 μm de largo y 5.9 μm de ancho, con forma de media luna, perteneciente al grupo de las algas verdes.

Por otro lado, la microalga *Scenedesmus acutus* cuyo nombre fue formalmente modificado a *Tetradesmus obliquus* presenta la siguiente *clasificación taxonómica* *Eukaryota; Plantae; Viridiplantae; Chlorophyta; Chlorophyceae; Sphaeropleales; Scenedesmaceae; Scenedesmus*. Es una microalga unicelular verde, sus dimensiones están entre 15-17.5 μm de largo y 4-7 μm de ancho con una apariencia elipsoide se puede encontrar en múltiples ambientes acuáticos y tiene característica de ser muy resistente. Suele presentarse en forma de colonias planas y lineales de 4, 8 y 16 células creciendo en agua dulce o salobre.

1.4 INMOVILIZACIÓN

Una de las mayores limitantes en sistemas de tratamiento algal es la separación de la biomasa del medio acuoso tratado. Numerosos esfuerzos han sido dedicados a desarrollar una tecnología adecuada para la recolección de microalgas que van desde la simple filtración de arena hasta el uso de centrifugas o autofloculación (Richmond, 1986; Mallick, 2002).

Es por ello que se ha propuesto la inmovilización de células de algas para el tratamiento de aguas residuales, la cual proporciona una fácil recuperación de la biomasa utilizada o producida, así como mayor flexibilidad en el diseño del reactor y estabilidad operativa en comparación con sistemas de suspensión convencionales, además de una protección contra sustancias tóxicas y depredación (Noüe y Proulx, 1988).

La inmovilización de células se define como el confinamiento físico o localizado de las células intactas en una región específica con la preservación de alguna actividad catalítica deseada (Karel et al., 1985). Una célula inmovilizada se define como una célula que por medios naturales o artificiales no puede moverse independientemente de sus vecinos a todas las partes de la fase acuosa del sistema en estudio (Tampion y Tampion, 1987).

Para inmovilizar microalgas se debe tener en cuenta un aspecto muy importante, el soporte inmovilizador debe permitir el paso de la luz para que las células capten eficientemente la energía necesaria para su proceso fotosintético, la superficie no debe ser tóxica, debe ser estable al tener contacto con el medio de crecimiento (Mallick, 2002).

La inmovilización puede ser clasificada en dos tipos, por un lado la inmovilización pasiva y por el otro inmovilización activa.

Inmovilización pasiva: Se basa en la habilidad natural que tienen muchos microorganismos a unirse a superficies y crecer en ellas, estas superficies pueden ser tanto de origen natural (esponjas o zacates) o sintéticos (resinas de polivinilo y poliuretano). En ellas la inmovilización de la célula se lleva a cabo por adsorción física debida a fuerzas electrostáticas o mediante la unión covalente entre la membrana celular y el portador (Kourkoutas et al., 2004).

Inmovilización activa: Son técnicas desarrolladas para atrapar o encapsular, ya sea vivas o muertas, las células de los microorganismos pudiendo ser mediante:

- Agentes floculantes: Quitosán
- Unión química
- Inmovilización en polímeros: Puede realizarse mediante polímeros de varios tipos ya sean sintéticos (como acrilaminas y poliuretanos), proteínas (como clara de huevo, colágeno, y gelatinas) y Polisacáridos naturales como el agar y el alginato

Durante el desarrollo de este trabajo se utilizó, inmovilización activa con un polímero, el alginato, a continuación se describe el método.

Los métodos de inmovilización en gel han sido desarrollados para un gran número de microorganismos en los cuales se puede utilizar una gran cantidad de polímeros para realizar diversas formas de gel como perlas, discos y películas.

La inmovilización con polímeros presenta algunas ventajas entre las cuales pueden destacar las altas concentraciones de biomasa viable, alta resistencia a compuestos tóxicos dentro del fluido tratado, posibilidad de inmovilizar diferentes especies de microorganismos separados físicamente entre sí, además de un alto coeficiente de difusión y una resistencia mecánica alta.

1.4.1. Inmovilización en alginato de calcio

El alginato es un polisacárido natural extraído de algas marinas marrones, compuesto por dos copolímeros lineales, el ácido manurónico y el ácido gulurónico. Caracterizados por ser polisacáridos de carga negativa en solución acuosa que pueden reaccionar con varios tipos de cationes divalentes, comercialmente vendido como una sal de sodio.

El método de inmovilización de microalgas en alginato, se basa en la formación de un gel aprovechando la capacidad de disolución en agua del alginato de sodio, donde el alginato, que posee carga negativa, forma un gel elástico por la adición de cationes divalentes siendo el calcio el más utilizado. Por lo que las microalgas son inmovilizadas dentro del gel formado por el intercambio de iones de sodio y iones de calcio en la formación de alginato de calcio que es un polímero insoluble.

Este sistema ha sido utilizado por el grupo de trabajo en la remoción tanto de BaA como de BaP en diferentes formas: perlas (Bernal Toris, 2015), discos (Baca Ibañez, 2019). En la práctica dependiendo de los requerimientos del medio inmovilizado se modifican las concentraciones del ion calcio para modular la textura y calidad del gel.

1.5 INGENIERÍA DE REACTORES

La Ingeniería de Reactores es la rama de la ingeniería que estudia las reacciones químicas, se basa en los conceptos cinéticos y termodinámicos de la reacción química aplicados a nivel industrial para diseñar y hacer funcionar correctamente aquel equipo donde deben tener lugar, el cual se denomina Reactor Químico (Levenspiel, 1962).

Existen algunos puntos importantes para determinar la viabilidad de un proceso en los reactores (Blanco Álvarez y Linarte Lazcano, 1978) entre ellos:

- **Tipo de reactor.** Para asegurar el tipo de contacto de los reactivos en el interior del reactor, y conseguir la mezcla deseada de la fase o fases presentes.
- **Condiciones de funcionamiento.** Mediante ellas se propician las condiciones óptimas que permitan el desarrollo de la reacción (P, T, tipo de reacción, tipo de operación, fases presentes).
- **Tamaño del proceso.** Para garantizar el suficiente tiempo de contacto entre las sustancias y catalizadores, en el caso de haberlos, y conseguir el avance deseado de la reacción.

1.5.1. Biorreactores

Los biorreactores pueden definirse como un reactor o sistema que soporta un ambiente biológicamente activo. Es decir, un biorreactor es un recipiente en el que se lleva a cabo un proceso químico que involucra organismos o sustancias bioquímicamente activas derivadas de dichos organismos, utilizado con el objetivo de obtener una transformación química deseada, ya sea el crecimiento celular de los microorganismos (producción de biomasa) o un compuesto químico (Spier et al., 2011, Singh et al., 2014).

En el diseño de reactores biológicos, contrario a los químicos, debe entenderse que su cinética no está determinada exclusivamente por la velocidad de reacción y las variables que la determinan, pues además depende del crecimiento celular y la estabilidad del proceso (afectando variables como los son: las condiciones de aire, oxígeno, nitrógeno, dióxido de carbono, los caudales, temperatura, pH, la velocidad de agitación, la velocidad de circulación, etc) (Chen y Hu, 2006, Singh et al., 2014).

1.5.2. Reacciones

Existen muchas maneras de clasificar a las reacciones químicas, dado el objetivo de este trabajo nos concentraremos en la clasificación de acuerdo con el número de fases que intervienen en ella agrupándolas en:

Homogéneas: En éstas, todas las reacciones del sistema se llevan a cabo en una sola fase, sea sólida, líquida o gaseosa. Las cuales pueden ser afectadas por variables como T, P y composición.

Heterogéneas: En ellas las reacciones son llevadas a cabo en dos o tres fases, pueden ser líquido-sólido, líquido-gaseoso o líquido-sólido-gaseoso.

Es este segundo tipo en el cual se desarrolla el proceso de estudio. No obstante, esta clasificación no se encuentra perfectamente definida, más al hablar de reacciones biológicas donde las enzimas de los organismos trabajan como catalizadores. Para el análisis, diseño y escalamiento de este tipo de procesos deben ser consideradas además de las relaciones entre los microorganismos los procesos físicos y químicos que tienen lugar en el reactor, lo cual complica el modelamiento del sistema, pues el metabolismo de un microorganismo y la interacción de las reacciones intracelulares son complicados (Casablancas y Santin, 1998).

Dado que en este trabajo no se determinó la degradación de los HAPs, sino su remoción del medio acuoso mediante microalgas inmovilizadas, el cual fue efectuado a temperatura y presión ambiente, se consideran en la implementación, optimización y escalamiento del reactor los procesos de transferencia de masa y el tipo de reactor como base en el proceso, dejando de lado los factores de transferencia de calor.

1.5.3. Clasificación de los biorreactores

De acuerdo al modo de operación los reactores se clasifican en (Figura 1.3):

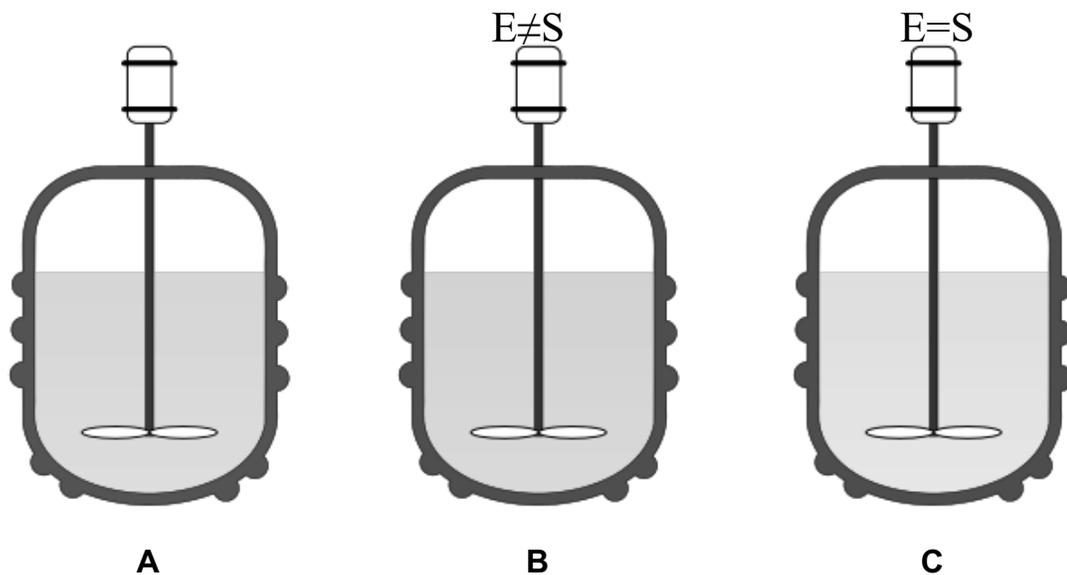


Figura 1.3 Clasificación de los reactores de acuerdo a su operación A) Discontinuo (Batch): B) Semicontinuo (Fed-batch) C) Continuo (Continuos)

- Discontinuo (Batch): Por lotes o tandas, sin alimentación; se coloca dentro del biorreactor la carga total de cada proceso (tanda o lote) de cultivo y se deja que se lleve a cabo el proceso productivo por el tiempo que sea necesario.
- Semicontinuo (Fed-batch): Por lotes alimentados, en él se alimenta una línea de entrada progresivamente para que el sistema de cultivo tenga una alta producción, al final del tiempo de operación los productos son retirados.
- Continuo (Continuos): En él se alimenta una línea de entrada y se drena una línea de salida de manera que los flujos o caudales de ambas líneas sean iguales y la producción sea continua.

Clases de reactores

Los biorreactores comúnmente son presentados en formas cilíndricas que varían en tamaños, su diseño y operación depende del bioproceso llevado a cabo. En el tratamiento de las aguas residuales se emplean reacciones químicas y biológicas que transcurren bajo condiciones controladas en el interior de unidades o tanques

llamados reactores (Singh et al., 2014). Las principales clases de reactores actualmente empleados son:

- 1) Reactor de flujo intermitente, también llamado reactor Batch
- 2) Reactor de flujo pistón, conocido también como reactor de flujo tubular
- 3) Reactor de mezcla completa o reactor de tanque agitado con flujo continuo
- 4) Reactor de lecho empacado o fluidizado
- 5) Reactor de manto de lodos con flujo ascendente
- 6) Reactor de membrana

Las reacciones homogéneas se desarrollan usualmente en los cuatro primeros reactores; mientras que las heterogéneas suelen hacerlo en las tres últimas clases de reactores.

1.6 ESCALAMIENTO

Existen numerosas definiciones de escalamiento:

En ingeniería de reactores el escalamiento requiere un proceso multietapas el cual puede ser directo para proyectos nuevos o el desarrollo de procesos de mayor tamaño, que parten de investigación a nivel laboratorio o plantas piloto (Wilson y Jones, 1992).

El escalamiento es el diseño y construcción de una unidad o conjunto de unidades de procesamiento a gran escala, en la cual se toman como base los cálculos y experimentos a una escala menor (Kossen, 1994).

El escalamiento es el proceso mediante el cual se desarrollan los criterios y las reglas de asignación numérica que determinan las unidades de medida significativas para llevar un proceso, operación u objeto de un tamaño dado a otro, desde procesos a nivel laboratorio, planta piloto y en el mejor de los casos un nivel industrial (Anaya Durand y Pedroza Flores, 2008).

Se define como la operación y puesta en marcha de manera exitosa de una unidad de tamaño comercial cuyo diseño se basa en experimentación de una

escala menor, el cual agrupa los conocimientos acumulados en el desarrollo del proyecto. Tales como velocidad de reacción, hidrodinámica, termodinámica, diseño y modelamiento matemático (Bisio y Kabel, 1985).

Sin embargo, cada una de ellas tienen la característica de ser técnicas o procedimientos mediante las cuales se obtiene la información necesaria para realizar la transferencia de un proceso de un tamaño dado a otro (escala laboratorio, planta piloto y en el mejor de los casos a nivel industrial). En él se analizan los parámetros y/o variables involucradas en un proceso para su desarrollo a equipos de mayor tamaño.

En este trabajo se tomó como escalamiento la aplicación de los resultados y parámetros en la implementación de biorreactores para realizar el incremento en el volumen mediante la extrapolación de los parámetros óptimos, buscando con ello por un lado la implementación exitosa de biorreactores de mayor capacidad y por otro información que pudiera servir en el planteamiento de un futuro escalamiento a planta piloto. Por lo que si bien se utiliza la información obtenida en el análisis de los parámetros a diferentes volúmenes de operación (1, 2, 3 y 4 veces) y el principio de similitud para la evaluación todo el escalamiento realizado fue efectuado a nivel laboratorio.

1.6.1. Métodos de escalamiento

Aún con el desarrollo de técnicas y modelos para realizar el escalamiento de un proceso químico, hasta ahora no se ha encontrado un método que permita aumentar la escala de producción de un proceso desde una escala laboratorio a mayores o menores, según el requerimiento, de manera eficaz y eficiente. Dado que cada proceso es dependiente de la unidad donde se realiza y los fenómenos implicados en el proceso. Por lo que ha sido necesario el realizar experimentaciones con aumentos graduales de escala que aportan información del proceso y correcciones que se van realizando durante su puesta en marcha. En la Figura 1.4 se presenta un esquema de escalamiento del proceso en cuestión.

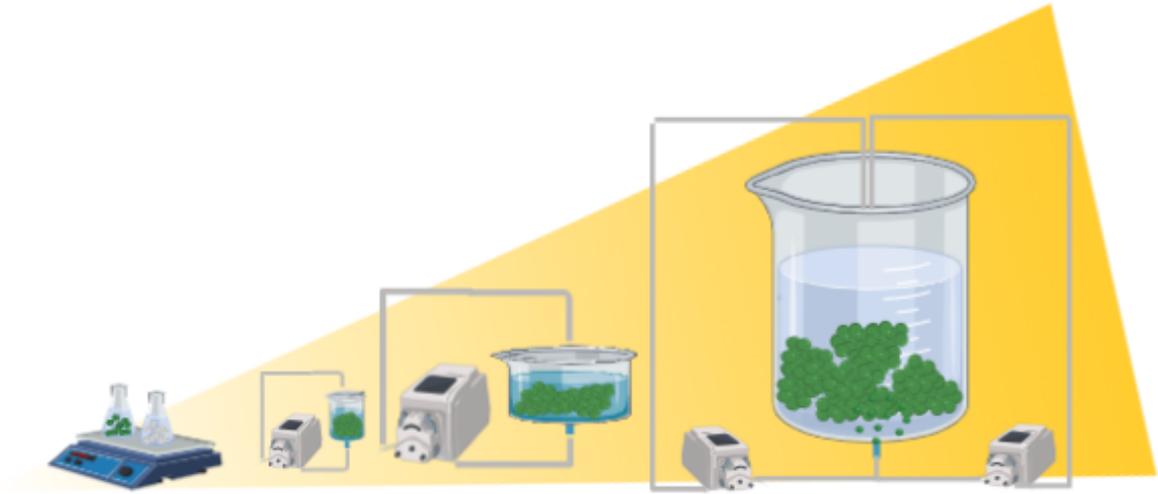


Figura 1.4 Modelo de escalamiento empírico por similitud utilizado en este trabajo
Sin embargo, existen diferentes métodos utilizados para el escalamiento de procesos entre ellos:

- Fenomenológico: No involucra consideraciones moleculares y permite hacer predicciones en rangos o intervalos de operación no estudiados experimentalmente.
- Empíricos: Se postula sin bases teóricas y se espera solamente que ajuste la interacción entre los datos en el rango o intervalo de experimentación.
- Semejanza o similitud: Se refiere a las relaciones entre sistemas físicos y el tamaño de estos, base para el escalamiento de procesos tanto químicos como bioquímicos y caracterizados por tres cualidades: tamaño, forma y composición.

1.6.2. Principio de similitud

En el presente trabajo se ejecutó el escalamiento del biorreactor mediante el principio de similitud por lo que a continuación se explican sus bases.

El principio de similitud está relacionado con el concepto de forma a partir del hecho de que ésta es independiente del tamaño y la composición. Por lo que la configuración espacial y temporal de un sistema físico está determinada por razones

de magnitudes dentro de un sistema físico mismo y no dependen del tamaño ni de la naturaleza de las unidades en que se miden las magnitudes (González Castellanos, 2000). Este concepto de forma no involucra únicamente a las proporciones geométricas de sus miembros, sino también deben integrar cuestiones como son: patrones de flujo en fluidos, gradientes de temperatura y perfiles de concentración con respecto al tiempo (Anaya Durand y Pedroza Flores, 2008).

Dentro del proceso de escalamiento por similitud son de interés cuatro tipos:

1. Similitud geométrica (tamaño)

La similitud geométrica se define en términos de correspondencia entre dos cuerpos sólidos existentes en un eje de coordenadas x, y, z; en los cuales se considera que dos cuerpos son geoméricamente similares cuando para todo punto en el primer cuerpo existe un punto en el segundo como puede observarse en la Figura 1.5.

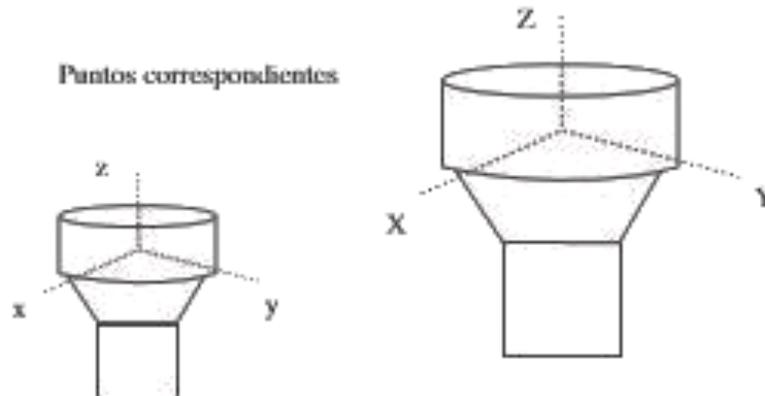


Figura 1.5 Similitud geométrica tomada de Anaya Durand y Pedroza Flores, 2008

La similitud puede presentarse como un escalamiento lineal donde la relación entre cada una de sus coordenadas es constante (Ecuación I), o una similitud distorsionada (Ecuación II) donde las razones de escala son diferentes en las diferentes direcciones:

$$\frac{X}{x} = \frac{Y}{y} = \frac{Z}{z} = L$$

Ecuación I

$$\frac{X}{x} = X' \quad \frac{Y}{y} = Y' \quad \frac{Z}{z} = Z'$$

Ecuación II

2. Similaridad mecánica (Flujo)

Consideran las fuerzas que intervienen en el cuerpo a escalar, comprende en su área a las similaridades estática, cinemática y dinámica. Cada una de éstas puede considerarse como una extensión del concepto de similaridad geométrica en sistemas fijos o en movimiento sujetos a fuerzas externas o internas.

- La similaridad estática la cual considera las deformaciones en cuerpos sujetos a esfuerzos constantes que al mantener similaridad geométrica permanecen similares.
- La similaridad cinemática, por su parte, tiene aplicación en sólidos y fluidos en movimiento que en sistemas con similaridad geométrica presentan partículas que trazan trayectorias geoméricamente correspondientes en un intervalo de tiempo. Por lo que si dos fluidos son geométrica y cinemáticamente similares, sus patrones de flujo, las velocidades de transferencia de calor y masa se encuentran en una relación simple.
- La similaridad dinámica está relacionada con las fuerzas que aceleran o retardan el movimiento de las masas dentro de sistemas dinámicos. Dicta que sistemas en movimiento con similaridad geométrica son dinámicamente similares cuando las relaciones de todas las fuerzas correspondientes son iguales.

3. Similaridad térmica (Temperatura)

Esta similaridad involucra a los sistemas en los cuales se presenta flujo de calor por lo que se introduce la dimensión. En ella el calor puede fluir por convección, conducción y radiación por lo que la diferencia de temperaturas a tiempos correspondientes entre un par de puntos de un sistema y entre el par de puntos de otro son correspondientes. Los sistemas que presentan

similaridad geométrica son térmicamente similares cuando la diferencia de temperatura conserva una relación constante entre ellos.

4. Similaridad química y biológica

Involucra los sistemas en los cuales se presentan transformaciones, procesos de difusión, las velocidades de generación y consumo de sustancias. Depende de las diferencias de concentraciones en dos sistemas, las cuales deben guardar relaciones semejantes (Baasel, 1990). Por otro lado, serán biológicamente semejantes cuando los organismos se expongan a las mismas condiciones.

Estrictamente hablando, cada tipo de similaridad es necesario para realizar el escalamiento de cualquier sistema. Por ejemplo, para efectuar una similaridad química completa se requiere de tomar en cuenta las similaridades geométricas, mecánicas y térmicas.

Capítulo 2 EQUIPOS, MATERIALES

2.1 EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS

2.1.1. Equipos

Cromatógrafo y accesorios

- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (KNAUER, Alemania), con dos bombas modelo Smartline 1000
- Detector espectrofotométrico UV de arreglo de diodos, modelo Smartline 2600 (KNAUER, Alemania)
- Software de control y procesamiento de datos Eurochrom, edición V 3.05
- Bucle de inyección de 20 μ L (KNAUER, Alemania)
- Calentador de columna TC-50 (EPPENDFORF, EUA)
- Precolumna de 20 x 2 mm, empacada con adsorbente Nucleosil 100-5 C18, 5 μ m (MACHEREY-NAGEL, Alemania)
- Columna analítica Hypersil de 150 x 4.6 mm empacada con fase reversa C18 tamaño de partícula 5 μ m (THERMO SCIENTIFIC, EUA)

En la Figura 2.1 se presenta el cromatógrafo utilizado en la experimentación.

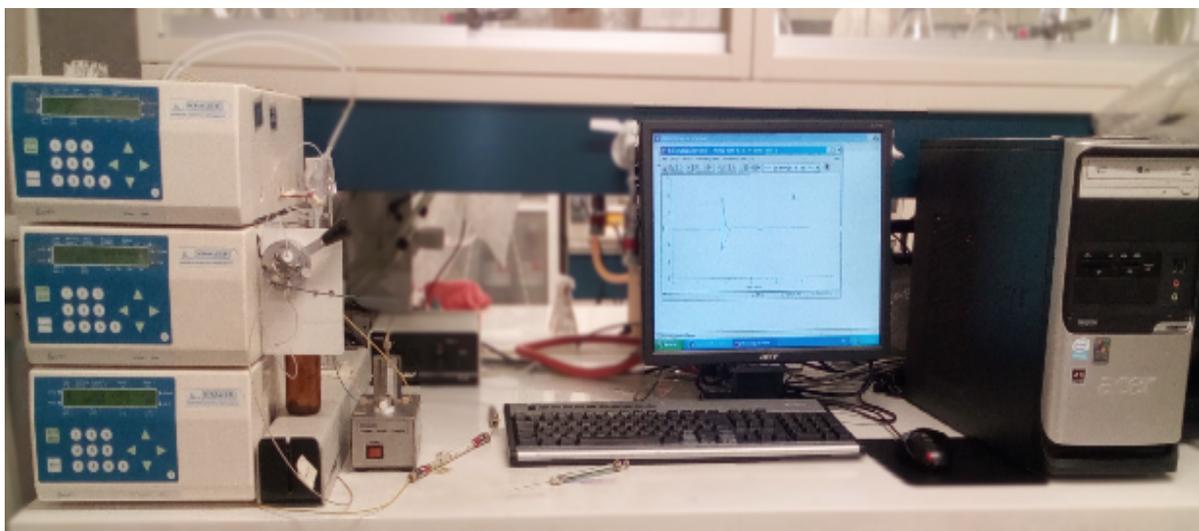


Figura 2.1 Cromatógrafo de líquidos de alta resolución KNAUER, con dos bombas modelo Smartline 1000

Otros equipos

- Baño de ultrasonido modelo 1510, para desgasificación de la fase móvil (BRANSON; EUA)
- Balanza analítica AV 114 C (OHAUS, EUA)
- Autoclave eléctrica 2540EL (TUTTNAUER, NL)
- Agitador Orbital (Thermo Scientific, EUA)
- Espectrofotómetro Spectronic Genesys 5 (THERMO SCIENTIFIC, EUA)
- Microscopio óptico (National OPTICAL, EUA)
- Centrífuga 225 (THERMOFISHER SCIENTIFIC, EUA)
- Campana de flujo laminar 11231 BBC86 (BIOBASE, China)
- Agitador orbital con controlador de temperatura SI-600R (JEIOTECH, Corea)
- Lámpara con foco de luz amarilla 20 Watts (OSRAM, México)
- Bomba Peristáltica Master Flex C/L 77122-14 (COLE PARMER, EUA)
- Bomba Peristáltica Master Flex C/L 77120-42 (COLE PARMER, EUA)

2.2.2. Materiales

- Jeringa de 50 μ L (Agilent, Australia)
- Asa bacteriológica en anillo
- Mecheros Bunsen
- Celdas de poliestireno para espectrofotómetro, región visible, 2.5 mL, 10 mm paso óptico
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Sistema de esterilización aséptico Sterifil (MILLIPORE, EUA)
- Filtros de nitrocelulosa estériles con tamaño de poro de 0.22 μ m y 47 mm de diámetro para el sistema Sterifil (MILLIPORE, IRLANDA)
- Cartuchos de empaque para extracción en fase sólida de 6 mL (VARIAN, EUA)
- Cartuchos de empaque para extracción en fase sólida de 1 mL (VARIAN, EUA)
- Adaptador conector para cartucho de extracción en fase sólida de 6 mL
- Jeringa

- Micropipeta 100-1000 μL (EPPENDORF, EUA)
- Pipeta graduada de 5 mL
- Pipeta graduada de 10 mL
- Pipeta volumétrica de 6 mL
- Pipeta volumétrica de 15 mL
- Frits de polietileno para cartucho de 6 mL
- Frits de polietileno para cartucho de 3 mL
- Vasos de precipitado de 50 mL, 150 mL y 200 mL
- Manguera Viton blanca, diámetro interno 0.125 pulgadas (COLE PARMER, EUA)
- Malla de acero inoxidable con 1 mm² entre los recuadros que la conforman
- Matraces volumétricos de 50 y 100 mL
- Matraz Erlenmeyer de 50, 125 y 300 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
- Viales con tapón de rosca de 4 mL
- Viales con tapón de rosca de 2 mL
- Bulbos para pipeta
- Propipeta
- Algodón
- Gasas
- Papel estroza
- Masking tape
- Papel aluminio
- Espátula
- Plástico Parafilm

2.2.3. Estándares, Reactivos y Disolventes

Estándares

- Estándar de Benzo[a]antraceno (CHEMSERVICE, EUA) pureza 99%
- Estándar de Benzo[a]pireno (CHEMSERVICE, EUA) pureza 99%

Reactivos para preparación de medio Bristol

- Nitrato de sodio (NaNO_3) (MALLINCKRODT, Irlanda)
- 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)

Otros reactivos

- Proteosa Peptona (MCD Lab, México)
- Agar bacteriológico (MCD Lab, México)
- Alginato de sodio (SIGMA ALDRICH, EUA)
- Cloruro de calcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (SIGMA-ALDRICH, EUA)
- Sílice C-18 supelclean de 45 μm de diámetro de partícula (Supelco, EUA)
- Citrato de Sodio (SIGMA ALDRICH, EUA)

Disolventes

- Metanol (MEOH) grado cromatográfico (J.T. BAKER. EUA)
- Acetonitrilo (ACN) grado cromatográfico (J.T. BAKER. EUA)
- Isopropanol (J.T. BAKER. EUA)
- Agua destilada (CONQUIMEX, México)
- Alcohol etílico (CONQUIMEX, México)
- Agua desionizada (obtenida mediante un equipo de purificación Simplicity UV (MILLIPORE, EUA)

2.2.4. Microorganismos

Cepas de las microalgas *Selenastrum capricornutum* y *Scenedesmus acutus*, adquiridas de la colección de cultivos de algas de la universidad de Austin, Texas (UTEX, EUA). Se incluye una fotografía en la Figura 2.2 de ambas especies.

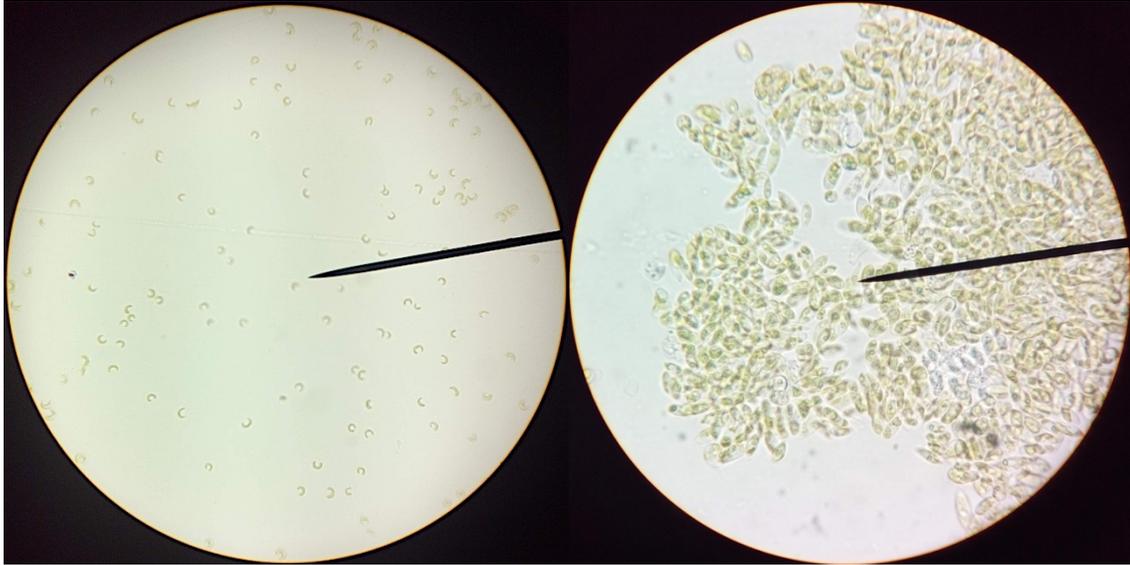


Figura 2.2 Cepas de las microalgas *Selenastrum capricornutum* izquierda y *Scenedesmus acutus* derecha. Adquiridas de la colección de cultivos de algas de la Universidad de Austin, Texas (UTEX, EUA)

2.2.5. Reactores

Reactor de matraz de agitación orbital

- Matraz Erlenmeyer de 50 mL
- Agitador orbital con control de temperatura y velocidad, modelo SI600R JEIOTECH, COREA

Reactores tipo tanque

- Recipiente de vidrio de 50 mL en forma de vaso de precipitado con salida inferior (**RSI50**)
- Recipiente de vidrio de 50 mL en forma de vaso de precipitado con salida lateral (**RSL50**)
- Recipiente de vidrio de 170 mL en forma de vaso de precipitado con salida inferior (**RSI170**)

- Recipiente de vidrio de 170 mL en forma de vaso de precipitado con salida lateral (RSL170)
- Recipiente de vidrio de 4,000 mL (vaso de precipitado) con salida inferior y modificaciones en su base para la adaptación de una manguera (RSI4000)

En la Figura 2.3 se presentan los diseños de los reactores utilizados.

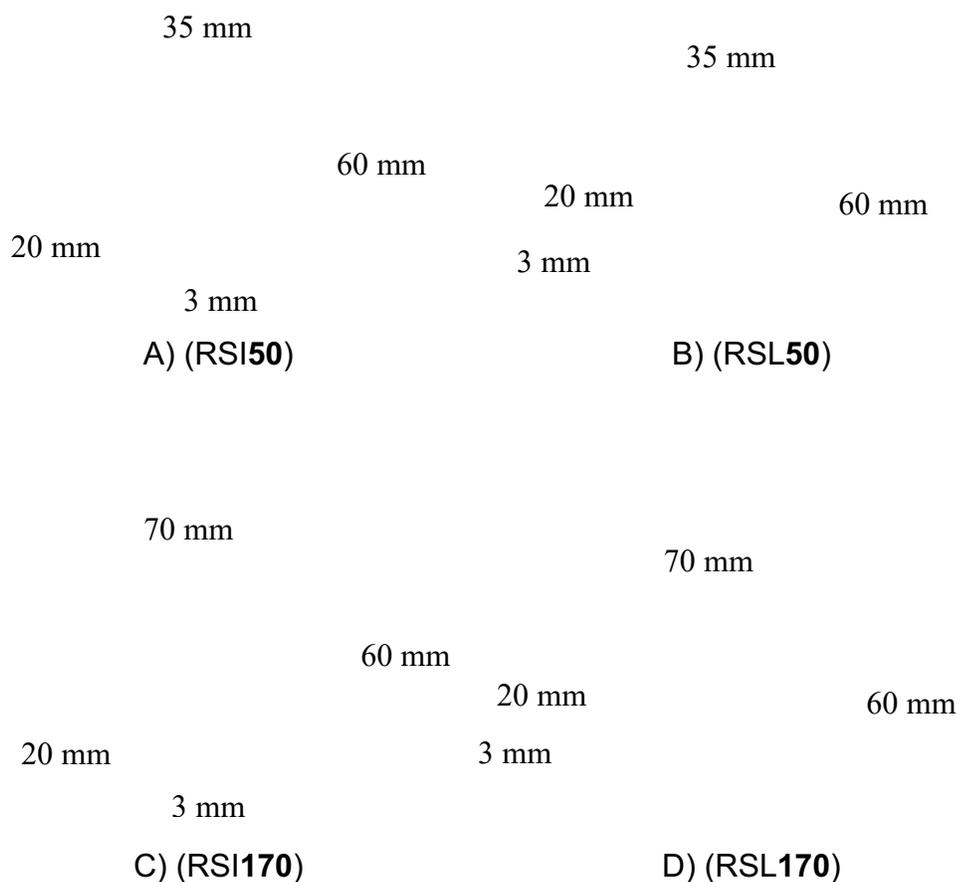


Figura 2.3 Esquema de los reactores utilizados. Reactores de salida inferior de 50 y 170 mL **A** y **C**. Reactores de salida lateral de 50 y 170 mL **B** y **D**

Capítulo 3 DESARROLLO EXPERIMENTAL

Experimentación

La Figura 2.4 muestra de manera global la experimentación utilizada durante el desarrollo de este trabajo, la cual fue organizada en tres secciones:

- Metodología analítica
- Manejo de cultivos
- Diseño y evaluación de los biorreactores



Figura 3.1 Esquema general de experimentación

3.1 METODOLOGÍA ANALÍTICA

3.1.1. Separación cromatográfica y detección

Se analizó una disolución estándar de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada uno de los HAPs (BaA y BaP) por cromatografía de líquidos con las siguientes condiciones cromatográficas:

- Fase móvil: 100% Metanol
- Columna analítica: Hypersil ODS de 150 x 4.6 mm empacada con fase inversa C18, tamaño de partícula $5 \mu\text{m}$

- Flujo: 1 (mL/min)
- Volumen de inyección: 20 µL
- Temperatura ambiente

Probando para la detección UV diferentes longitudes de onda, se realizó así un barrido con del fin de determinar la longitud de onda de máxima absorción. Con ello, se encontró que la longitud de onda para la absorbancia óptima del BaA fue de 273 nm y para el BaP de 285 nm, longitudes donde se obtuvieron los mayores valores de área para cada hidrocarburo.

3.1.2. Validación del sistema cromatográfico

Para poder asegurar la confiabilidad de los resultados obtenidos por el sistema CLAR-UV, fue necesario efectuar la validación del sistema cromatográfico y del método utilizado EFS-CLAR-UV.

3.1.2.1. Precisión del sistema

Repetitividad intra-día

Se analizaron en un mismo día muestras por triplicado con disoluciones estándar de BaA y BaP a concentraciones para ambos hidrocarburos de 0.25, 1, 2, 6 y 8 µg mL⁻¹ (la concentración de 1 µg mL⁻¹ se realizó por quintuplicado, para una mejor comparación con inyecciones realizadas en días subsecuentes), obteniéndose los datos de área en cada cromatograma, con lo que se calculó el coeficiente de variación (CV) de acuerdo a la Ecuación 1.

$$\%CV = \frac{S}{\bar{X}} * 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde:

%CV es el porcentaje del coeficiente de variación

\bar{X} es el promedio de los resultados obtenidos del cromatograma

S es la desviación estándar de los resultados

Repetitividad inter-día

Se analizaron en 4 días diferentes disoluciones por quintuplicado con BaA y BaP a la misma concentración para ambos HAPs de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, obteniéndose los datos de las áreas en cada cromatograma, para poder observar la variación entre cada inyección en días diferentes.

3.1.2.2. Linealidad del sistema

Curva de calibración

Se analizaron disoluciones por triplicado con BaA y BaP a la misma concentración para ambos HAPs con 0.25, 1, 2, 6 y $8 \mu\text{g mL}^{-1}$, obteniéndose los datos de áreas en cada cromatograma, para poder correlacionarlas en un gráfico con la concentración correspondiente y verificar su coeficiente de correlación lineal.

Límites de detección (L.D.) y cuantificación (L.C.) instrumentales

Se hicieron por triplicado 5 puntos de una curva de calibración a bajas concentraciones con los siguientes valores 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 y $1 \mu\text{g mL}^{-1}$; después se obtuvieron las áreas para cada analito en su longitud onda de máxima absorción (λ). Finalmente, se calcularon los límites de detección y cuantificación utilizando la desviación estándar de la regresión lineal, con las ecuaciones 2 y 3 respectivamente.

$$L. D. = \frac{3.3 * S_{y/x}}{b} \quad \text{Ecuación 2}$$

$$L. C. = \frac{10 * S_{y/x}}{b} \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde:

L.D. Es el límite de detección

L.C. Es el límite de cuantificación

$S_{y/x}$. Es la desviación estándar de la regresión lineal

b: Es la pendiente de la curva de calibración

3.1.3. Optimización del método de EFS-CLAR-UV

La evaluación de la eficiencia de los reactores se efectuó estudiando la remoción de los HAPs en muestras de agua potable y con microalgas inmovilizadas que fueron expuestas a diferentes tiempos. Para este efecto, se separó del medio acuoso a las microalgas inmovilizadas en las perlas de alginato de calcio, contenidas en el reactor en estudio y este medio acuoso se pasó a través de un cartucho de Extracción en Fase Sólida (EFS) para aislar y pre-concentrar a los HAPs remanentes. Los extractos obtenidos después de procesar las muestras por EFS, se analizaron mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR). La optimización de este método por EFS-CLAR-UV se basó en la referencia de Bernal Toris, del año 2015, donde se procesa la muestra acuosa sin isopropanol para evitar la precipitación del alginato en la muestra acuosa proveniente de las perlas con algas inmovilizadas, evitando la obstaculización por taponamiento del cartucho de EFS. La metodología de EFS-CLAR-UV se detalla en la siguiente sección.

Procedimiento de la extracción de fase sólida EFS

La EFS se realizó con las muestras acuosas provenientes de los reactores en cartuchos empacados con 300 mg de sílice C18. Se manejaron cuatro etapas:

1. Activación de sílice C18 virgen

La sílice C18 a ser utilizada se empaca en un cartucho de EFS de 6 mL en medio de dos fritz (filtros) y se le hizo pasar 1 mL de metanol por cada gramo de sílice C18 empacado. El metanol agregado fue eluido totalmente por gravedad, posteriormente se dejó secando con vacío por una hora, esto con el objetivo de orientar las cadenas hidrofóbicas de la sílice C18 hacia el exterior favoreciendo que puedan estar expuestas en los HAPs y tener un mejor contacto con los mismos.

2. Preparación y acondicionamiento del cartucho de EFS con sílice C18

Una vez activada y seca, fueron empacados 300 mg de la sílice C18 en un cartucho de EFS de 6 mL en medio de 2 fritz, uno debajo de la sílice C18 y uno arriba.

Posteriormente, a gravedad, se le hicieron pasar 5 mL de ACN seguidos de 15 mL de agua destilada. Esto con el objetivo de orientar las cadenas hidrofóbicas de la sílice C18 al exterior y acondicionar a un medio similar al de la muestra acuosa que a continuación será introducida.

3. Carga de la muestra acuosa fortificada con los hidrocarburos

La muestra acuosa de volumen de 15 mL de agua de la llave fortificada con 4 µg de BaA y 4 µg de BaP para lograr una concentración de 0.266 µg mL⁻¹, se hizo pasar a través del cartucho. La aplicación de la muestra fue efectuada, regulando el flujo mediante vacío, para que la velocidad de goteo fuera tal que caigan aproximadamente 2 gotas cada segundo.

Nota: La recuperación del medio acuoso del reactor de 50 mL, donde fue efectuado el ensayo de exposición, es seguido de un enjuague con 6 mL de agua desionizada de las perlas que siguen contenidas en él, con 6 mL de agua desionizada. Posteriormente, estas perlas fueron retiradas.

4. Lavado del reactor y aplicación al cartucho

Una vez retiradas las perlas se procedió a lavar el reactor con 10 mL de una mezcla de agua-isopropanol 80:20 v/v, lavado que fue recolectado en el matraz de recuperación, esto con el objetivo de desorber la mayor cantidad posible de HAPs que pudieran quedar presentes en el reactor o el matraz. Finalmente, esta mezcla (agua-isopropanol) procedente del lavado del reactor, fue agregada al cartucho de EFS.

5. Secuencia de elución en la extracción

La secuencia de elución consistió en 4 pasos:

Eluentes débiles (“clean-up” utilizadas para la eliminación de interferencias)

- I. 10 mL de H₂O-ACN (90:10 v/v)
- II. 1 mL de H₂O-ACN (70:30 v/v)
- III. 3 mL de H₂O-ACN (45:55 v/v)

Eluente fuerte

- IV. 6 mL de ACN 100%

El acetonitrilo puro en el paso IV fue usado para la elución de los HAPs de interés a gravedad, mediante la adición secuencial de alícuotas de 2 mL, secando el cartucho con aire entre cada aplicación con ayuda de una jeringa, hasta completar el volumen de elución de 6 mL.

Recobro de la extracción

La evaluación del recobro se realizó mediante la inyección de los extractos provenientes de muestras fortificadas. Se obtuvieron los picos cromatográficos de los dos compuestos en estudio y posteriormente fueron comparados con los de una disolución estándar preparada cada día de experimentación con 4 µg de BaA y 4 µg de BaP en 6 mL de ACN. Al obtener las áreas correspondientes se calculó el recobro mediante la Ecuación 4.

$$\%Recobro = \frac{\text{Área de extracto}}{\text{Área de disolución estándar}} * 100 \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde:

Área de extracto=área del extracto a analizar

Área de disolución estándar=área de disolución estándar con concentración conocida

% de recobro=% de recobro recuperado

Dicho porcentaje de recobro es la medida de la recuperación real, de la cantidad de HAPs contenida en la muestra acuosa original. La Figura 2.5 ilustra y resume la metodología de extracción anteriormente descrita.

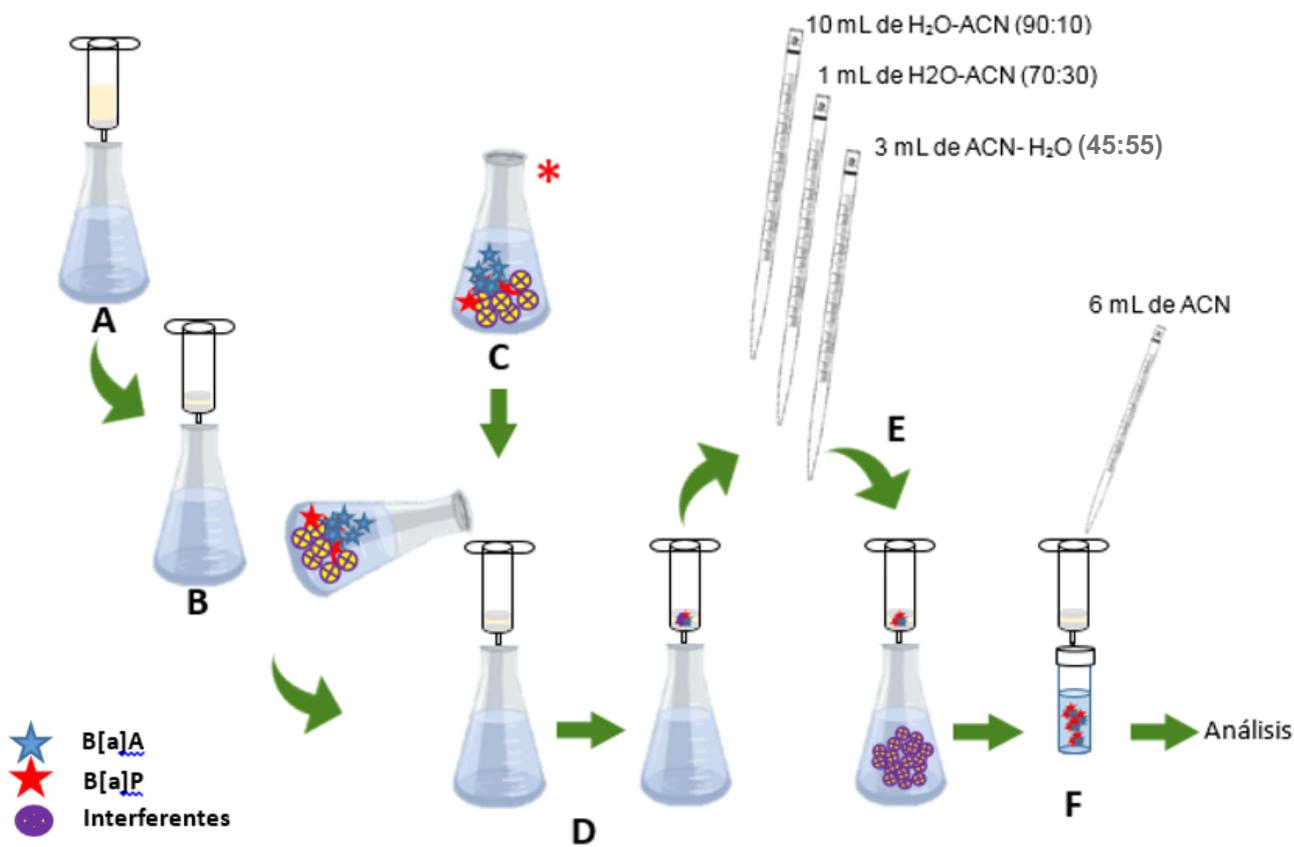


Figura 3.2 Esquema de la metodología de extracción en fase sólida
A) activación de sílice. **B)** preparación y acondicionamiento del cartucho. **C)** recuperación de la muestra **D)** carga de la muestra al cartucho de EFS. **E)** eliminación de interferentes mediante eluentes débiles. **F)** aplicación de eluentes fuertes para la recuperación de los HAPs con 6 mL de ACN

Linealidad del método de EFS-CLAR-UV

Para la evaluación de la linealidad del método se realizó la extracción por EFS en muestras de 15 mL en agua de la llave, fortificadas con 1, 2, 4, 8, 12 y 16 μg de HAPs con las correspondientes concentraciones: 0.067, 0.133, 0.267, 0.533, 0.800, y 1.067 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Se recuperaron los extractos de cada ensayo y se comparó su respuesta con la de los controles correspondientes. Con los resultados obtenidos se procedió a evaluar la linealidad del método con las gráficas de área contra concentración de la muestra y de cantidad recuperada contra cantidad adicionada de hidrocarburo.

Las concentraciones esperadas de recuperación al 100% en los extractos de 6 mL fueron:

- Para 1 μg . Es decir $0.166 \mu\text{g mL}^{-1}$
- Para 2 μg . Es decir $0.333 \mu\text{g mL}^{-1}$
- Para 4 μg . Es decir $0.666 \mu\text{g mL}^{-1}$
- Para 8 μg . Es decir $1.333 \mu\text{g mL}^{-1}$
- Para 12 μg . Es decir $2 \mu\text{g mL}^{-1}$
- Para 16 μg . Es decir $2.66 \mu\text{g mL}^{-1}$

De esta manera, se compararon las concentraciones finales después de la extracción contra los controles de cada concentración y se construyeron las gráficas de concentración adicionada vs concentración recuperada con dichos resultados.

3.1.4. Remanente de HAPs contenidos en las perlas de alginato

El análisis del remanente de los HAPs en el reactor RSI**4000**, además de en el medio acuoso, donde se realizó la extracción por EFS con el método descrito en la sección 2.3.1.3., se realizó también en la biomasa y el alginato que conformaron las perlas de alginato, a través de la siguiente metodología:

- Toma de 90 perlas de alginato con las microalgas
- Adición de citrato de sodio 10% p/v hasta completar un volumen de 15 mL
- Homogenización de la mezcla de perlas de alginato y citrato de sodio al 10 %
- Centrifugación por 15 minutos a 3900 rpm para separar el botón de la biomasa del sobrenadante
- Análisis del sobrenadante por EFS-CLAR-UV y de la biomasa por DMFS-CLAR-UV

En la Figura 2.6 se describe de manera general la metodología de separación de los componentes del reactor (medio líquido, alginato y biomasa) para el análisis de HAPs, metodología utilizada en el análisis del reactor de 4,000 mL. La Dispersión

de Matriz en Fase Sólida DMFS es una técnica de extracción basada en el uso de adsorbentes para el manejo de muestras sólidas.

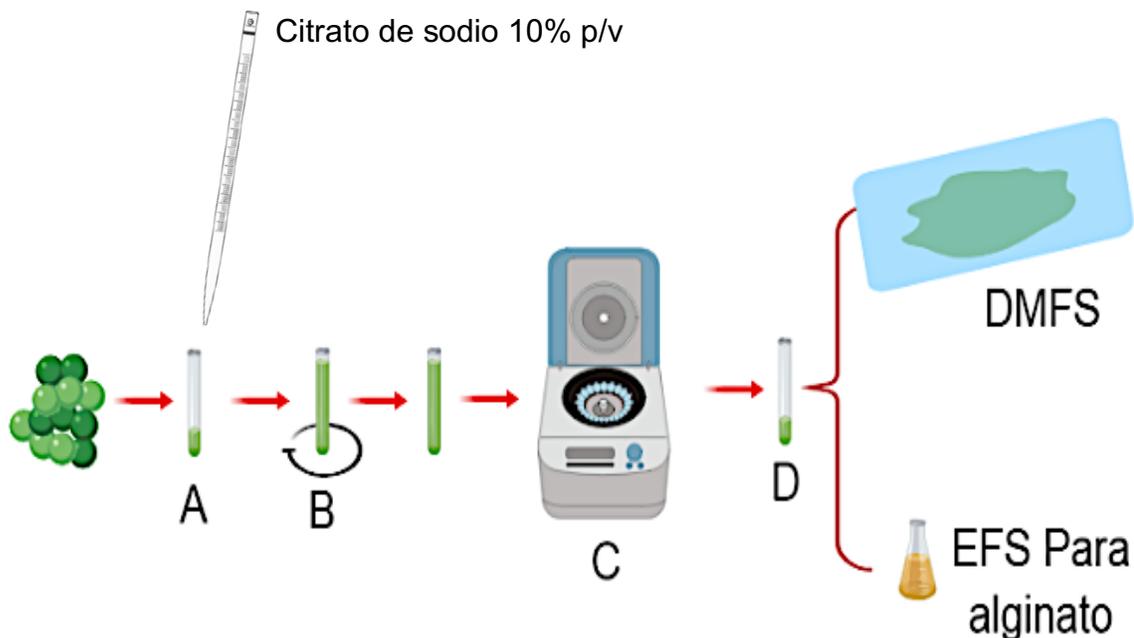


Figura 3.3 Análisis de remanente de hidrocarburos en perlas de alginato
A) toma de muestras (perlas) y adición de citrato de sodio. **B)** homogenización hasta la disgregación de las perlas. **C)** separación mediante el centrifugado de las muestras. **D)** recuperación del alginato y la biomasa para su análisis

El análisis de alginato se realizó mediante la metodología utilizada en la sección 2.3.1.3, solamente incluyendo un cambio en la secuencia de los eluyentes débiles de la siguiente forma, eliminando el eluyente con 70% acetonitrilo.

- I. 30 mL de agua
- II. 4 mL de Agua:ACN 90:10
- III. 3 mL de Agua:ACN 55:45

El análisis de la biomasa se realizó al coleccionar la biomasa centrifugada en un portaobjetos para efectuar la extracción de los HAPs por la técnica de Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS), mediante la siguiente metodología.

Después de un secado de 24 h, con ayuda de una espátula se procedió a raspar la biomasa del portaobjetos y se pesó la masa desprendida de éste.

Se dispersó la biomasa seca con 100 mg de sílice C18 en un mortero de ágata, se mezcló y se trasladó la mezcla a un cartucho de EFS de 1 mL con un filtro tipo fritz en la parte inferior y colocando otro filtro en la parte superior. Posteriormente, se aplicó la siguiente secuencia de eluentes:

Eluentes débiles

- I. 10 mL de AGUA:ACN 90:10
- II. 5 mL de AGUA:ACN 80:20
- III. 1.5 mL de AGUA:ACN 60:40

Eluentes fuertes

- IV. 1 mL de AGUA:ACN 10:90

La evaluación del recobro fue analizada mediante la Ecuación 4.

3.2 MANEJO DE CULTIVOS E IMOVILIZACIÓN

3.2.1. Crecimiento de microalgas

Los cultivos individuales de las microalgas *Selenastrum capricornutum* y *Scenedesmus acutus* se mantuvieron en condiciones axénicas, sembrándose inicialmente para su mantenimiento en medio sólido con agar al 0.1 % p/v, en tubos de ensayo de vidrio de 20 x 150 milímetros. Posteriormente, para su crecimiento y uso en los ensayos de exposición y remoción, fueron sembrados los medios líquidos con un asa bacteriológica con la que se transfirieron las microalgas desde el medio sólido hacia el medio acuoso, contenido en matraces de vidrio de 150 y 300 mL.

Medio sólido

En los tubos de ensayo de 20 x 150 mm fueron colocados 15 mL de medio Bristol proteosa peptona 1 % p/v y se les adicionó agar para tener una concentración de 1.5 % p/v. Se les colocó un tapón de algodón y gasa y fueron esterilizados en

autoclave. Después de su esterilización fueron colocados en una base de madera, cuidando que la solución no tocara el tapón, y se mantuvieron en una posición inclinada, durante un lapso de aproximadamente 24 h, hasta su total enfriamiento y gelificación.

En condiciones asépticas los medios sólidos fueron inoculados con una asada de biomasa de otro cultivo sólido y fueron colocados en ciclos de iluminación de 16 horas de luz (con un foco de luz amarilla de 10 watts) por 8 horas de oscuridad, a temperatura ambiente.

Medios Líquidos

Los medios de cultivo líquidos de crecimiento de las microalgas, *S. capricornutum* y *S. acutus*, de los cuales se tomaron alícuotas de 15 mL para los ensayos de exposición a los HAPs, fueron monitoreados semanalmente hasta tener una absorbancia de 1. Se tomaron pequeños volúmenes de estos para efectuar las mediciones se efectuaron en un espectrofotómetro a 685 nm (longitud de onda de máxima de absorción de la clorofila). De esta manera, la absorbancia 1 es equivalente a 4.5×10^6 células /mL de cultivo para *S. capricornutum* (Olmos Espejel, 2012) y 4×10^6 células/mL para *S. acutus* (Montaño Montiel, 2013). En la Figura 2.7 se presentan imágenes de los medios de cultivo de las especies utilizadas.

Para que los cultivos líquidos lleguen a dicha absorbancia fueron cultivados en matraces Erlenmeyer con medio de cultivo Bristol, la composición del medio es presentada en la Tabla 2.1, al que además se le adicionó proteosa peptona al 0.1 % p/v. Previamente a ser transferidas las microalgas del medio sólido al cultivo líquido contenido en los matraces Erlenmeyer, el medio Bristol con proteosa peptona fue esterilizado por 30 minutos en la autoclave eléctrica a 121 °C, esto para asegurar la condición aséptica cuando se siembren las microalgas en el medio acuoso. Una vez que se dejaron enfriar los medios fueron inoculadas las dos especies de microalgas por separado, tomando una asada cargada de biomasa de los cultivos sólidos de cada cepa. Al igual que los medios sólidos, se sometieron a

ciclos de iluminación de 16 horas (con foco de luz amarilla de 10 watts) por 8 horas de oscuridad, a temperatura ambiente y agitación orbital semiconstante.

Tabla 3.1 Composición del medio de cultivo Bristol

COMPONENTE	CANTIDAD	CONCENTRACIÓN EN LA SOLUCIÓN STOCK	CONCENTRACIÓN FINAL
NaNO₃	10 mL/L	10 g/400 mL H ₂ O	2.94 mM
CaCl₂*2H₂O	10 mL/L	1 g/400 mL H ₂ O	0.17 mM
MgSO₄*7H₂O	10 mL/L	3 g/400 mL H ₂ O	0.3 mM
K₂HPO₄	10 mL/L	3 g/400 mL H ₂ O	0.43 mM
KH₂PO₄	10 mL/L	7 g/400 mL H ₂ O	1.29 mM
NaCl	10 mL/L	1 g/400 mL H ₂ O	0.43 mM
Proteosa peptona	0.1 % p/v		

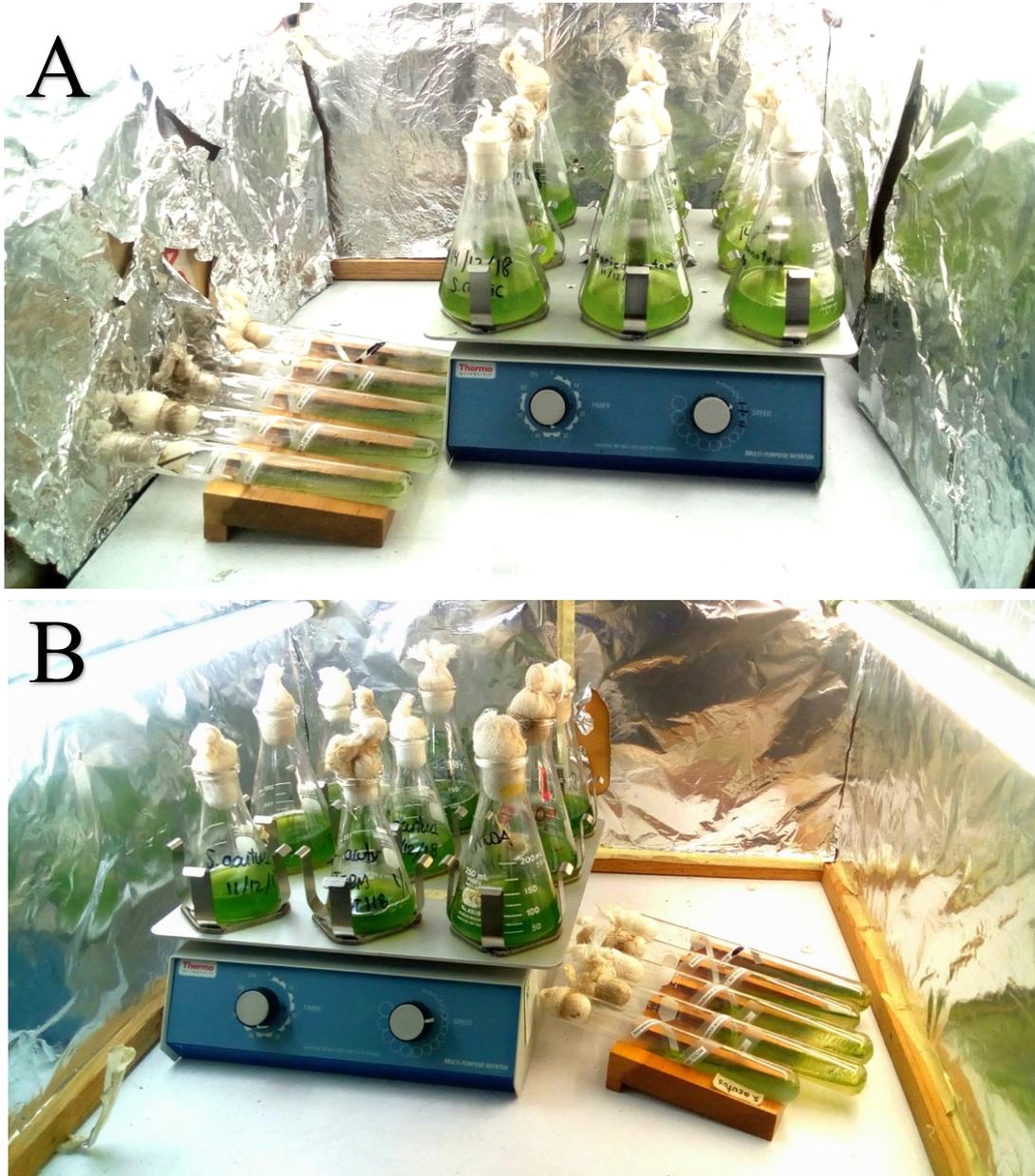


Figura 3.4 Medios de cultivo sólidos (Tubos cultivados en agar) y líquidos (medio Bristol en matraz) sometidos a ciclos de iluminación de 16 horas y agitación semiconstante: **A:** *Selenastrum capricornutum* **B:** *Scenedesmus acutus*

3.2.2. Inmovilización

La inmovilización de las microalgas *Selenastrum capricornutum* y *Scenedesmus acutus* se realizó en perlas de alginato de calcio, dichas perlas de alginato fueron utilizadas para de esta manera introducir las microalgas en los reactores, las condiciones de inmovilización se efectuaron de acuerdo con el procedimiento

optimizado por el grupo de trabajo (Bernal Toris, 2015) y descritas de manera general en la Figura 2.8.

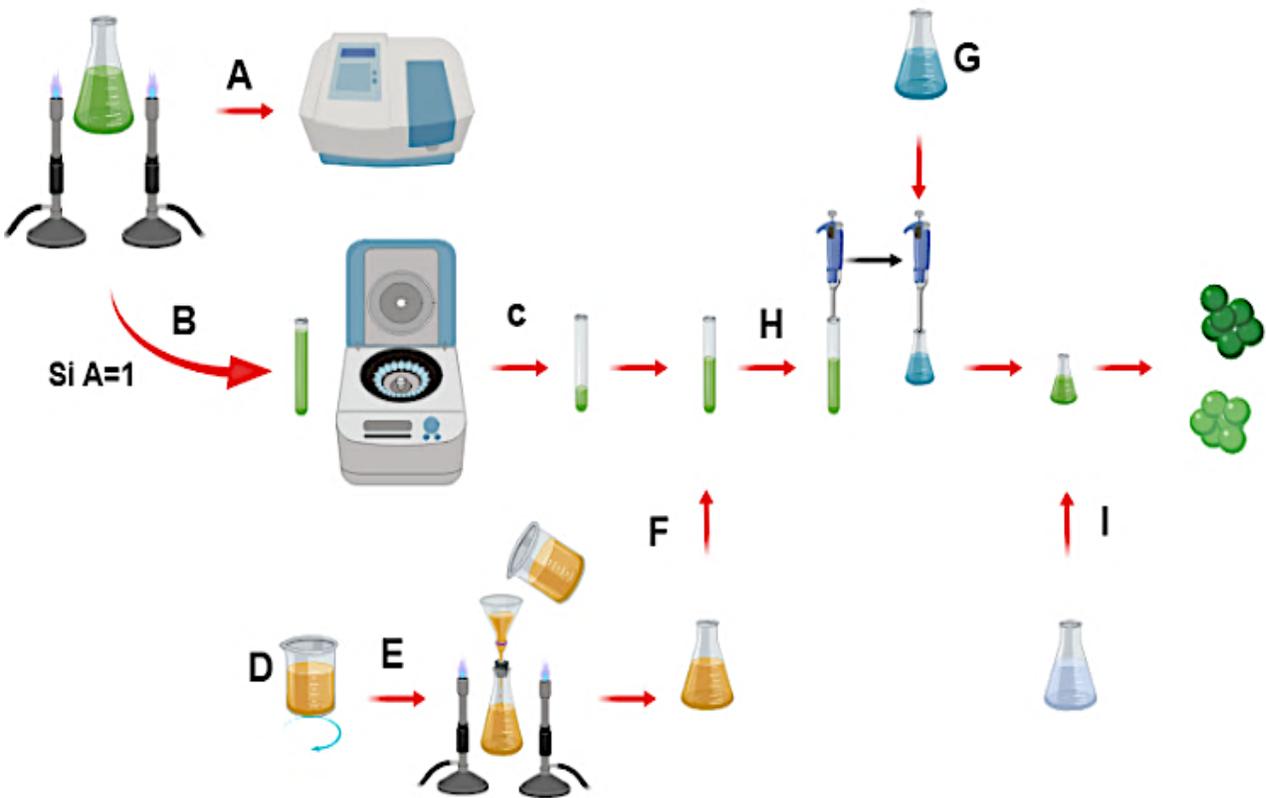


Figura 3.5 Metodología para la inmovilización de microalgas en alginato de calcio **A)** medición de la absorbancia del medio de cultivo. **B)** toma de medio con absorbancia 1 **C)** desecho de trece mL de sobrenadante y resuspensión del medio en 2 mL de medio restantes **D)** preparación de alginato al 3%. **E)** filtración del alginato **F)** adición de alginato a biomasa resuspendida. **G)** Preparación de cloruro de calcio al 1% para inmovilización **H)** goteo de la solución de microalgas-alginato en la solución de cloruro de calcio. **I)** Enjuague de perlas formadas listas para su utilización

Preparación de disoluciones para inmovilización

Se preparó una disolución de cloruro de calcio al 1 % en un matraz aforado de 100 mL para la inmovilización de microalgas. Posteriormente, se procedió a esterilizarla en autoclave, por treinta minutos a 121°C en alícuotas de 20 mL dentro de matraces de 50 mL.

Se preparó una disolución acuosa de alginato de sodio (3% p/v) en un vaso de precipitado de 200 mL, añadiendo 3 g de alginato de sodio en 97 mL de agua

desionizada y colocando un agitador magnético. El alginato fue adicionado lentamente con agitación ligera y a temperatura ambiente. Una vez adicionado se cubrió la solución con parafilm y se mantuvo en agitación por dos horas hasta conseguir la disolución del alginato en el agua.

Previo a la utilización del alginato de sodio, se procedió a esterilizar la disolución por filtración con ayuda del sistema aséptico "Sterifil", al cual le fueron adaptados filtros de nitrocelulosa de 0.2 μm . Dicha filtración fue efectuada en una mesa previamente desinfectada con alcohol y entre dos mecheros Bunsen encendidos a una distancia aproximada de 20 cm entre ellos. Una vez filtrada y recolectada la solución acuosa de alginato, fue recuperada en un matraz Erlenmeyer de 150 mL previamente esterilizado en autoclave, continuando esta acción en medio de los mecheros.

*Nota se recomienda no utilizar la solución de alginato de sodio al 3% p/v para inmovilización, si tiene más de dos semanas de haber sido preparada. Así mismo, se recomienda proteger el recipiente de la solución con papel estraza o papel aluminio para que éste quede aislado de la luz.

Toma de muestra de los cultivos líquidos

La inmovilización de cada especie de microalgas fue realizada por separado y la toma de las muestras fue efectuada bajo condiciones asépticas en una mesa previamente desinfectada con alcohol y entre dos mecheros Bunsen encendidos a una distancia aproximada de 20 cm entre ellos. El material, previamente esterilizado, utilizado para la colecta de esta fue una pipeta de 15 mL previamente estéril, un bulbo para succión, así como tubos de 15 mL para centrifuga de vidrio con tapón de algodón envuelto en gasa (para centrifugar el cultivo de microalgas).

Se procedió a tomar 15 mL de un cultivo líquido, con las microalgas que ya hubieron alcanzado la absorbancia de 1; se colocaron en un tubo de ensayo mediante una pipeta volumétrica previamente esterilizada y a continuación se cubrió la boca del tubo con un tapón de algodón y se centrifugó a aproximadamente 3900 rpm por 15

minutos. Una vez obtenido el botón de microalgas separado totalmente del sobrenadante, se retiró el medio acuoso con una pipeta de 10 mL previamente esterilizada y un bulbo de succión, hasta dejar un volumen de 2 mL. Posteriormente se agitó el tubo de ensayo para que el botón de microalgas se resuspendiera en el medio acuoso. De esta manera se obtuvo el medio con microalgas para la inmovilización.

Procedimiento de inmovilización

El proceso de inmovilización se realizó dentro de la campana de bioseguridad, donde el material para la colecta del medio acuoso e inmovilización, previamente esterilizado, fue expuesto a 20 minutos de luz UV, posteriormente la luz UV fue apagada y se encendió el flujo laminar dejando estabilizar las condiciones internas por 10 minutos.

Una vez colectada la biomasa de las microalgas a inmovilizar, en los 2 mL de cultivo líquido centrifugado, le fueron adicionados 4 mL de la solución acuosa de alginato de sodio previamente esterilizado. Posteriormente se agitó hasta completar su homogenización.

Con ayuda de una pipeta de 5 mL y un bulbo de succión se goteó a una velocidad moderada la mezcla de alginato-medio con microalgas en el matraz con cloruro de calcio. Es importante agitar el matraz después de ser añadidas cierta cantidad de gotas para evitar que éstas se adhieran a las paredes y entre ellas.

Una vez goteada toda la mezcla se dejó reposar por tres minutos para permitir el endurecimiento de las perlas de alginato de calcio. Las perlas fueron decantadas con ayuda de una gasa y enjuagadas con dos baños de 20 mL de agua de la llave.

Mediante este método se forman entre 87-90 perlas de alginato de calcio con un diámetro de 3.5-4 mm listas para su uso en los ensayos.

3.3 DISEÑO Y EVALUACIÓN DE BIORREACTORES

En el establecimiento de los parámetros operacionales del biorreactor para la remoción de BaA y BaP mediante algas inmovilizadas de las especies *Selenastrum capricornutum* y *Scenedesmus acutus* se implementaron ensayos en reactores de 50 y 170 mL, con el objetivo de determinar las condiciones óptimas de operación y de esta forma escalarlas a un reactor de 4,000 mL.

Cada ensayo en los diferentes reactores fue realizado por triplicado así como sus respectivos Blancos, que consistieron en ensayos de remoción con perlas de alginato de calcio sin microalgas, para observar el efecto de la remoción abiótica de los hidrocarburos debidos a la adsorción a los materiales de construcción, el alginato y/o fotólisis.

Una vez cumplido el tiempo de exposición, el medio acuoso fue recuperado y tratado con la metodología descrita en el apartado 2.3.1.3 para el aislamiento de los HAPs remanentes por EFS y análisis de los extractos por CLAR.

3.3.1. Diseño de reactores

Reactor de matraz en agitación orbital

El reactor de agitación orbital consistió de un matraz Erlenmeyer de 50 mL en agitación orbital. Dicho reactor es utilizado básicamente en la línea de investigación del equipo de trabajo (León Santiago 2016; Loera Flores 2017), este reactor se utilizó como un primer acercamiento para observar el efecto de la remoción por microalgas inmovilizadas a diferentes tiempos (3 y 6 horas) así como el efecto de adsorción por el alginato. En él se manejó una muestra de agua de la llave de 15 mL fortificada con 4 µg de cada hidrocarburo, en presencia de luz amarilla y agitación constante mediante un agitador orbital con velocidad fija de 50 rpm.

En los reactores se evaluó porcentaje de remoción de los HAPs por las perlas con microalgas y porcentaje de remoción con los Blancos, los cuales mantuvieron las mismas condiciones, con la diferencia de incluir perlas de alginato de calcio sin

microalgas (sustituyendo el volumen de la biomasa por agua). En la Figura 2.9 se ilustra el manejo de este reactor.



Figura 3.6 Ensayos en reactor con agitación orbital

Reactor tipo tanque con agitación mediante recirculación

El diseño de los reactores diferentes del matraz, se efectuó considerando la forma de un tanque. Dicha geometría fue importante de definir para evitar aglutinamiento de demasiadas capas de perlas de alginato en la base del reactor, planeando por ello las siguientes condiciones o factores en su implementación:

- Las características de la muestra (volumen y concentración de HAPs) y las perlas de alginato

Para efectuar los ensayos de exposición se utilizaron células inmovilizadas por separado de las especies *Selenastrum capricornutum* y *Scenedesmus acutus*

mediante la técnica de inmovilización descrita anteriormente, en el apartado **2.3.1.3**. La cantidad de microalgas inmovilizadas fue de $6.75E+07$, quedando las perlas de alginato con $7.5E+05$ microalgas por perla para *Selenastrum capricornutum* y en total se usaron $6E+07$ células para *Scenedesmus acutus*, o sea $6.67E+05$ microalgas por perla (León Santiago 2016). Se manejaron aproximadamente 87 a 90 perlas, en cada ensayo por cada 15 mL de muestra acuosa.

La concentración de Benzo[a]antraceno y Benzo[a]pireno a la que se fortificó el medio fue $0.266 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ambos hidrocarburos, lo cual se hizo con un pequeño volumen (μL) de una disolución estándar de ambos hidrocarburos disueltos en acetonitrilo. En los ensayos de remoción se utilizó una proporción de volumen constante de perlas de alginato de calcio, ya sea que contuvieran o no a las microalgas, según el caso, dicha proporción es la manejada por el grupo de trabajo, la cual es 15 mL de muestra de agua con 90 perlas de alginato (obtenidas de los 6 mL de suspensión alginato/biomasa descrita en la apartado **2.3.1.3**).

➤ El volumen de muestra

La línea de investigación del presente proyecto contempla el trabajo de muestras de 15, 30, 45, 60 y 2,400 mL de agua de la llave en los diferentes reactores y su correspondiente relación de número de perlas de alginato de calcio, con una o las dos especies de microalgas inmovilizadas. En el diseño de cada reactor se consideró que su tamaño tuviera un espacio adicional al volumen que ocupa la muestra y las perlas, para una fácil manipulación, evitando el desbordamiento de la muestra acuosa.

➤ Material de construcción

Los reactores utilizados en este trabajo fueron elaborados en el taller de soplado de vidrio de la Facultad de Química de la UNAM. Fueron construidos de vidrio para permitir el paso de la luz hacia los mismos y así no interferir con el crecimiento de las algas, además de la baja adsorción de los hidrocarburos en este material. Así mismo, se utilizaron tuberías de "Viton" (plástico fluorado el cual presenta una alta

resistencia a los hidrocarburos y una baja adsorción) adaptadas a bombas peristálticas con el objetivo de producir la recirculación en el sistema. La selección de este material se hizo por la baja adsorción de los hidrocarburos.

- Facilidad de operación (adición y recuperación de las muestras)

En cada uno de los reactores utilizados se consideró la construcción de un pico de vertimiento en la parte superior para la fácil recuperación de las muestras, así como una salida ya sea inferior o lateral, de acuerdo con el tipo de reactor, para facilitar la recuperación de las muestras, el montaje y la recirculación.

Se diseñaron dos tipos diferentes de reactores, reactor tipo tanque de salida inferior (RSI) y el reactor tipo tanque de salida lateral (RSL), a los cuales se conectó una manguera de Viton acoplada a una bomba peristáltica, con la cual se programaron diferentes flujos de recirculación que permitieron la agitación de la muestra de agua en contacto con las microalgas inmovilizadas. Se estudió también el efecto de otras variables en la búsqueda de las condiciones óptimas para el “escalamiento del reactor”.

El montaje de los componentes de los reactores con agitación mediante recirculación consistió de una o dos bombas peristálticas que recirculaban la muestra, con entrada en la parte superior del tanque y salida en la parte inferior-lateral. Los reactores pequeños se sujetaron con pinzas en un soporte universal y el reactor escalado a 4,000 mL, en una base de madera con una ranura en la parte media, por donde se posicionó la salida inferior.

A continuación se presenta un listado de los reactores tipo tanques utilizados:

- Reactor de lote con agitación por recirculación de salida inferior (RSI**50**), capacidad de 50 mL
- Reactor de lote con agitación por recirculación de salida lateral (RSL**50**), capacidad de 50 mL
- Reactor de lote con agitación por recirculación de salida inferior (RSI**170**), capacidad de 170 mL

- Reactor de lote con agitación por recirculación de salida lateral (RSL**170**), capacidad de 170 mL
- Reactor de lote tipo tanque de capacidad de 4,000 mL, con salida inferior (RSI**4000**)

A cada uno de los reactores se les adaptó en el fondo una malla de acero inoxidable, la cual posee un espacio de 1 mm² entre los cuadros que la conforman, esto con el objetivo de evitar la obstrucción de las vías de recirculación causadas por las perlas incluidas que contenían a las especies *Selenastrum capricornutum* o *Scenedesmus acutus*. Lo anterior, también para el caso de los ensayos de los Blancos.

3.3.2. Establecimiento de las condiciones de operación de los biorreactores

La búsqueda de los parámetros operacionales óptimos de los reactores se hizo mediante la evaluación de las siguientes variables siguiendo el efecto de estas en la remoción del Benzo[a]pireno y Benzo[a]antraceno de una muestra acuosa.

3.3.2.1 Ensayos con agitación orbital

La influencia del tipo de agitación se evaluó mediante la comparación de los porcentajes de remoción en los reactores con agitación orbital (50 rpm), se utilizó un volumen de 15 mL en tiempos de exposición de 3 y 6 horas (con el objetivo de observar el efecto de la remoción de las microalgas inmovilizadas (90 perlas de alginato que contiene a la especie *Selenastrum capricornutum* inmovilizada, 7.5E+05 microalgas/perla) y sus respectivos Blancos).

3.3.2.2 Remoción abiótica

Para evaluar la remoción abiótica debida a la fotólisis y a la adsorción a los materiales de construcción y manguera Viton. Se realizaron ensayos de exposición a los HAPs en los reactores tipo tanque con agitación mediante recirculación de salida inferior, sin perlas de alginato y sin microalgas (control abiótico).

De esta manera, en los reactores se evaluó la remoción de BaA y BaP de una muestra de agua de la llave de 15 mL con una concentración de los hidrocarburos

de 0.266 $\mu\text{g mL}^{-1}$ cada uno; se manejó un flujo de 1 mL/min, diferentes tiempos de operación y dos tipos de luz, de acuerdo a la Tabla 2.2.

Tabla 3.2 Condiciones de los ensayos de remoción abiótica

CONDICIONES	ENSAYO CON LUZ NATURAL	ENSAYO CON LUZ ARTIFICIAL
Flujo (mL/min)	1	1
Tiempo (horas)	3, 6 y 24	3, 6 y 24
Volumen de agua (mL)	15	15

3.3.2.3 Estudio de remoción por *Selenastrum capricornutum* inmovilizada

Se efectuaron ensayos con perlas de alginato que contienen a la especie *Selenastrum capricornutum* inmovilizada en perlas de alginato en el reactor tipo tanque con capacidad de 50 mL de salida inferior RSI50, con el objetivo de observar la remoción de BaA y BaP con una concentración inicial de 0.266 $\mu\text{g mL}^{-1}$ cada uno, en una muestra de 15 mL de agua y tiempos de operación de 3, 6 y 15 horas.

La Figura 2.10 presenta el montaje del RSI50 y la Tabla 2.3 las condiciones de trabajo del ensayo donde se evaluó el tiempo de exposición.

Tabla 3.3 Condiciones de los ensayos para seleccionar el tiempo de exposición utilizando *S. cap* en RSI50

Condiciones	Control Abiótico	Bioensayo
Flujo (mL/min)	1	1
Perlas de alginato	0	90
<i>S. capricornutum</i>	0	90
células/perla	0	7.5E+05
Tiempo (horas)	3, 6 y 15	3, 6 y 15
Volumen de agua (mL)	15	15



Figura 3.7 Reactor tipo tanque con salida inferior RSI50, Reactor de vidrio con salida inferior conectado a una bomba peristaltica mediante una manguera de Viton blanco

3.3.2.4 Estudio de la remoción con dos especies de microalgas inmovilizadas

Se propusieron tres ensayos diferentes con el objetivo de observar la remoción de BaA y BaP, con una concentración inicial de $0.266 \mu\text{g mL}^{-1}$ cada uno en 15 mL de una muestra de agua de la llave en un tiempo de exposición de 6 horas, en los reactores tipo tanque con capacidad de 50 mL de salida inferior y el de salida lateral (RSI50 y RSL50). Los ensayos se efectuaron con un flujo de 1 mL/min con perlas de alginato de la siguiente composición microalgal:

- El primero se efectúa con 90 perlas de alginato que contiene a la especie *Selenastrum capricornutum* inmovilizada ($7.5\text{E}+05$ microalgas/perla)
- El segundo se efectúa con 90 perlas de alginato que contiene a la especie *Scenedesmus acutus* inmovilizada ($6.67\text{E}+05$ microalgas/perla)

- El tercero con una mezcla de 45 perlas de la especie *Selenastrum capricornutum* (7.5E+05) y 45 perlas de la especie *Scenedesmus acutus* inmovilizadas (6.67E+05 microalgas/perla)

3.3.2.5 Estudio de la posición de la salida del reactor

Este análisis se pensó considerando la influencia de dos factores importantes: difusión de los HAPs a las perlas y practicidad con respecto al soporte del peso del reactor. De esta manera, se consideró que el primer reactor (RSI) es el que proporcionaría el mejor mezclado del medio por recirculación, con lo cual los hidrocarburos pueden llegar mejor a las microalgas en el interior de las perlas y podrían ser removidos más rápido. El segundo reactor (RSL) respondería mejor a una cuestión de diseño, ya que al utilizar una salida lateral en un tamaño mayor se presenta el mayor soporte. Las fotografías de los dos tipos de reactores propuestos se presentan en la Figura 2.11.

Con el objetivo de comparar los resultados de remoción entre el reactor RSI50 y RSL50, ambos con una capacidad de 50 mL, se propusieron tres ensayos en los dos con diferente proporción de especies. La Tabla 2.4 resume las condiciones de estos ensayos.

Tabla 3.4 Condiciones de operación de los ensayos en los reactores tipo tanque RSI50 y RSL50, evaluación del tipo de posición

Condiciones	<i>S. cap</i>	<i>S. ac</i>	<i>S. cap</i> / <i>S. ac</i>
Flujo (mL/min)	1	1	1
Perlas de alginato	90	90	45/45=90
<i>S. capricornutum</i>	90	0	45
Células/ perla	7.5E+05	0	7.5E+05
<i>S. acutus</i>	0	90	45
Células/ perla	0	6.67E+05	6.67E+05
Tiempo (horas)	6	6	6
Volumen de agua (mL)	15	15	15

3.3.2.6 Estudio del flujo en las diferentes posiciones de salida del reactor

Se analizó la influencia de la remoción de los hidrocarburos en función del flujo de recirculación de la muestra. Para ello se propusieron tres diferentes ensayos en RSI50 y RSL50 evaluando en cada uno los flujos de recirculación 1, 2 y 4 mL/min, cada ensayo contiene una muestra de agua de la llave de 15 mL y una concentración de 0.266 mg/L de cada hidrocarburo en un tiempo de exposición de 6 horas. Utilizando perlas de alginato que contienen a la especie *Selenastrum capricornutum*. La Tabla 2.5 presenta las condiciones de operación de RSI50 y RSL50 para esta prueba.

Tabla 3.5 Condiciones de operación de los ensayos en los reactores tipo tanque RSI50 y RSL50, evaluación del flujo de recirculación

Condiciones	RSI50	RSL50
Flujo (mL/min)	1, 2, y 4	
Número de perlas de alginato	90	
<i>S. capricornutum</i>	90	
Células/ perla	7.5E+05	
Tiempo (horas)	6	
Volumen de muestra de agua (mL)	15	

3.3.2.7 Estudio del incremento de volumen (similaridad de condiciones)

Una vez estudiados los parámetros antes descritos de material de construcción, tiempo de exposición, tipo de agitación, especie de microalgas, posición de la salida de recirculación y velocidad de flujo de recirculación, se procedió a escalar los parámetros óptimos obtenidos a volúmenes mayores de muestra de agua, manteniendo constantes las relaciones de volumen de agua, volumen de perlas de alginato de calcio, concentración correspondiente de microalgas por perla de alginato, y la concentración de los hidrocarburos.

Dado esto, se procedió a realizar un primer ensayo donde se incrementó el volumen de muestra al doble, extrapolando todas las condiciones de igual manera. Para ello

se planteó el ensayo en los reactores RSI170 y RSL170, donde fue tratada una muestra de 30 mL de agua (2V) de la llave con un flujo de 1 y 2 mL/min. Las condiciones de operación de estos ensayos son detalladas en la Tabla 2.6.

Tabla 3.6 Condiciones de operación de los ensayos en los reactores tipo tanque RSI170 y RSL170, escalamiento de parámetros operacionales

Condiciones	RSI170	RSL170
Flujo (mL/min)	1 y 2	
Número de perlas de alginato	180	
<i>S. capricornutum</i>	180	
células/ perla	7.5E+05	
Tiempo (horas)	6	
Volumen de muestra de agua (mL)	30	

3.3.2.8 Estudio del aumento de volumen y flujo(escalamiento a 30, 45 y 60 mL)

A continuación se compilan las condiciones de los ensayos, presentados en la Tabla 2.7 y la Figura 2.11. Se denominó 1V al volumen de 15 mL de muestra de agua, éste fue el volumen de partida para nuestros anteriores ensayos, siguiendo esta notación se denominó 2V a los ensayos con 30 mL de agua de la llave por ser el doble de volumen, 3V simboliza el triple de volumen (45mL) y 4V cuatro veces el volumen de muestra de agua (60mL). Para la implementación de un ensayo de volumen mayor se analizó y comparó el porcentaje removido de los hidrocarburos en un ensayo que contiene la mezcla de *S. ac* y *S. cap* inmovilizadas por separado (*4V mezcla).

Tabla 3.7 Condiciones del estudio del efecto del volumen de muestra y flujo de recirculación

Condiciones	1V	2V	3V	4V	*4V mezcla
Flujo (mL/min)	1	2	3	4	4
Número de perlas de alginato	90	180	270	360	360
<i>S. capricornutum</i>	90	180	270	360	180
células/ perla		7.5E+05			7.5E+05
<i>S. acutus</i>	-	-	-	-	180
células/ perla	-	-	-	-	6.67E+05
Tiempo (horas)	6	6	6	6	6
Volumen de agua (mL)	15	30	45	60	60

Ensayo *4V utilizando una mezcla 50:50 de perlas de alginato con las especies *Selenastrum capricornutum* y *Scenedesmus acutus*

Ensayo 1V efectuado en RSI**50**

Ensayo 2V-4V efectuado en RSI**170**

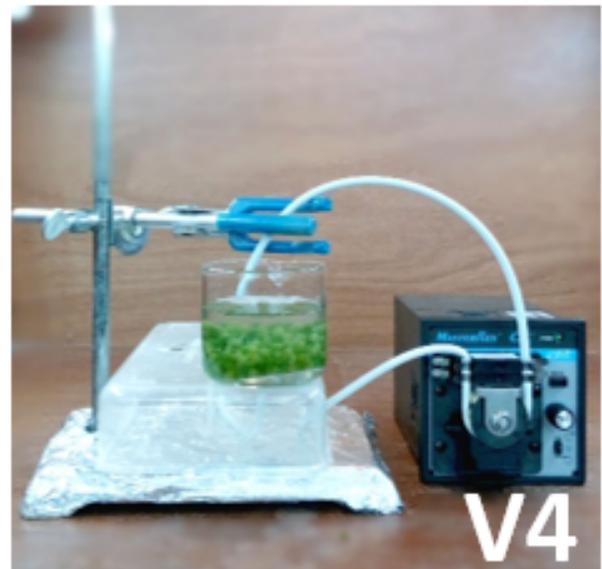
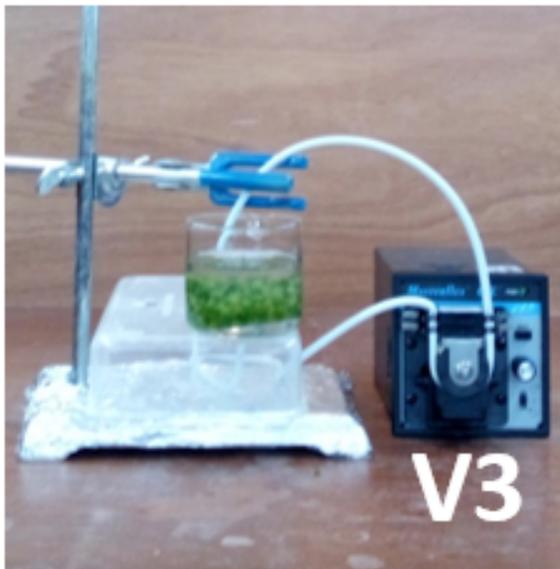
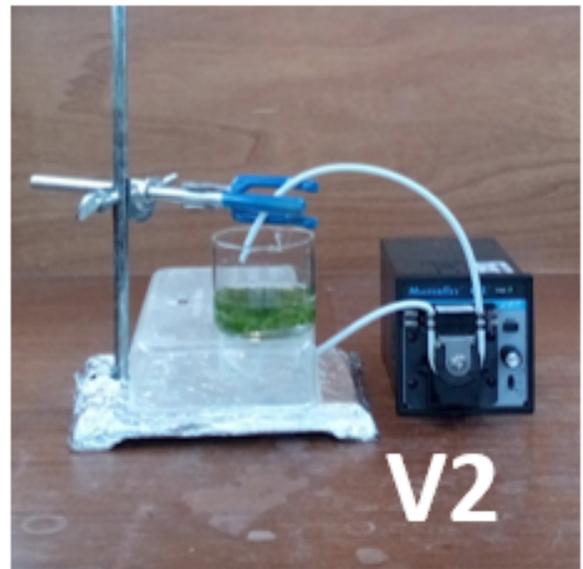
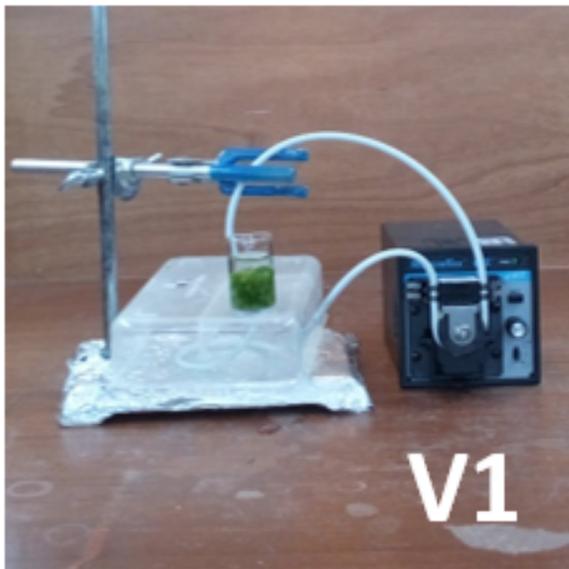


Figura 3.8 Puesta en marcha de reactores (RSI50 1V y RSI170 2V, 3V y 4V).
Construidos de vidrio y conectados a una manguera de Viton blanco

3.3.2.9 Implementación de un ensayo en un volumen de 2,880 mL

El escalamiento del reactor se hizo a partir del principio de similitud en los diferentes ensayos, mediante los cuales se mantuvieron en estudio las siguientes cualidades: tamaño, forma y composición. Por lo que las características tanto físicas como químicas (de concentración) fueron extrapoladas de igual manera a medida

que se incrementaba el volumen de operación y se obtenían los resultados óptimos en los ensayos anteriores.

Las condiciones de operación para este ensayo (tiempo, volumen, masa de hidrocarburos, número de perlas con microalgas inmovilizadas) fueron extrapoladas 40 veces a partir del ensayo 4V, por lo que siguiendo la nomenclatura el ensayo 2,880 mL corresponde a 1V60. Las condiciones de operación del reactor 1V60 son comparadas con las del reactor con 4V en la Tabla 2.8.

Tabla 3.8 Comparación de las condiciones de operación de 4V y 1V60

Variable	4V	1V60
Número de perlas totales	360	7200
Células totales <i>S. capricornutum</i>	2.70E+08	1.08E+10
Células totales <i>S. acutus</i>	2.38E+08	9.60E+09
Volumen de muestra de agua (mL)	60	2400
Volumen total (perlas+agua) (mL)	84	2,880
Volumen capacidad máxima del reactor(mL)	170	4,000
Flujo (mL/min)	1	40
Tiempo (horas)	6	240
Masa de hidrocarburo (µg)	16	640

El reactor con 1V60 fue elaborado mediante un vaso de precipitado de 4 000 mL de vidrio al cual se le hicieron modificaciones en la base con el objetivo de producir la recirculación del medio acuoso mediante dos bombas peristálticas Master Flex que le fueron adaptadas mediante una manguera y dos conectores tipo “T” elaborados en el taller de soplado de vidrio de la Facultad de Química de la UNAM. Así mismo, se adaptó una malla de acero inoxidable que sirvió para retener las perlas de alginato y evitar la obstrucción de la salida de recirculación. El montaje del reactor RSI400 es presentado en la Figura 2.12.



Figura 3.9 Montaje del reactor RSI4000. Vaso de precipitado con salida interior sobre base de madera conectado a dos bombas peristálticas MasterFlex mediante una tubería Viton blanca y una conexión “T” de vidrio, Ensayo expuesto a luz amarilla mediante un foco de 10 watts. En la misma fotografía se aprecian las microalgas inmobilizadas *Scenedesmus acutus* (lado derecho) y *Selenastrum capricornutum* (lado izquierdo)

Capítulo 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 METODOLOGÍA ANALÍTICA

4.1.1. Separación cromatográfica y detección

En la Tabla 3.1 se presentan los parámetros del sistema cromatográfico y las longitudes de onda utilizadas para la detección con las condiciones descritas en el apartado 2.3.1, obtenidos con la columna analítica Hypersil de 150 x 4.6 mm, empacada con fase reversa C18 tamaño de partícula 5 μm .

Tabla 4.1 Parámetros cromatográficos

Parámetro	Analito	
	BaA	BaP
Tiempo de retención (min)	3.11	4.029
Ancho de la base (min)	0.1716	0.2073
k' (factor de capacidad)	0.7079	1.2125
α (factor de selectividad)	1.713	
$N_{\text{calculada}}$ (eficiencia)	5254.23	6043.74
R_s (resolución)	4.8506	

$t_m=1.821$ min con nitrato de sodio 1 M

Los espectros de absorción en la región ultravioleta para los HAPs estudiados se muestran en la Figura 3.1, donde podemos apreciar las longitudes de onda máximas, tanto para el BaA como para el BaP. Las longitudes de onda que se eligieron para cuantificar la concentración de los analitos fue $\lambda=273$ nm para Benzo[a]antraceno y $\lambda=285$ nm para Benzo[a]pireno.

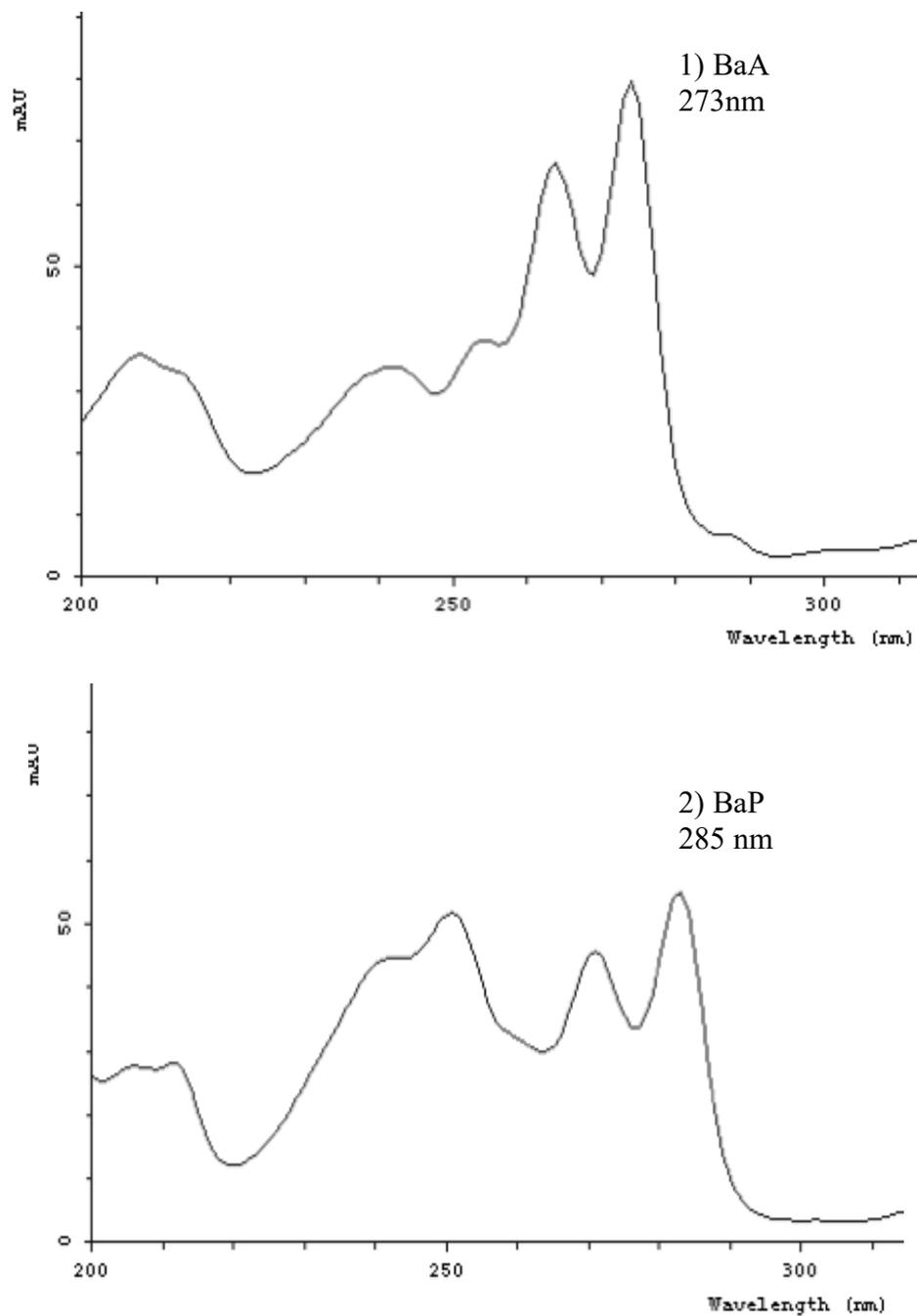


Figura 4.1 Espectros UV de los HAPs estudiados 1) Benzo[a]antraceno, 2) Benzo[a]pireno

De igual manera, en la Figura 3.2, se incluye un cromatograma, que muestra los picos obtenidos durante el análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a UV (CLAR-UV), los cuales fueron detectados en su longitud de onda máxima correspondiente.

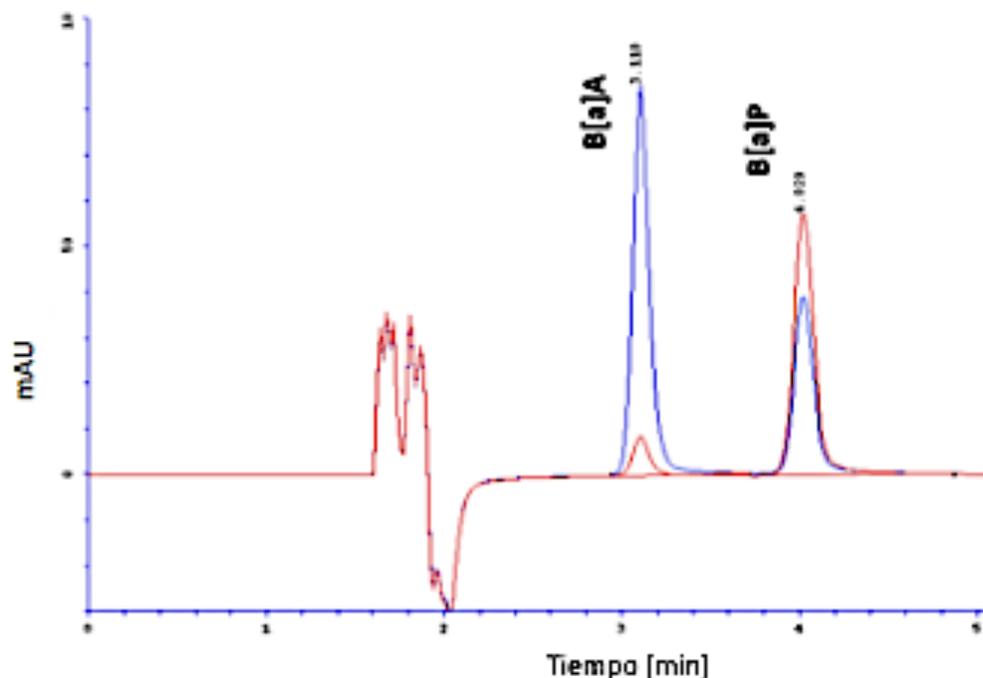


Figura 4.2 Cromatograma de ambos hidrocarburos utilizando metanol como fase móvil $\lambda=273$ nm y $\lambda=285$ nm. Obtenidos con la columna Hypersil ODS de 150 x 4.6 mm. Disolución de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de BaA y BaP en ACN. Tamaño de partícula de la fase estacionaria $5 \mu\text{m}$ y volumen de inyección $20 \mu\text{L}$; flujo 1 mL/min

Una de las diferencias observables en los cromatogramas es la respuesta diferencial que se da para ambos HAPs en las diferentes longitudes de detección utilizadas. La separación es buena, ya que el tiempo de retención de los hidrocarburos es diferente (3.110 min para el BaA y 4.029 para el BaP); el BaA siendo el menos hidrófobo es menos retenido que el BaP, dado que el segundo presenta en su estructura un anillo aromático extra.

Puede apreciarse que el factor de resolución es de 4.8506, por lo que se obtiene una buena separación de los picos de ambos analitos.

4.1.2. Validación del sistema cromatográfico

La validación de los sistemas cromatográficos es presentada por separado para cada hidrocarburo de trabajo. A continuación se presentan los resultados del BaA.

4.1.2.1 Benzo[a]antraceno

4.1.2.1.1 Precisión

Repetibilidad intra-día

En la Tabla 3.2 se presentan los datos correspondientes al estudio de la repetibilidad en un mismo día, utilizando disoluciones con concentraciones diferentes del BaA. Las variaciones en las mediciones de áreas son presentadas mediante el coeficiente de variación (CV).

Tabla 4.2 Variación en las áreas de los picos cromatográficos en un mismo día para diferentes concentraciones de BaA

Concentración ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Área (mAU)	\bar{x} (mAU)	S (mAU)	CV (%)
0.25	2.474	2.516	0.038	1.516
	2.525			
	2.549			
1	7.714	7.757	0.081	1.047
	7.646			
	7.759			
	7.812			
	7.853			
2	15.286	15.345	0.099	0.645
	15.459			
	15.289			
6	45.792	45.904	0.105	0.229
	45.920			
	46.000			
8	62.104	61.563	0.470	0.763
	61.324			
	61.261			
C.V promedio				0.840

Al observar los coeficientes de variación de las diferentes concentraciones de BaA inyectadas en el cromatógrafo en un mismo día, puede observarse que la variación en el equipo es menor a 1.5%, valor menor al 15%, límite establecido por la CCAyAC para concentraciones comprendidas entre 0.1 y 100 mg/L de residuos y contaminantes en agua. Lo cual evidencia que no se tiene una variación significativa al hacer repeticiones de una inyección de muestra en un mismo día.

Repetibilidad inter-día

Con los datos obtenidos en el análisis de 5 inyecciones de una concentración de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en 5 días diferentes se verificó, mediante la comparación de los valores del CV, que no existe una evidencia significativa que demuestre que hay diferencia al inyectar una muestra en días diferentes, por lo tanto, nuestro sistema es reproducible. Los datos de estos 5 días son presentados en la Tabla 3.3.

Tabla 4.3 Variación en las áreas de los picos cromatográficos de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de BaA en 5 días diferentes

Día	Área (mAU)	\bar{x} (mAU)	S (mAU)	CV (%)
1	7.714	7.757	0.081	1.047
	7.646			
	7.759			
	7.812			
	7.853			
2	7.955	7.925	0.043	0.543
	7.878			
	7.958			
	7.878			
	7.955			
3	7.676	7.668	0.037	0.483
	7.634			
	7.723			
	7.634			
	7.676			
4	7.725	7.761	0.081	1.039
	7.841			
	7.665			
	7.849			
	7.725			
5	7.841	7.778	0.111	1.427
	7.658			
	7.658			
	7.849			
	7.884			
		7.778	0.073	0.944

4.1.2.1.2 Linealidad del sistema

Curva de calibración

La recta ajustada por el método de mínimos cuadrados presenta un coeficiente de correlación $r^2 > 0.99$ lo que comprueba que el sistema es lineal. En la Figura 3.3 se presentan la curva de calibración con sus ecuaciones para las áreas del BaA en un intervalo de 0.25 a 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

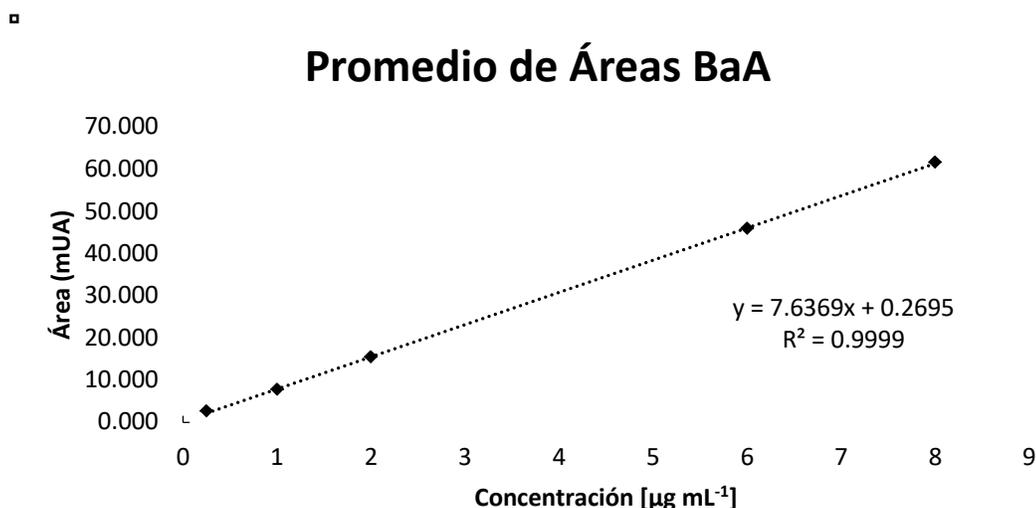


Figura 4.3 Curva de calibración de respuesta de equipo (áreas) para BaA

Límites

El límite de detección del BaA en este sistema cromatográfico es de $0.028 \mu\text{g mL}^{-1}$, lo cual representa la concentración más baja que puede ser detectada por el sistema. Mientras que el de cuantificación es $0.086 \mu\text{g mL}^{-1}$, valor que representa la concentración más baja que puede ser cuantificada con precisión por el sistema.

4.1.2.2 Benzo[a]pireno

4.1.2.2.1 Precisión

Repetibilidad intra-día

En la Tabla 3.4 se presentan los datos correspondientes al estudio de la repetibilidad en un mismo día, utilizando disoluciones con concentraciones diferentes del BaP, las variaciones en las mediciones de áreas son presentadas mediante el coeficiente de variación (CV).

Tabla 4.4 Variación en áreas de los picos cromatográficos en un mismo día para diferentes concentraciones de BaP

Concentración ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Área (mAU)	Área		
		\bar{x} (mAU)	S (mAU)	CV (%)
0.25	1.177	1.174	0.013	1.118
	1.186			
	1.160			
1	3.952	3.902	0.136	3.486
	3.955			
	3.660			
	3.982			
	3.964			
2	7.488	7.556	0.060	0.793
	7.581			
	7.600			
6	23.438	23.090	0.379	1.642
	23.145			
	22.686			
8	32.106	31.877	0.205	0.642
	31.815			
	31.711			
C.V promedio				1.536

Al observar los coeficientes de variación de las diferentes concentraciones de BaP inyectadas en el cromatógrafo en un mismo día, puede observarse que la variación en el equipo es menor a 3.4%%, valor menor al 15%, limite establecido por la CCAyAC para concentraciones comprendidas entre 0.1 y 100 mg/L de residuos y contaminantes en agua. Lo cual evidencia que no se tiene una variación significativa al hacer repeticiones de una inyección de muestra en un mismo día.

Repetibilidad inter-día

Con los datos obtenidos en el análisis de 5 inyecciones de una concentración de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en 5 días diferentes se verificó, mediante la comparación de los valores del CV, que no existe una evidencia significativa que demuestre que hay diferencia al inyectar una muestra en días diferentes, por lo tanto, nuestro sistema es reproducible. Los datos de estos 5 días son presentados en la Tabla 3.5.

Tabla 4.5 Variación en las áreas de los picos cromatograficos de 1 µg mL⁻¹ de BaP en 5 días diferentes

Día	Área	Área		
		\bar{x} (mAU)	S (mAU)	CV (%)
1	3.9519	3.902	0.136	3.486
	3.9546			
	3.6600			
	3.9820			
	3.9637			
2	3.9706	3.854	0.155	4.009
	3.6955			
	3.9550			
	3.6955			
	3.9550			
3	3.3559	3.443	0.136	3.961
	3.5207			
	3.6265			
	3.3559			
	3.3559			
4	3.7335	3.546	0.206	5.809
	3.3230			
	3.5580			
	3.5580			
	3.5580			
5	3.7573	3.736	0.037	0.995
	3.7573			
	3.6930			
	3.7272			
	3.7441			
		3.696	0.134	3.652

El coeficiente de variación es menor a 5.8 % valor menor al 15%, limite establecido por la CCAyAC para concentraciones comprendidas entre 0.1 y 100 mg/L de residuos y contaminantes en agua por lo tanto, nuestro sistema es repetible.

4.2.2.2 Linealidad del sistema

Curva de calibración

La recta ajustada por el método de mínimos cuadrados presenta un coeficiente de correlación $r^2 > 0.99$ lo que comprueba que el sistema es lineal. En la Figura 3.4 se presentan las curvas de calibración con sus ecuaciones para las áreas del BaP en un intervalo de 0.25 a 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

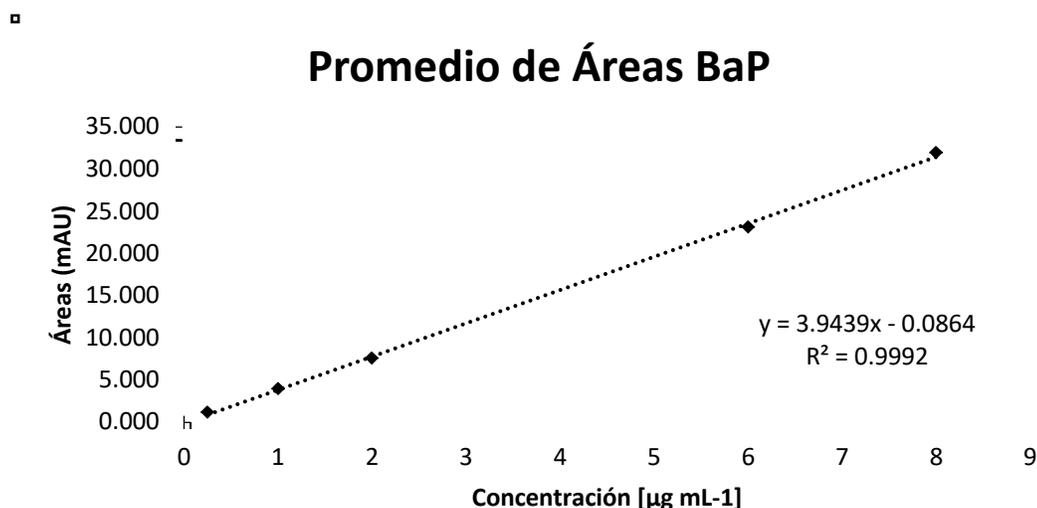


Figura 4.4 Curva de calibración de respuesta de equipo (áreas) para BaP

Límites

El límite de detección del BaP en este sistema cromatográfico es de 0.058 $\mu\text{g mL}^{-1}$, lo cual representa la concentración más baja que puede ser detectada por el sistema. Mientras que el de cuantificación es 0.076 $\mu\text{g mL}^{-1}$, valor que representa la concentración más baja que puede ser cuantificada con precisión por el sistema.

4.1.3. Optimización del método de EFS-CLAR-UV

4.1.3.1 Recobro

A continuación se reportan los resultados del procedimiento utilizado para la extracción de los HAPs de las muestras acuosas (Bernal-Toris, 2015). Este método fue optimizado para obtener un extracto con los HAPs para llevarlo al análisis cromatográfico. Se modificó el volumen del disolvente de elución, de 4 a 6 mL, así

como la forma de aplicación, pues fue adicionado en volúmenes de 2 mL, así como la forma de aplicación de esta.

A diferencia de los trabajos previos, en donde el extracto EFS se evaporaba a sequedad y se reconstituía la muestra en un volumen menor (de 1 mL); por simplicidad, en este trabajo fue omitido este paso y se analizó directamente el extracto comparándolo con un Blanco de 6 mL ($4 \mu\text{g}/6 \text{ mL}$) con concentración de 0.666 mg/L.

En la Tabla 3.6 se presentan los valores de los recobros obtenidos para tres muestras de 15 mL de agua potable fortificadas con una concentración de $0.266 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ambos hidrocarburos y sus variaciones.

Tabla 4.6 Porcentajes de recobro de extracción de BaA y BaP, en tres muestras

MUESTRA	PORCENTAJE DE RECOBRO			\bar{x} (%)	S (%)	CV (%)
	1	2	3			
BaA	86	80	85	83	3.26	3.91
BaP	68	80	78	75	6.14	8.134

Del análisis triplicado de las muestras extraídas se obtiene una variación menor al 8.1% por lo que se considera adecuado el método. Es apreciable ver que el porcentaje de recuperación del BaA es mayor al de BaP, esto puede ser atribuido a que el segundo es más hidrofóbico que el primero, pues presenta un anillo extra en su estructura lo que hace que sea menos polar y por lo tanto su recuperación sea menor.

4.1.3.1.1 Linealidad del método de EFS-CLAR-UV, BaA

Para comprobar la linealidad del método se compararon las áreas obtenidas de los diferentes picos cromatográficos del BaA obtenidos en los extractos de muestras fortificadas con diferentes concentraciones; con ello se construyó la Tabla 3.7 y gráfica (Figura 3.5) para observar la linealidad del método, presentadas a continuación.

Tabla 4.7 Variación entre áreas de los picos en inyecciones en un mismo día para el método de EFS-CLAR-UV con diferentes concentraciones de BaA

CONCENTRACIÓN TEÓRICA [µg/mL]	ÁREA (mUA)	PROMEDIO (mUA)	S (mUA)	CV (%)
0.067	0.9325	0.929	0.003	0.355
	0.9261			
	0.9281			
0.133	2.6564	2.703	0.077	2.863
	2.7921			
	2.6598			
0.267	4.5655	4.448	0.174	3.909
	4.2486			
	4.5310			
0.533	8.0221	7.989	1.028	12.872
	9.0000			
	6.9442			
0.800	12.5520	12.133	0.898	7.401
	11.1017			
	12.7440			
1.067	15.2855	15.344	0.099	0.645
	15.4587			
	15.2891			

□

Linealidad del metodo de EFS-CLAR-UV BaA

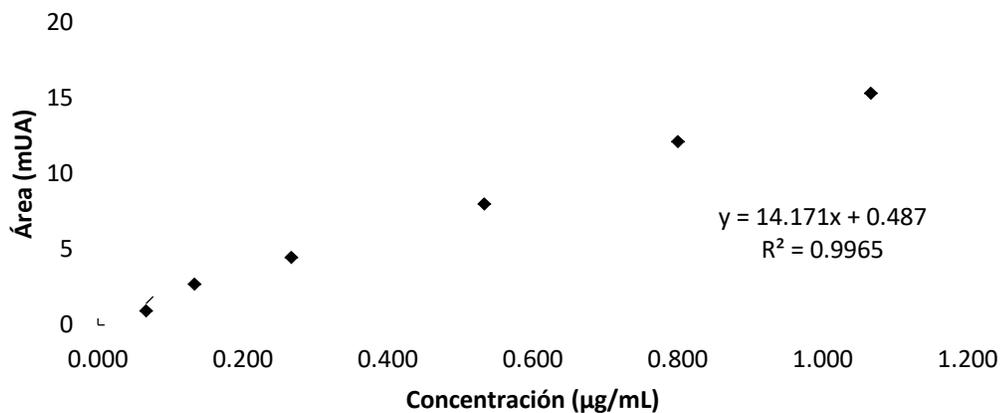


Figura 4.5 Linealidad del método de EFS-CLAR-UV para BaA

La recta ajustada por el método de mínimos cuadrados presenta un coeficiente de correlación $r^2 > 0.99$, por lo que se concluye que el método es lineal.

Para poder obtener el recobro global del método, se construyó una gráfica Figura 3.6 en la cual se correlacionó la cantidad de analito agregada de BaA contra la cantidad de analito recuperada de BaA, en μg .

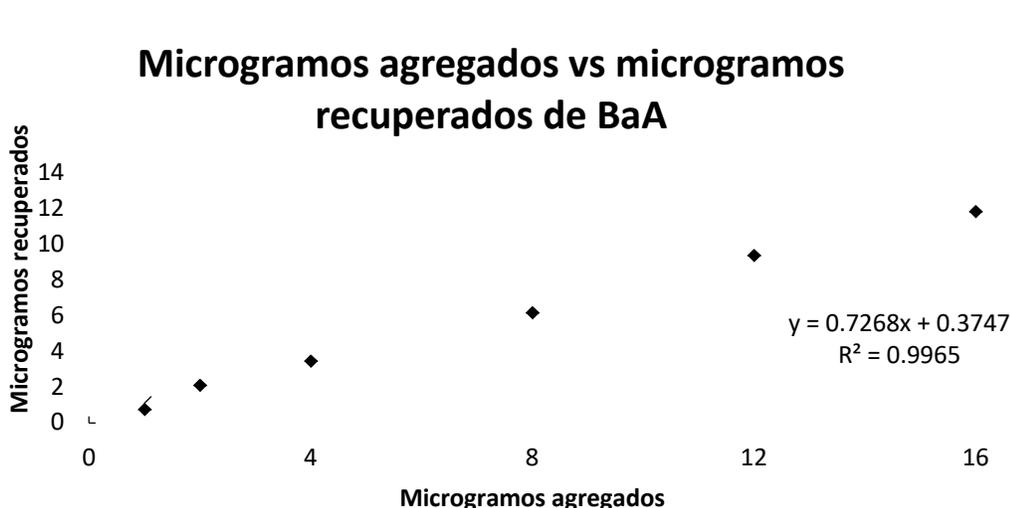


Figura 4.6 Linealidad del método de EFS-CLAR-UV de BaA para visualizar recobro global

En la Figura 3.6 podemos observar que la pendiente es 0.7268, si multiplicamos este valor por 100, obtenemos 72.68 de recobro global.

4.1.3.1.2 Linealidad del método de EFS-CLAR-UV, BaP

Para comprobar la linealidad del método se compararon las áreas obtenidas de los diferentes picos cromatográficos del BaP obtenidos en los extractos de muestras fortificadas con diferentes concentraciones; con ello se construyó la Tabla 3.8 y la gráfica (Figura 3.7) para observar la linealidad del método presentadas a continuación.

Tabla 4.8 Variación del área de los picos entre inyecciones en un mismo día para el método de EFS-CLAR-UV con diferentes concentraciones de BaP

CONCENTRACIÓN TEÓRICA [µg/mL]	ÁREA (mUA)	PROMEDIO (mUA)	S (mUA)	CV (%)
0.067	0.4727	0.460	0.023	5.089
	0.4739			
	0.4328			
0.133	1.2387	1.285	0.077	6.022
	1.3744			
	1.2421			
0.267	1.6400	1.806	0.147	8.137
	1.9196			
	1.8583			
0.533	3.8456	3.683	0.244	6.629
	3.8000			
	3.4019			
0.800	5.5751	5.518	0.342	6.200
	5.1510			
	5.8280			
1.067	7.4882	7.556	0.060	0.792
	7.5812			
	7.5999			

La recta ajustada por el método de mínimos cuadrados presenta un coeficiente de correlación $r^2 > 0.99$, por lo que se concluye que el método es lineal. Lo cual puede apreciarse en la Figura 3.7.

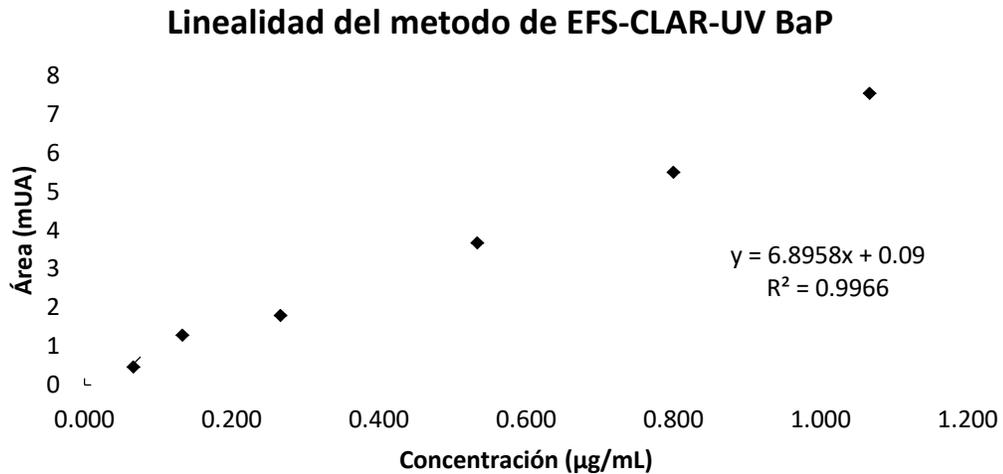


Figura 4.7 Linealidad del método de EFS-CLAR-UV para BaP

Para poder obtener el recobro global del método, se construyó una gráfica Figura 3.8 en la cual se graficó la cantidad de analito agregada de BaP contra la cantidad de analito recuperada de BaP en µg.

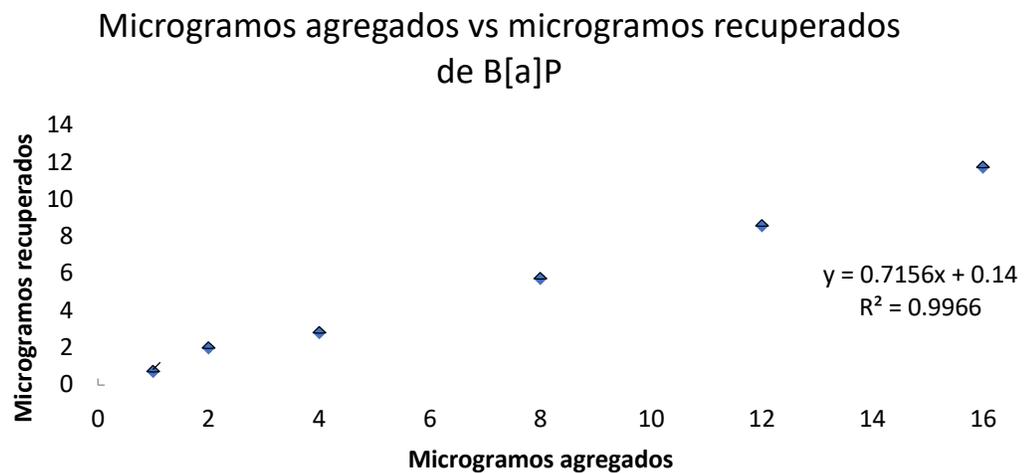


Figura 4.8 Linealidad del método de EFS-CLAR-UV de BaP para visualizar recobro global

En la Figura 3.8, podemos observar que la pendiente es 0.7156, si multiplicamos este valor por 100, obtenemos 71.56 de recobro global.

4.1 MANEJO DE CULTIVOS

Los datos de absorbancia que se obtuvieron periódicamente en los cultivos sirvieron para monitorear el crecimiento de las microalgas. Se presentan las mediciones para los días 0, 14, 21, 26, 34 y 49. Presentados en la Tabla 3.9 y la curva de crecimiento en la Figura 3.9.

Tabla 4.9 Absorbancia para dos cultivos de microalgas *Scenedesmus acutus* y *Selenastrum capricornutum*, cultivos con un volumen de 100 mL

DÍA	Especie de microalgas	
	<i>S. capricornutum</i>	<i>S. acutus</i>
0	0	0
14	0.194	0.244
21	0.370	0.960
26	0.454	1.102
34	0.769	1.129
49	1.650	1.513

Curva de crecimiento

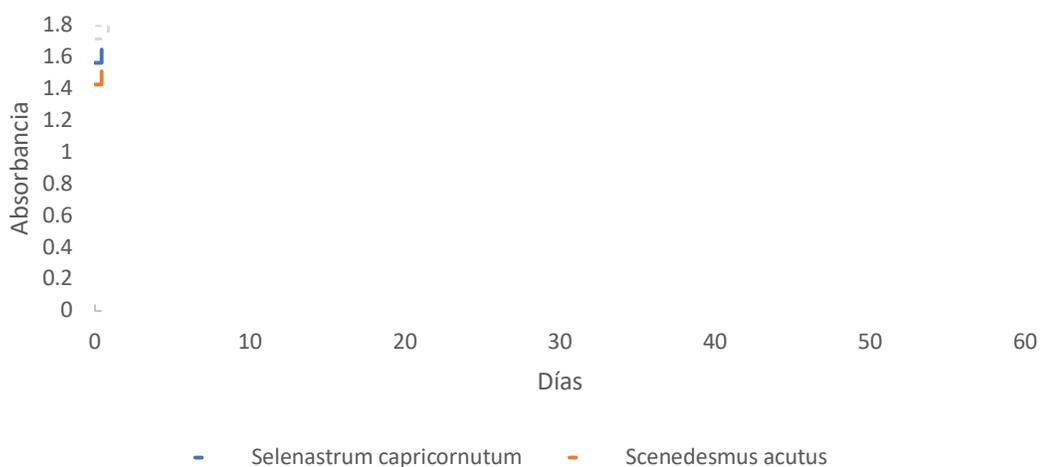


Figura 4.9 Medición del crecimiento de cultivos

Es importante resaltar que la especie *Scenedesmus acutus* presenta un rápido crecimiento y alcanza el nivel de absorbancia 1, en el cual encontramos una cantidad de células apropiada para realizar los ensayos, en el día 20, mientras que la especie *Selenastrum capricornutum* alcanza el nivel de absorbancia 1 tiempo después, aproximadamente en el día 38. Si bien la especie *Selenastrum capricornutum* presenta un mayor poder de remoción, se decidió trabajar con los dos tipos de microalgas, por cuestiones de volumen de medios y disminución de tiempo para obtener las células.

4.2 EVALUACIÓN DE BIORREACTORES

4.2.1. Ensayos con agitación orbital

Los porcentajes de remoción de BaA y BaP obtenidos en el reactor con agitación orbital son presentados en la Tabla 3.10 y gráficamente en la Figura 3.10.

Tabla 4.10 Porcentajes de remoción en ensayos con agitación orbital (50 rpm), para BaA y BaP, n=3

Tiempo [horas]	Porcentaje de remoción (%R)			
	Control abiótico		Bioensayo	
	B(a)A	B(a)P	B(a)A	B(a)P
3	64 ± 6	55 ± 7	95 ± 0.4	76 ± 1
6	64 ± 2	58 ± 4	98 ± 0.4	94 ± 2

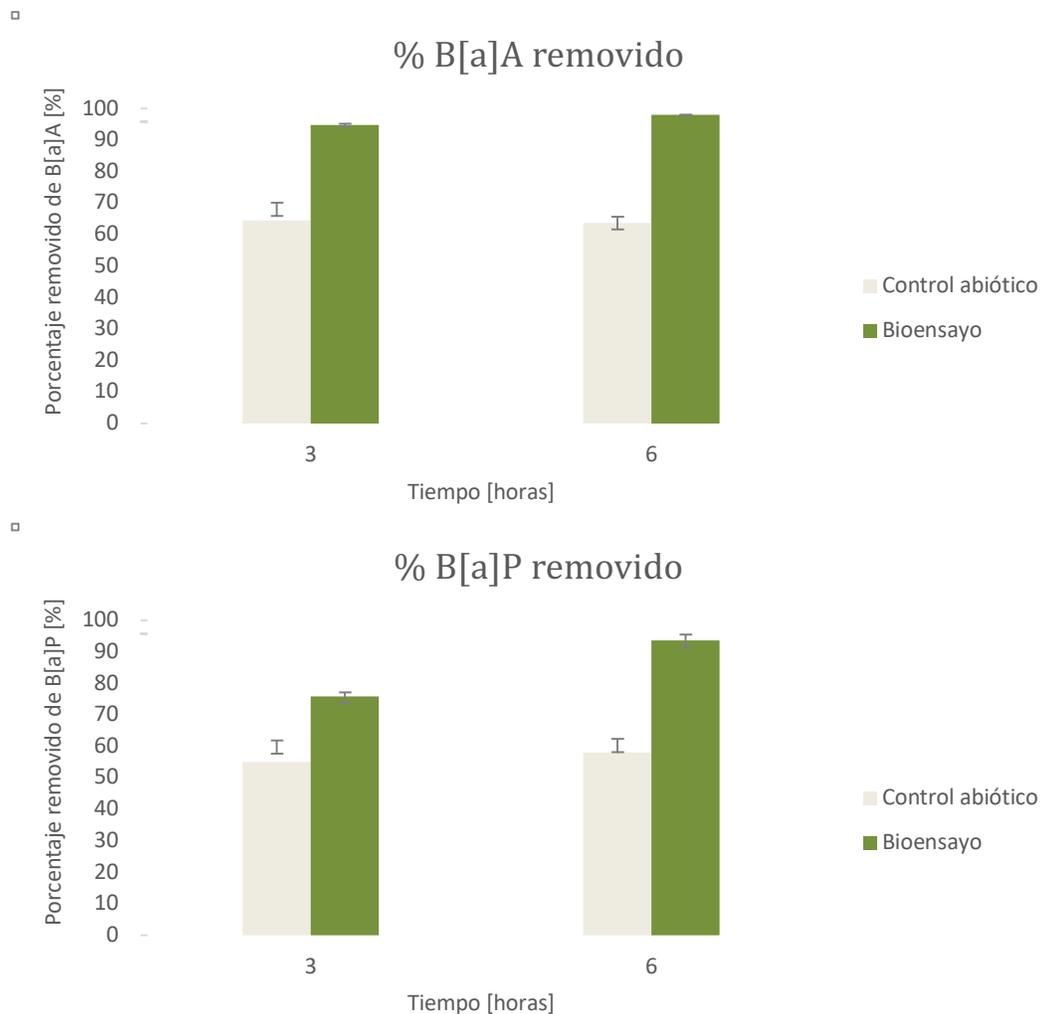


Figura 4.10 Remoción de BaA y BaP en reactor con agitación orbital en 3 y 6 horas. Volumen muestra=15 mL. Concentración de HAPs 266 $\mu\text{g/L}$ (resultado promedio +/- desviación estándar, n=3)

En este estudio se observó lo siguiente:

- a) La remoción de los hidrocarburos en los controles abióticos es baja comparada con los bioensayos y se mantiene constante en un lapso de 6 horas. Se realizaron pruebas estadísticas como la prueba t al 95 % de confianza para constatar si la remoción no era significativamente diferente en los tiempos trabajados.

Para BaA se acepta la hipótesis nula con un 95% de confianza, es decir, no hay suficiente evidencia para demostrar que la remoción en el ensayo a 3 horas es diferente de la remoción en el ensayo a 6 horas ($t=0.876$, $t \geq 0.05$).

Para BaP el conjunto de datos para 6 horas no cumple con el supuesto de normalidad, el valor de significancia en la prueba de Shapiro-Wilks del análisis estadístico es menor a 0.05, por lo que no es posible realizar la prueba t, sin embargo, puede observarse en la Figura 3.10 que el porcentaje de remoción de los blancos en ambos tiempos de exposición es muy parecido incluso llegan a sobreponerse los intervalos de confianza, por lo que podemos concluir, sin una herramienta estadística, que el tiempo no afecta la remoción de BaP en los controles abióticos.

- b) Los porcentajes de remoción en los diferentes tiempos por las microalgas inmovilizadas es evidente, incluso en un tiempo de 3 horas la remoción es alta para ambos hidrocarburos (aunque menor para el BaP en comparación con el BaA, que es menos hidrófobo). En un tiempo de 6 horas la remoción es bastante parecida entre ambos hidrocarburos. Por lo que se confirma que en los ensayos con microalgas inmovilizadas la remoción aumenta conforme incrementa el tiempo de exposición y es más rápida para BaA.

Tanto para BaA como para BaP se rechaza la hipótesis nula con un 95% de confianza, es decir, sí existe diferencia significativa estadísticamente hablando entre el porcentaje de remoción en los ensayos en 3 y 6 horas (BaA $t=0.001$, $t < 0.05$ y BaP $t=0.0003$, $t < 0.05$).

- c) Al realizar una comparación entre la remoción producida entre los bioensayos y los controles abióticos tanto a 3 como a 6 horas, puede observarse que la remoción utilizando microalgas es superior a la obtenida con los controles abióticos. Se realizaron pruebas estadísticas, prueba t al 95 % de confianza para constatar si la remoción no era significativamente diferente entre los bioensayos y los Blancos.

Tanto para BaA como para BaP a 3 horas se rechaza la hipótesis nula con un 95% de confianza, es decir, sí existe diferencia significativa estadísticamente hablando entre el porcentaje de remoción de controles abióticos y bioensayos a 3 horas (BaA $t=0.002$, $t<0.05$ y BaP $t=0.014$, $t<0.05$). Tanto para BaA como para BaP a 6 horas se rechaza la hipótesis nula con un 95% de confianza, es decir, sí existe diferencia significativa estadísticamente hablando entre el porcentaje de remoción de controles abióticos y bioensayos a 6 horas (BaA $t=0.00015$, $t<0.05$ y BaP $t=0.003$, $t<0.05$).

Los resultados anteriores obtenidos del reactor con agitación orbital arrojaron información convincente de la remoción de los hidrocarburos por la especie de microalgas *Selenastrum capricornutum* inmovilizada en esferas de alginato. La investigación en el grupo de trabajo arroja además información convincente de la necesidad de la agitación para propiciar la homogenización y el mezclado del medio acuoso, clave para la remoción con perlas de alginato, por lo cual se procedió a trabajar con esta especie en un reactor tipo tanque con agitación mediante recirculación.

4.2.2. Remoción abiótica

Los porcentajes de remoción de BaA y BaP para el ensayo de remoción abiótica sin perlas de alginato se efectuaron en el reactor RSL50 y dos tipos de luz. Son presentados en la Tabla 3.11 y gráficamente en la Figura 3.11.

Tabla 4.11 Porcentajes de remoción de BaA y BaP obtenidos en el reactor RSI con un flujo de recirculación de 1 mL/min, remoción abiótica

Tiempo [horas]	Porcentaje de remoción			
	Degradación con luz amarilla		Degradación con luz natural	
	B(a)A	B(a)P	B(a)A	B(a)P
3	12 ± 2	11 ± 5	20 ± 3	14 ± 2
6	18 ± 4	21 ± 1	37 ± 4	35 ± 2
24	24 ± 3	20 ± 3	44 ± 1	33 ± 4

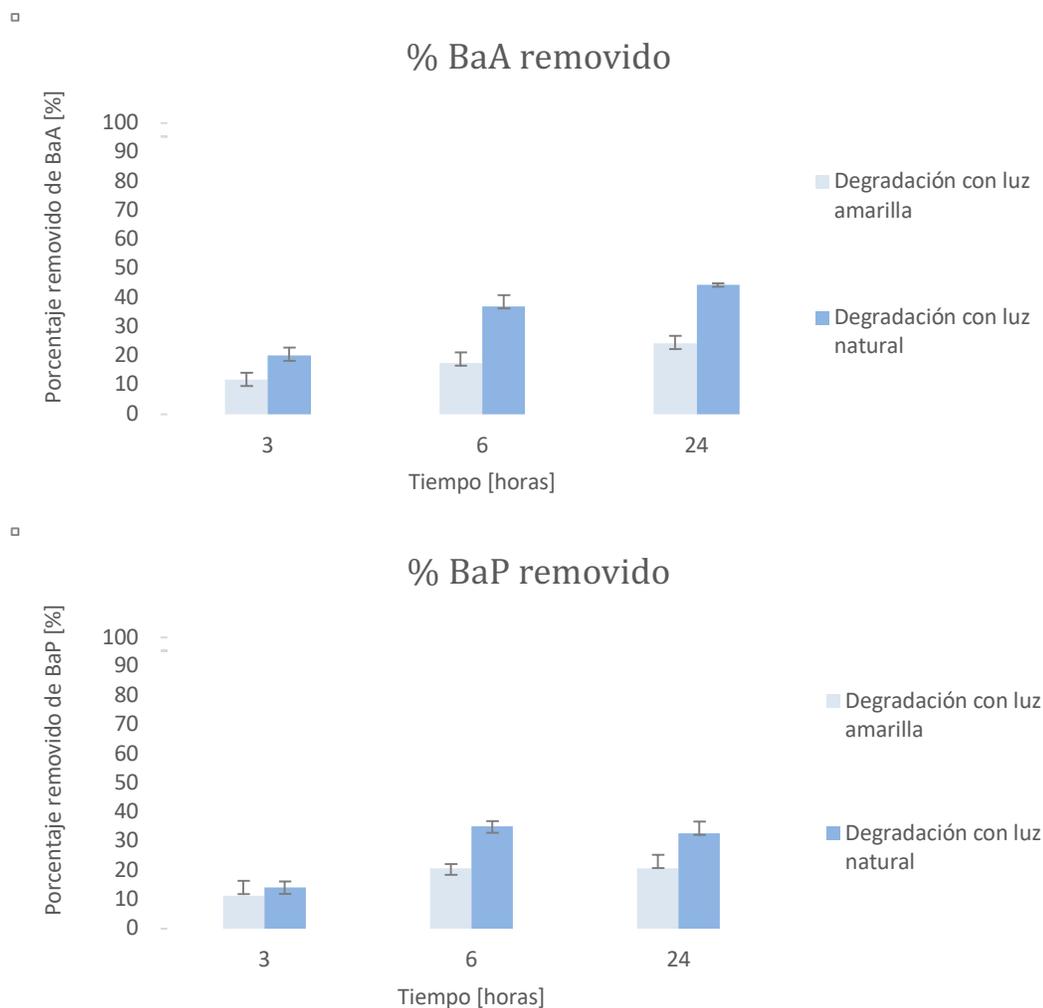


Figura 4.11 Remoción abiótica de BaA y BaP en RSI50 en 3, 6 y 24 horas. Volumen de muestra 15 mL. Concentración de HAPs 266 $\mu\text{g/L}$ (resultado promedio \pm desviación estándar, $n=3$).

La remoción abiótica de los hidrocarburos en estos ensayos es atribuida a factores físicos y de adsorción a los materiales de construcción de los reactores y fotólisis. En este estudio se observó lo siguiente:

- a) La remoción de los hidrocarburos, ya sea en presencia de luz amarilla (foco de 10 watts) o en presencia de luz natural, es baja y no presenta gran variación en los diferentes tiempos, pero se puede observar una tendencia a aumentar de manera muy lenta. Para confirmar lo anterior se realizaron pruebas estadísticas, ANOVA al 95% de confianza, para corroborar si los

porcentajes de remoción eran significativamente diferentes en el tiempo (3, 6 y 24 horas).

En el ensayo con luz amarilla se encontró que para BaA no existe suficiente evidencia para demostrar que la remoción es diferente en el intervalo de 3 a 6 horas así como en el intervalo de 6 a 24 horas. Mientras que para BaP no existe suficiente evidencia para demostrar que la remoción es significativamente diferente desde las 3 hasta las 24 horas.

Para el ensayo con luz natural tanto para BaA como para BaP los porcentajes de remoción a 3 horas son estadísticamente significativos comparados con los obtenidos a 6 y 24 horas, se puede concluir que la remoción a 3 horas es diferente pero mantiene un punto máximo a 6 horas.

- b) La remoción de los hidrocarburos en el RSI**50** con agitación mediante recirculación es baja. Sin embargo, se encontró que existe una diferencia entre utilizar condiciones en un sistema con luz natural (abierto al ambiente) y otro con luz artificial mediante un foco con luz amarilla y en una caja cerrada. Los resultados fueron analizados mediante una prueba t con un nivel de confianza del 95 %, comparando los dos sistemas de remoción.

Se encontró que para BaA el porcentajes de remoción de los ensayos con luz natural son significativamente mayores comparados con el porcentaje de remoción obtenido en los ensayos con luz amarilla. Se puede concluir que el ensayo en presencia de luz natural la remoción abiótica es mayor que la del ensayo con luz amarilla en los diferentes tiempos (3, 6 y 24 horas) para la remoción de BaA.

Para BaP no hay suficiente evidencia para demostrar que porcentajes de remoción obtenidos en los ensayos con luz amarilla son diferentes en cuanto a la eficacia en la remoción de BaP con respecto a los ensayos con luz natural a 3 horas y 24 horas. Sin embargo, a 6 horas, se puede concluir que el

porcentaje de remoción de BaP en presencia de luz natural la remoción es mayor que el ensayo con luz amarilla.

Apoyado en estos resultados, se procedió a utilizar el reactor tipo tanque con agitación mediante recirculación RSI50, en presencia de luz amarilla (donde la remoción abiótica es menor) en una caja de madera cerrada y a temperatura ambiente, para efectuar en él diferentes ensayos con el objetivo de encontrar los parámetros óptimos para la remoción de BaA y BaP.

4.2.3. Estudio de remoción por *Selenastrum capricornutum* inmovilizada

Los resultados a diferentes tiempos de exposición de los bioensayos y los controles abióticos realizados con microalgas inmovilizadas en perlas de alginato en el reactor RSI50 son presentados en la Tabla 3.12 y Figura 3.12.

Tabla 4.12 Porcentajes de remoción de BaA y BaP obtenidos en el reactor RSI50 con un flujo de recirculación de 1 mL/min y la especie de microalgas inmovilizadas *Selenastrum capricornutum* en 3, 6 y 15 horas

Tiempo [horas]	Porcentaje de remoción			
	Control abiótico		Bioensayo	
	B(a)A	B(a)P	B(a)A	B(a)P
3	45 ± 3	46 ± 5	50 ± 4	54 ± 4
6	45 ± 2	50 ± 1	68 ± 3	64 ± 1
15	49 ± 2	42 ± 9	67 ± 1	65 ± 3

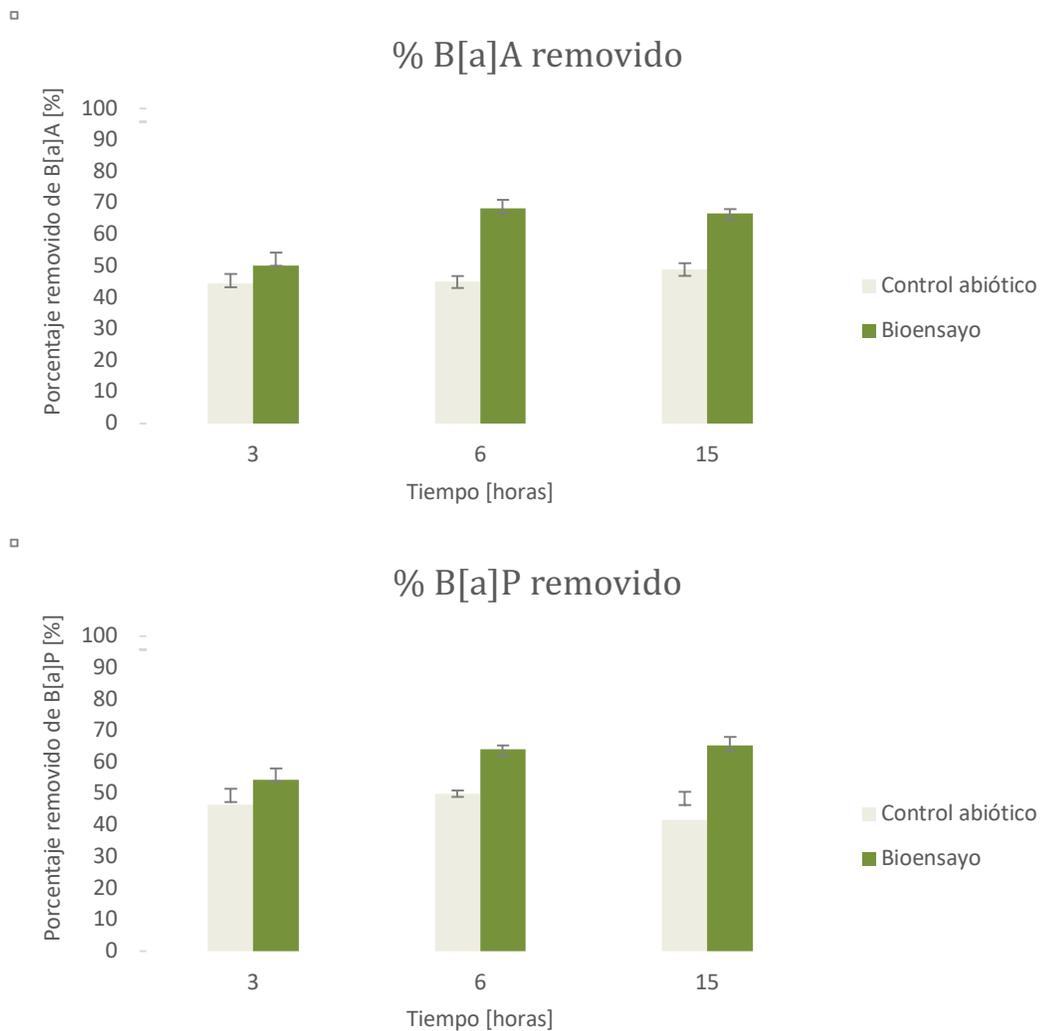


Figura 4.12 Porcentajes de remoción de BaA y BaP en RSI50 a 3, 6 y 15 horas, volumen de muestra 15 mL. Concentración de HAPs 266 $\mu\text{g/L}$ (resultado promedio +/- desviación estándar, n=3)

Para la optimización del tiempo en el que trabajó el reactor se plantearon ensayos con la especie inmovilizada *Selenastrum capricornutum* con el objetivo de evaluar la remoción de los HAPs estudiados y encontrar el tiempo óptimo de trabajo. Los resultados expuestos anteriormente muestran lo siguiente:

- a) Los Blancos presentaron porcentajes de remoción bajos y constantes en los diferentes tiempos. Se realizó un análisis estadístico prueba ANOVA con un 95% de confianza para determinar si existía diferencia significativa entre los promedios de remoción de los controles abióticos a diferentes tiempos.

Se encontró que no hay suficiente evidencia para demostrar que los porcentajes de remoción obtenidos en los controles abióticos a 3, 6 y 15 horas sean diferentes en cuanto a la eficacia en la remoción de BaA y BaP ($p\text{-valor}_{\text{BaA}}=0.183$ y $p\text{-valor}_{\text{BaP}}=0.428$).

- b) Para los bioensayos se realizó una prueba ANOVA con un 95% de confianza para determinar si existía diferencia significativa entre los promedios de remoción de los bioensayos a diferentes tiempos.

Para ambos hidrocarburos se determinó que sí existe diferencia significativa entre los porcentajes de remoción de los bioensayos a 3 y 6 horas ($p\text{-valor}_{\text{BaA}}=0.002$ y $p\text{-valor}_{\text{BaP}}=0.027$), así también se determinó que no existe suficiente evidencia para demostrar que los porcentajes de remoción de los ensayos a 6 y 15 horas fueran diferentes en cuanto a la eficacia en la remoción de los HAPs ($p\text{-valor}_{\text{BaA}}=0.875$ y $p\text{-valor}_{\text{BaP}}=0.923$).

- c) Los porcentajes de remoción, en los diferentes tiempos, son mayores al utilizar microalgas inmovilizadas comparado con los controles abióticos. Se realizaron pruebas estadísticas, prueba t al 95 % de confianza para constatar si la remoción no era significativamente diferente entre los bioensayos y los Blancos.

Tanto para BaA como para BaP a 3 horas se acepta la hipótesis nula con un 95% de confianza, es decir, no existe diferencia significativa estadísticamente hablando entre el porcentaje de remoción de controles abióticos y bioensayos a 3 horas (BaA $t=0.198$, $t<0.05$ y BaP $t=0.151$, $t<0.05$). Para BaA como para BaP a 6 y 15 horas se rechaza la hipótesis nula con un 95% de confianza, es decir, sí existe diferencia significativa estadísticamente hablando entre el porcentaje de remoción de controles y bioensayos a 6 y 15 horas (BaA $t<0.001$, $t<0.05$ y BaP $t<0.024$, $t<0.05$).

Puede observarse en la Figura 3.12 que los porcentajes de remoción en los bioensayos son diferentes a los controles abióticos en los tres tiempos analizados,

lo cual demuestra remoción por la presencia de microalgas inmovilizadas y un aumento en el porcentaje de remoción de los HAPs al incrementar el tiempo en los bioensayos de 3 a 6 h, manteniéndose muy parecidos entre 6 y 15 horas.

Basados en estos resultados, así como en la factibilidad de realizar los ensayos, se seleccionó **6 horas** como tiempo de trabajo para la optimización de los parámetros operacionales del biorreactor tipo tanque con agitación mediante recirculación.

4.2.4. Estudio de la remoción con dos especies de microalgas inmovilizadas

Una vez evaluada la capacidad de remoción del reactor RSI50 se procedió a evaluar y seleccionar la especie de microalgas o combinación de especies a utilizar; es por ello que se plantearon ensayos en los cuales se evaluaron las especies de microalgas de la siguiente manera: **1.** Control abiótico con perlas de alginato sin microalgas **2.** Mezcla de 45 perlas de *Selenastrum capricornutum* y 45 perlas *Scenedesmus acutus* (con 7.5×10^5 microalgas por perla para *Selenastrum capricornutum* y 6.6×10^5 microalgas por perla para *Scenedesmus acutus*) **3.** *Scenedesmus acutus* (6.6×10^5 microalgas por perla) **4.** *Selenastrum capricornutum* (7.5×10^5 microalgas por perla), todos con 90 perlas totales.

Se analizaron 6 y 15 horas de exposición con el objetivo de observar el comportamiento de la remoción de las dos especies solas y su combinación o mezcla. Los porcentajes de remoción resultantes de este estudio son presentados en la Tabla 3.13, y de manera gráfica en la Figura 3.13.

Tabla 4.13 Porcentajes de remoción de BaA y BaP variando la especie de microalgas inmovilizadas en RSI50 a 6 y 15 horas

Porcentaje de remoción

Tiempo [horas]	Control abiótico		Mezcla		S. ac		S. cap	
	B(a)A	B(a)P	B(a)A	B(a)P	B(a)A	B(a)P	B(a)A	B(a)P
6	45 ± 2	50 ± 1	52 ± 3	55 ± 0.1	51 ± 0.1	46 ± 1	68 ± 3	64 ± 1
15	49 ± 2	42 ± 9	63 ± 1	55 ± 3	56 ± 8	53 ± 2	67 ± 1	65 ± 3

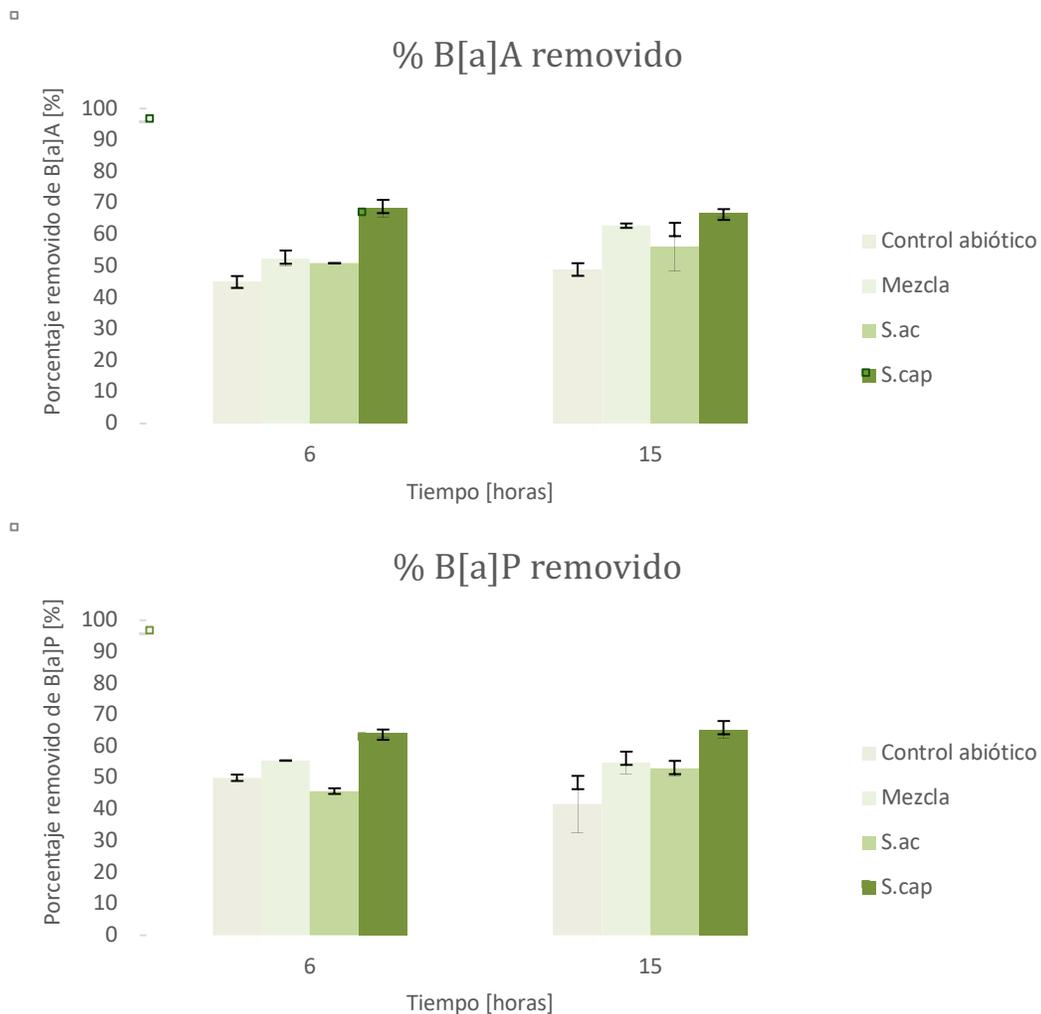


Figura 4.13 Porcentajes de remoción de BaA y BaP en 6 y 15 horas, utilizando dos especies de microalgas inmovilizadas y un flujo de recirculación de 1 mL/min, volumen de muestra 15 mL. Concentración de HAPs 266 µg/L (resultado promedio +/- desviación estándar, n=3)

Los resultados del estudio anterior fueron comparados en los diferentes tiempos con pruebas t al 95% de confianza, obteniendo lo siguiente:

- a) Para los controles abióticos no hay suficiente evidencia para demostrar que los porcentajes, tanto para BaA como para BaP, son diferentes ($p\text{-valor}_{BaA}=0.102$, $p\text{-valor}_{BaP}=0.262$).
- b) En la mezcla de microalgas el porcentaje de remoción de BaA, a 6 horas, es estadísticamente significativo comparado con el porcentaje de remoción a 15

horas. Por lo que se puede concluir que el tiempo 15 horas es mejor que 6 horas para la remoción de BaA ($p\text{-valor}_{\text{BaA}} = 0.005$).

Para BaP no hay suficiente evidencia para demostrar que el porcentaje de remoción es diferente en la mezcla en el intervalo de 6 a 15 horas. La remoción es igual en 6 y 15 horas ($p\text{-valor}_{\text{BaP}} = 0.804$).

- c) Para los ensayos tanto de *S. cap* como de *S. ac* solas, no hay suficiente evidencia para demostrar que los porcentajes de remoción, de ambos hidrocarburos, sean diferentes en cuanto a la eficacia de remoción en 6 y 15 horas (*S. cap* $p\text{-valor}_{\text{BaA}} = 0.529$, $p\text{-valor}_{\text{BaP}} = 0.647$ /*S. ac* $p\text{-valor}_{\text{BaA}} = 0.398$, $p\text{-valor}_{\text{BaP}} = 0.016$).

Al analizar los porcentajes de remoción de los ensayos en los diferentes tiempos se concluyó que los porcentajes de remoción en los Blancos, bioensayos con *S. ac* y con *S. cap* son iguales entre si a 6 y 15 horas. Para el ensayo con la mezcla de especies de microalgas inmovilizadas el porcentaje de remoción de los hidrocarburos estudiados si es diferente en 6 y 15 horas.

Para contrastar los porcentajes de remoción en los diferentes ensayos se realizó análisis estadístico prueba ANOVA con un 95% de confianza.

- d) Excepto para *S. ac*, el porcentaje de remoción de los Blancos es significativamente menor comparado con los porcentajes de remoción obtenidos con los ensayos donde se utilizan microalgas inmovilizadas. Por lo tanto podemos concluir que existe una remoción causada por la presencia de microalgas en el medio.
- e) En 6 horas se encontró que no existe evidencia significativa para demostrar que la remoción de BaA sea diferente entre los ensayos en los cuales se utilizo la mezcla y *S. ac* sola. Mientras que para BaP el porcentaje de remoción con la mezcla de microalgas es estadísticamente mayor comparado con el sistema *S. ac* sola.

En el mismo sistema a 15 horas se encontró que no existe evidencia significativa para demostrar que la remoción, tanto de BaA como de BaP, sea diferente en un ensayo con la mezcla de microalgas comparada con un ensayo en el mismo tiempo con la especie *S. ac* sola.

- f) El porcentaje promedio de remoción, de BaA como de BaP a 6 horas y 15 horas, al utilizar *S. cap* es significativamente mayor comparado con el porcentaje obtenido al utilizar *S. ac* y la mezcla de microalgas inmovilizadas. Por lo que se puede concluir que el ensayo en el cual se utiliza la especie *S. cap* presenta porcentajes de remoción comparativamente mayores.

Entre las especies de microalgas utilizadas es evidente la capacidad de remoción de los hidrocarburos y un mejor poder de remoción por la especie *S. capricornutum* al compararla con *S. acutus*. El promedio de remoción de la mezcla de microalgas inmovilizadas por separado se mantiene en un nivel intermedio entre las dos especies. Por lo que los sistemas en orden descendiente de remoción a 6 horas son:

1. *Selenastrum capricornutum* (90 perlas)
2. Mezcla de las especies: 45 perlas *Selenastrum capricornutum* y 45 perlas *Scenedesmus acutus*
3. *Scenedesmus acutus* (90 perlas)

También se corroboró que al utilizar una mezcla de ambas microalgas y un tiempo de exposición de 15 horas, el porcentaje de remoción es bastante parecido al de *S. capricornutum* sola para BaA.

Con estas bases, se planteó el preparar y utilizar una mezcla de ambas especies de microalgas para ensayos de volumen mayor por la gran cantidad de biomasa necesaria, ya que el crecimiento de *Scenedesmus acutus* es más rápido que el de *Selenastrum capricornutum*.

4.2.5. Estudio de la posición de la salida del reactor

A continuación se presentan, en la Tabla 3.14, los resultados de este estudio, donde se utilizaron reactores tipo tanque con agitación mediante recirculación de salida inferior (RSI50) y salida lateral (RSL50), ambos con una capacidad de 50 mL, en los cuales se observó la remoción producida en el por: **1.** Control abiótico con perlas de alginato sin microalgas **2.** Mezcla de 45 perlas de *Selenastrum capricornutum* y 45 perlas *Scenedesmus acutus* (con 7.5×10^5 microalgas por perla para *Selenastrum capricornutum* y 6.6×10^5 microalgas por perla para *Scenedesmus acutus*) **3.** *Scenedesmus acutus* (6.6×10^5 microalgas por perla) **4.** *Selenastrum capricornutum* (7.5×10^5 microalgas por perla), todos con 90 perlas totales.

Tabla 4.14 Porcentaje promedio removido de HAPs en las dos configuraciones del reactor, RSI50 y RSL50. Flujo de operación 1 mL/min y diferentes especies de microalgas, solas o en mezcla. Tiempo de 6 h

Porcentaje de remoción

Tipo	Control abiótico		Mezcla		S. ac		S. cap	
	B(a)A	B(a)P	B(a)A	B(a)P	B(a)A	B(a)P	B(a)A	B(a)P
RSI	45 ± 2	50 ± 1	52 ± 3	55 ± 0	51 ± 0	46 ± 1	68 ± 3	64 ± 1
RSL	35 ± 5	23 ± 2	39 ± 4	40 ± 4	38 ± 7	45 ± 6	52 ± 7	53 ± 3

Los resultados para el porcentaje removido de ambos hidrocarburos son presentados gráficamente en la Figura 3.14.

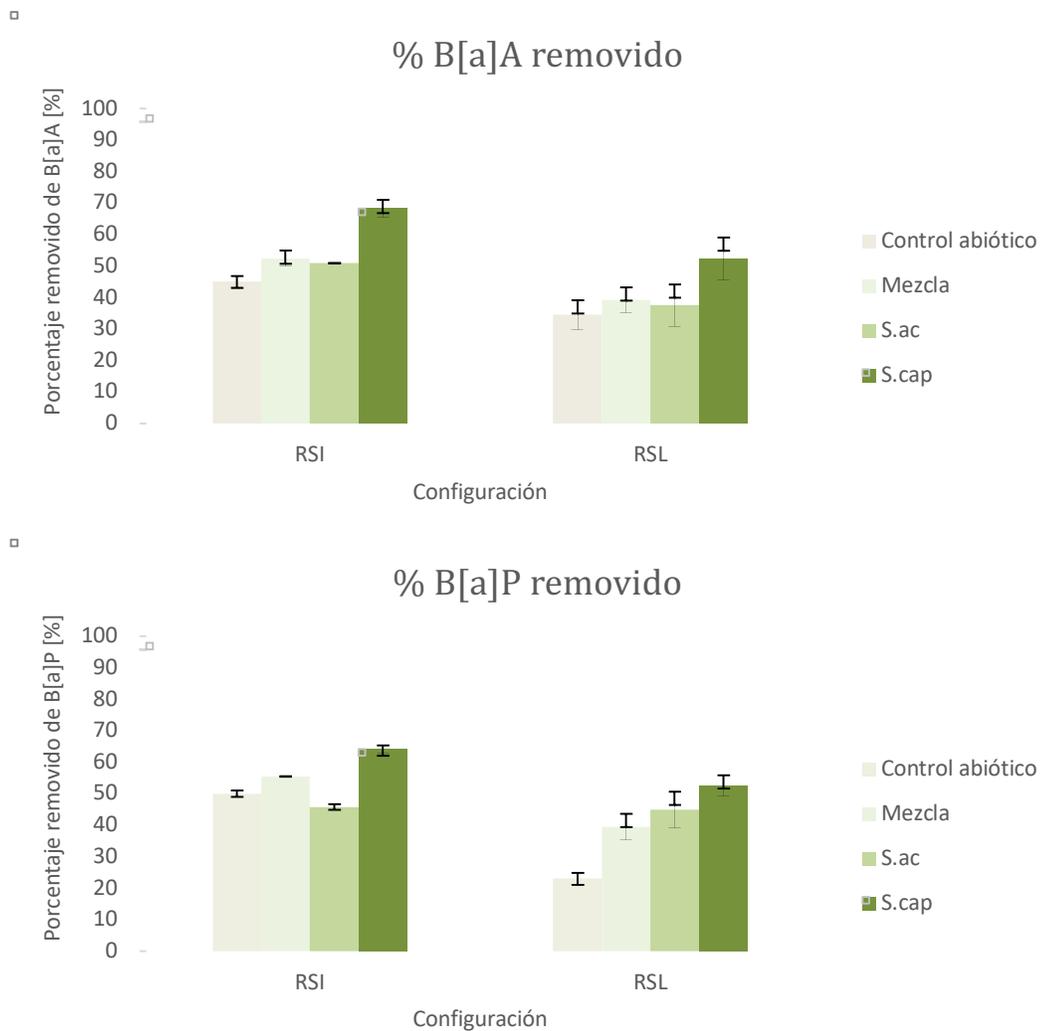


Figura 4.14 Porcentajes de remoción de BaA y BaP en 6 horas, flujo de 1mL/min, en RSI50 y RSL50 utilizando dos especies de microalgas inmobilizadas por separado y en mezcla, volumen de muestra 15 mL. Concentración de HAPs 266 $\mu\text{g/L}$ (resultado promedio +/- desviación estándar, n=3)

De estos resultados se observó lo siguiente:

- a) Excepto para la remoción de BaP por la especie *S. ac* en el RSI, en ambas configuraciones los Blancos presentan porcentajes de remoción significativamente menores a los obtenidos con microalgas inmobilizadas, tanto para BaA como para BaP. Se realizó una prueba ANOVA con un 95% de confianza para corroborar lo anterior encontrándose que los porcentajes

de remoción con los controles abióticos son significativamente diferentes comparados con los bioensayos para ambas configuraciones,

- b) En un tiempo de 6 horas es apreciable la diferencia en la remoción de los hidrocarburos para ambos reactores, así como que el reactor, con un mayor porcentaje de remoción de los HAPs, es el RSI**50**.

A continuación en la Tabla 4.15 se muestran las conclusiones obtenidas al realizar una prueba t con un 95% de confianza donde se contrastaron los ensayos efectuados tanto en RSI como en RSL.

Tabla 4.15 Prueba ANOVA Comparación entre RSI**50** y RSL**50**

Ensayos comparados		BaA		BaP	
		p-Valor	Conclusión	p-Valor	Conclusión
Control abiótico RSI	Control abiótico RSL	0.032	Diferente	0	Diferente
mezcla RSI	mezcla RSL	0.017	Diferente	0.117	Igual
<i>S. ac</i> RSI	<i>S. ac</i> RSL	0.048	Diferente	0.84	Igual
<i>S. cap</i> RSI	<i>S. cap</i> RSL	0.036	Diferente	0.009	Diferente

Se encontró que para BaA los porcentajes de remoción obtenidos al utilizar el RSI**50** son estadísticamente significativos comparados con los porcentajes obtenidos al utilizar el RSL**50**. Por lo tanto, se puede concluir que los porcentajes de remoción de BaA son mayores al utilizar el RSI**50**.

Para BaP, se encontró que los porcentajes de remoción obtenidos al utilizar el RSI**50** son estadísticamente significativos comparados con los porcentajes obtenidos al utilizar el RSL**50** sólo para los ensayos donde se utilizó la especie de microalgas *S. cap* y el control abiótico, siendo mayor el obtenido al utilizar el RSI**50**. Mientras que para los ensayos donde se utilizaron microalgas de la especie *S. ac* y la mezcla no existe evidencia significativa que demuestre que utilizar el RSI sea diferente a utilizar el RSL.

- c) En el estudio se encontró que los porcentajes de remoción mas elevados son los obtenidos por la especie de microalgas *S. capricornutum* en ambas configuraciones del reactor, seguidos de los ensayos que contienen la

mezcla de microalgas inmovilizadas, sin embargo, los porcentajes son muy diferentes de acuerdo al tipo de posición de la salida que se utiliza.

Se sabe que el tipo de agitación y la velocidad de mezclado influyen en los porcentajes de remoción de los hidrocarburos al utilizar diferentes tipos de sistemas (Loera Flores, 2017). No es una sorpresa que al analizar los resultados de esta sección fuera evidente que la posición sea una variable que influya en la mejora de los porcentajes de remoción al presentar modificaciones en la calidad de mezclado. Si bien las configuraciones se plantearon previendo cuestiones de diseño a mayor escala, ambos diseños presentan los mismos materiales (vaso de vidrio, malla de acero inoxidable y manguera de Viton las cuales pueden observarse en la Figura 3.15) se observa que los porcentajes de remoción para ambos hidrocarburos utilizando los dos tipos de salida son diferentes.

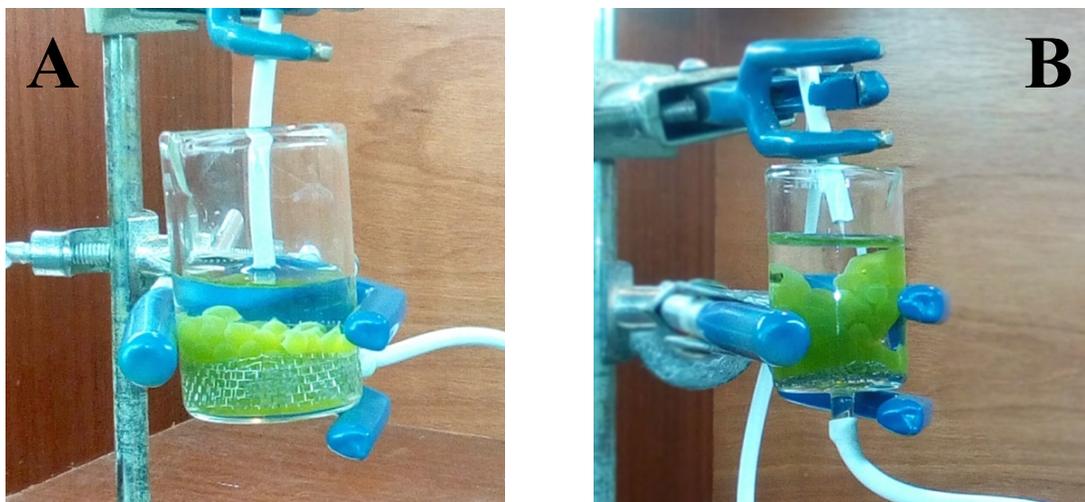


Figura 4.15 RSL y RSI de 50 mL En ella se observa el montaje de los reactores: A reactor de salida inferior. B reactor de salida inferior en él se considera tener un mezclado mas homogéneo por la caída del medio acuoso en la parte central y el paso de este para la recirculación promoviendo un mejor mezclado y agitación

En ambos reactores se produce la recirculación desde la parte inferior del reactor hacia la parte superior. Sin embargo, mientras en el RSI el medio acuoso es tomado desde la parte inferior central, en el caso del RSL la salida del fluido a la bomba se encuentra en la parte lateral lo que podría provocar un mezclado deficiente causando puntos de baja rotación del medio acuoso.

Si bien el estudio anterior presentó el reactor tipo tanque con agitación de salida inferior (RSI) como el óptimo al presentar la mayor remoción de ambos hidrocarburos, se planteó seguir analizando y no descartar el diseño alterno (RSL).

4.2.6. Estudio del flujo en las diferentes configuraciones de salida de recirculación

En este apartado se planteó utilizar flujos diferentes para observar si la remoción es dependiente de la velocidad de recirculación del flujo. De ser así, se puede conocer el flujo óptimo en el cual se presenta el mayor porcentaje de remoción de los hidrocarburos para el reactor con capacidad de 50 mL. Los resultados de este estudio son presentados en la Tabla 3.16 y de manera gráfica en la Figura 3.16; en ellos se evaluaron flujos de 1, 2 y 4 mL/min y se manejó la especie *S. capricornutum* sola

Tabla 4.16 Porcentajes de remoción obtenidos variando la especie de microalgas inmovilizada y velocidades de recirculación de flujo. Evaluados a 6 horas en los reactores RSI50 y RSL50

Porcentaje de remoción									
Flujo [mL/min]	Control abiótico RSI		<i>S. cap</i> RSI		Control abiótico RSL		<i>S. cap</i> RSL		
	B(a)A	B(a)P	B(a)A	B(a)P	B(a)A	B(a)P	B(a)A	B(a)P	
1	45 ± 2	50 ± 1	68 ± 3	64 ± 1	35 ± 5	23 ± 2	52 ± 7	53 ± 3	
2	45 ± 2	49 ± 5	55 ± 4	61 ± 2	39 ± 7	45 ± 0.5	55 ± 2	61 ± 3	
4	44 ± 6	48 ± 6	40 ± 2	43 ± 2	27 ± 3	37 ± 0.5	39 ± 7	39 ± 2	

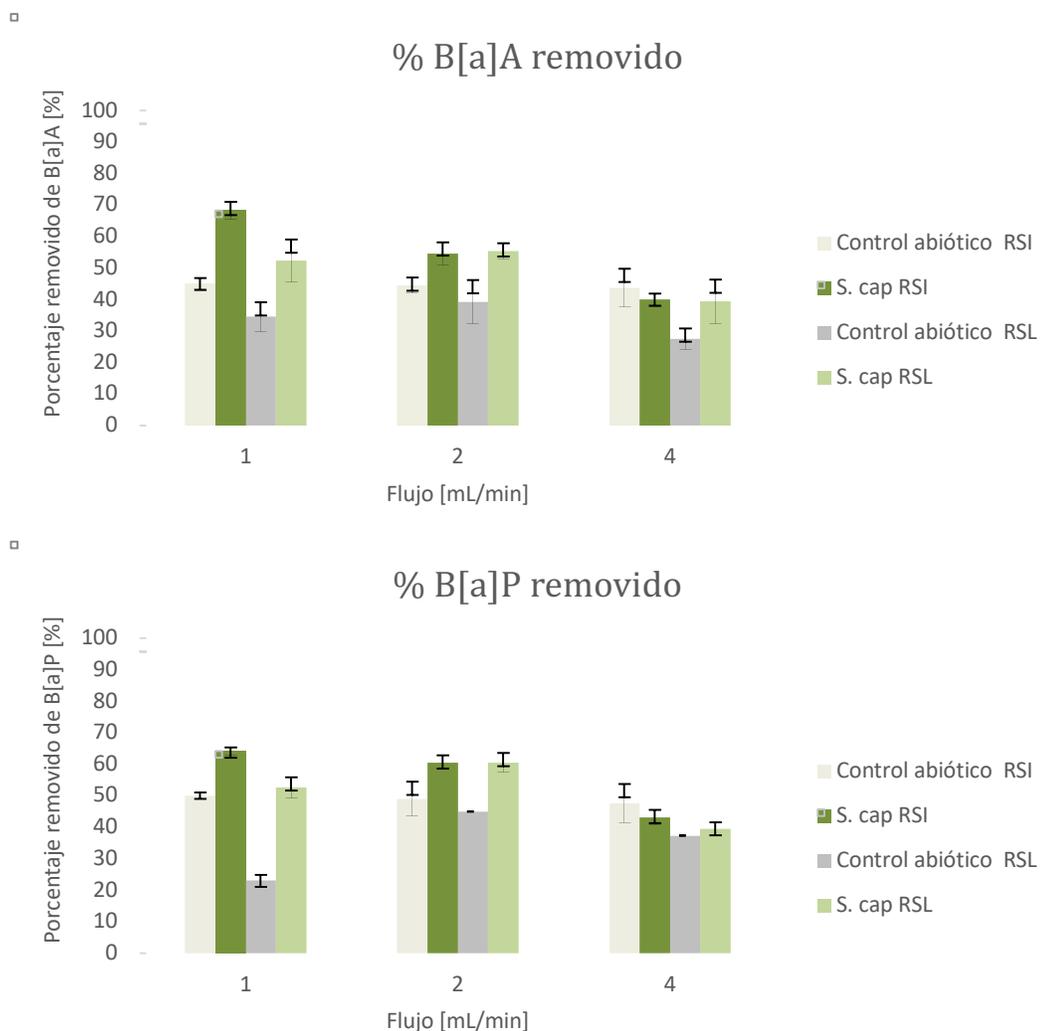


Figura 4.16 Porcentajes de remoción de BaA y BaP en RSI50. t=6 horas, utilizando microalgas inmobilizadas de la especie *S. capricornutum* modificando el flujo del reactor, volumen de muestra 15 mL. Concentración de HAPs 266 $\mu\text{g/L}$ (resultado promedio +/- desviación estándar, n=3).

De los resultados obtenidos puede apreciarse lo siguiente:

- a) Tanto para ensayos de 1 mL/min como 2 mL/min los porcentajes de remoción de ambos hidrocarburos en el RSI y RSL son mayores para los bioensayos comparados con sus respectivos controles abióticos. El cual puede deberse a una agitación y mezclado homogéneo de la muestra, además un tiempo óptimo de interacción que propicia la sorción de los hidrocarburos no sólo en el alginato, sino también una interacción con las microalgas contenidas en él.

- b) Para los ensayos con un flujo de 4 mL/min los porcentajes de remoción tanto para los controles abióticos como para los bioensayos presentan porcentajes de remoción bastante parecidos, esto puede ser atribuido a que el flujo de recirculación es muy alto, no permitiendo una adsorción de los hidrocarburos desde la superficie de las perlas hacia las microalgas en su interior para así promover la remoción. Se realizó una prueba t con un 95 % de confianza con el objetivo de comparar los porcentajes de remoción entre los bioensayos y su respectivo control. La información arrojada por las pruebas estadísticas confirma lo siguiente:

Al analizar el porcentaje de remoción entre los controles abióticos y los bioensayos para ambos hidrocarburos, puede corroborarse que para flujos de operación de 1 y 2 mL/min existen diferencias significativas ($p\text{-valor}_{BaA} < 0.032$ y $p\text{-valor}_{BaP} < 0.04$) es decir, el porcentaje de remoción al utilizar microalgas inmovilizadas es estadísticamente significativo al compararla con su respectivo control. Así mismo, no existe diferencia significativa al comparar la remoción entre los controles abióticos y los ensayos con *S. cap* con un flujo de recirculación de 4 mL/min en ambas configuraciones del reactor ($p\text{-valor}_{BaA} > 0.81$ y $p\text{-valor}_{BaP} > 0.040$)

- c) Para evaluar cuál de los flujos presenta los porcentajes de remoción más altos (1 o 2 mL/min), se contrastaron los resultados de cada hidrocarburo en ambas configuraciones mediante un análisis estadístico, prueba t al 95 % de confianza.

Para BaA, en RSI, se observó un porcentaje de remoción máximo al utilizar un flujo de 1 mL/min, el cual disminuye al incrementar el flujo. Mientras que para BaP no hay suficiente evidencia para demostrar que el porcentaje de remoción, al utilizar flujos de 1 y 2 mL/min, sea diferente en cuanto a la eficacia de remoción de BaP.

Para el RSL el porcentaje de remoción de BaA y BaP presenta un punto máximo al utilizar un flujo de 2 mL/min y un decaimiento en la remoción de ambos hidrocarburos conforme se incrementa o disminuye el flujo.

El tipo de agitación y por lo tanto de mezclado del medio acuoso es uno de los factores más importantes para promover la remoción de los hidrocarburos, un análisis de los porcentajes de remoción obtenidos tanto por la posición de la salida de recirculación del reactor, como por el flujo de recirculación demuestran la importancia de estas variables y que pueden en proporciones adecuadas aumentar o disminuir los porcentajes de remoción. Así mismo que altos flujos de recirculación, 4 mL/min para este caso, son flujos que no promueven una remoción en los ensayos con microalgas.

Si bien para RSI**50** los porcentajes de remoción tienen un punto máximo al utilizar 1 mL/min y el porcentaje disminuye al incrementarse el flujo, hasta un punto en el flujo 4 mL/min donde es equiparable con el Blanco, para el RSL**50** el porcentaje de remoción presenta un punto máximo al utilizar un flujo de 2 mL/min el cual disminuye si se aumenta o disminuye el flujo.

4.2.7. Estudio del incremento de volumen (similaridad de condiciones)

Al analizar los porcentajes de remoción de los ensayos anteriores, en los cuales se verificó que el porcentaje de remoción mas alto, para ambos HAPs, es el obtenido en el RSI con un flujo de 1 mL/min, se procedió a escalar el ensayo 1V mediante el principio de similaridad de los factores físicos que componen el sistema (tamaño, forma y composición). Para ello se utilizaron reactores, donde las condiciones de tamaño (volumen) y composición de los ensayos (número de perlas con microalgas, masa de hidrocarburo y masa de alginato) fueron extrapoladas 2:1.

En este punto se decidió evaluar la necesidad de incrementar de igual manera el flujo de recirculación, atendiendo la necesidad de propiciar las condiciones óptimas de agitación y recirculación, de esta forma mantener la homogeneidad en una

mezcla de mayor tamaño proporcionando al sistema un mayor flujo de recirculación para propiciar un alto porcentaje de remoción de los HAPs.

Siguiendo la metodología anterior del apartado 3.3.7 se observó que el flujo con el cual se obtuvieron los porcentajes de remoción más altos 1 mL/min en RSI50. Mientras que para RSL50 fue el obtenido en un flujo de 2 mL/min. Donde también observamos que flujos mayores resultaban en la disminución del porcentaje de remoción. Por lo cual se decidió evaluar los flujos de remoción 1 y 2 mL/min en los reactores de mayor capacidad RSI170 y RSL170 y un volumen de muestra de 30 mL (2V). La microalga seleccionada fue *S. capricornutum*.

La Figura 3.17 presenta el montaje de los reactores RSI170 y RSL170.

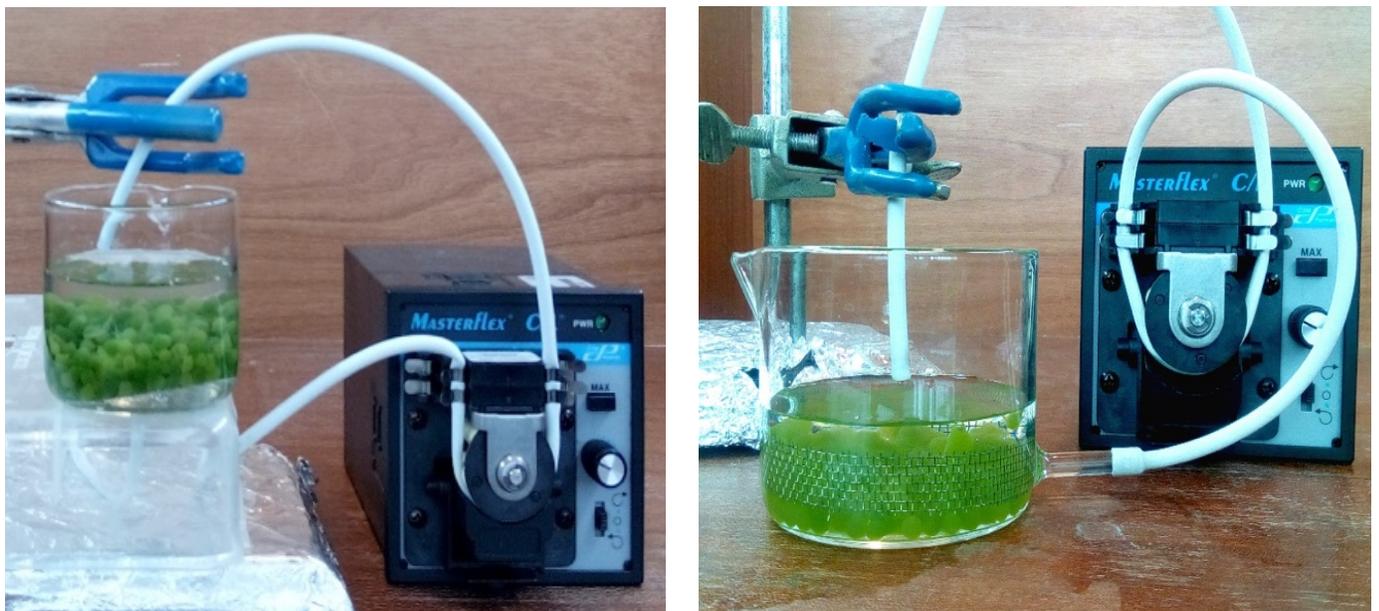


Figura 4.17 Reactores utilizados en el estudio del incremento de volumen RSI170 y RSL170. Reactores de vidrios con modificación para producir la recirculación del medio acuoso conectados mediante manguera Viton blanca a bombas peristálticas MasterFlex

En la Tabla 3.18 se muestran los porcentajes de HAPs removidos para RSI170(2V) y RSL170 (2V) y de manera gráfica en la Figura 3.18.

Tabla 4.17 Porcentajes de remoción de BaA y BaP para una muestra de 30 mL (2V) en RSI170 y RSL170 evaluando diferentes velocidades de recirculación

Flujo [mL/min]	Porcentaje de remoción							
	Control abiótico RSI		<i>S. cap</i> RSI		Control abiótico RSL		<i>S. cap</i> RSL	
	B(a)A	B(a)P	B(a)A	B(a)P	B(a)A	B(a)P	B(a)A	B(a)P
1	45 ± 6	47 ± 5	64 ± 2	65 ± 2	38 ± 5	36 ± 4	65 ± 1	66 ± 1
2	48 ± 4	37 ± 6	79 ± 4	67 ± 3	39 ± 6	42 ± 5	62 ± 0.3	60 ± 2

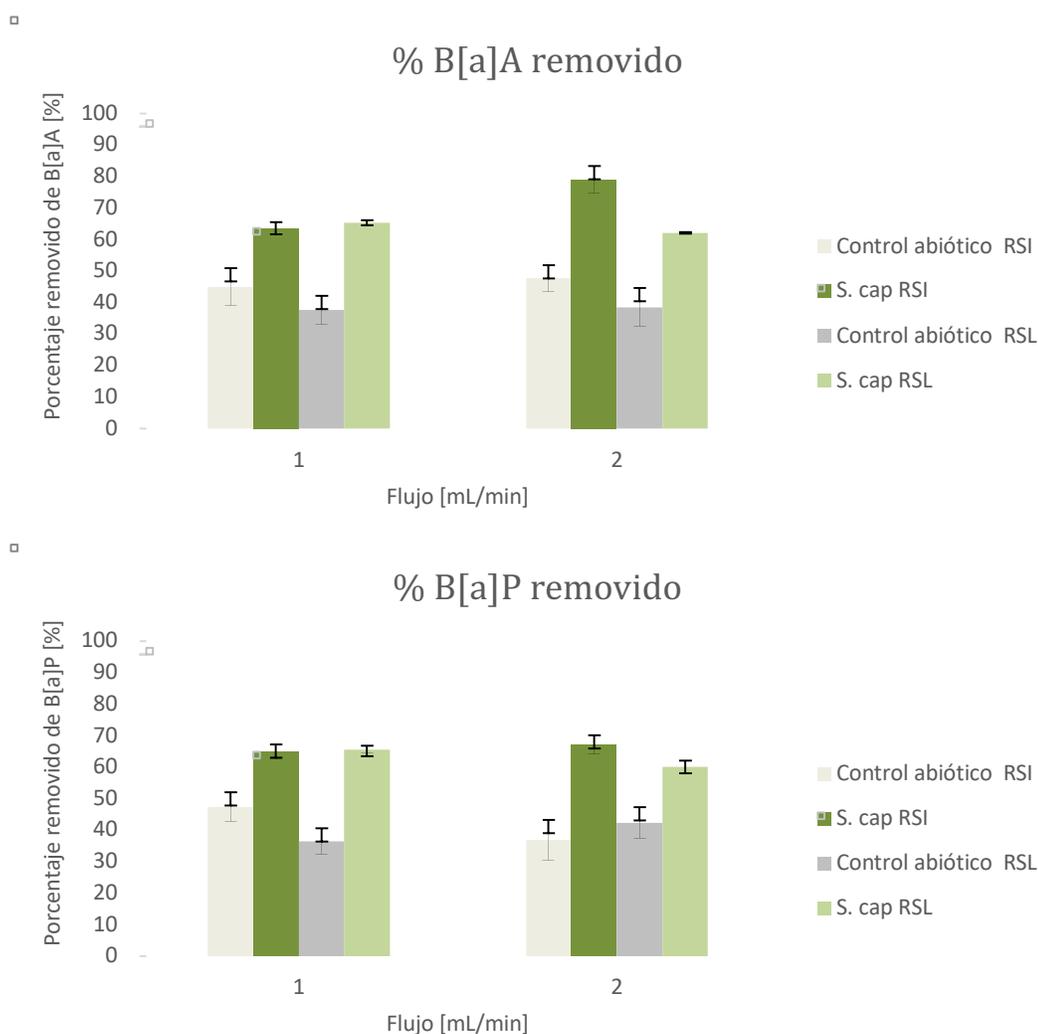


Figura 4.18 Porcentajes de remoción de BaA y BaP en RSI170 y RSL170. Muestra de 30 mL (2V), t=6 horas, utilizando microalgas inmovilizadas de la especie *S. capricornutum*. Concentración de HAPs 266 µg/L (resultado promedio +/- desviación estándar, n=3).

De los resultados anteriores podemos observar lo siguiente:

- a) La remoción de los HAPs de ambos hidrocarburos en los controles abióticos es baja, comparada con los bioensayos sin importar el flujo o tipo de reactor utilizado. Por lo tanto se presenta la biorremoción.
- b) Al utilizar los diferentes flujos en **RSI170** y **RSL170**, en ambas configuraciones, el porcentaje de remoción de BaA obtenido con el flujo de 2 mL/min es significativamente diferentes respecto al obtenido con el flujo de 1 mL/min con el RSI. Mientras que para BaP no existe suficiente evidencia para demostrar que los porcentajes de remoción entre los dos flujos sean diferentes con ambos tipos de reactores (**RSI170** $p\text{-valor}_{\text{BaA}} = 0.009$, $p\text{-valor}_{\text{BaP}} = 0.256$, **RSL170** $p\text{-valor}_{\text{BaA}} = 0.006$, $p\text{-valor}_{\text{BaP}} = 0.452$)
- c) Los porcentajes de remoción óptimos al comparar los dos tipos de reactor son: **RSI170** 2 mL/min y **RSL170** 1 mL/min, siendo el mayor obtenido al utilizar el **RSI170** con un flujo de recirculación de 2 mL/min

En el **apartado 3.3.6** se observó la relación que existe entre el flujo de recirculación y los porcentajes de remoción de los HAPs, mientras flujos bajos 1 o 2 mL/min proporcionaron altos porcentajes de remoción se encontró que flujos mayores provocan una disminución. Así mismo que un flujo de 1 mL/min proporciona el mayor porcentaje de remoción. Es por ello que al realizar el escalado del reactor al doble de la capacidad inicial, es decir 30 mL (2 x 15mL), se contempló utilizar flujos 1 y 2 mL/min y verificar si es necesario incrementar el flujo en las etapas de escalamiento.

En este análisis se encontró que tanto en RSI como en RSL los porcentajes de remoción son mayores al utilizar microalgas inmovilizadas que en los blancos. Así también se encontró que el **RSI170** es el que presenta los mayores porcentajes de remoción al utilizar un flujo de **2 mL/min** (79.1% BaA y 67.1% BaP), mientras que **RSL170** presenta en el flujo **1 mL/min** los mayores porcentajes de remoción (65.3% BaA y 65.6% BaP).

Se encontró que para promover una remoción óptima es necesario proveer al sistema un flujo de recirculación que incrementara junto con el volumen. Por lo que para posteriores escalamientos es importante incrementar en las mismas magnitudes las fuerzas de agitación a fin de proporcionar al sistema la similaridad mecánica, es decir proporcionar una agitación al sistema que permita la interacción entre los hidrocarburos y las perlas de alginato lo bastante rápida para proporcionar al sistema el mezclado y homogenización, pero sin provocar una baja remoción.

Si bien no se realizó un ensayo con un flujo de 3 mL/min basándonos en ensayos previos para RSI se esperaba tener el flujo óptimo en 2 mL/min y una disminución en los porcentajes de remoción al aumentar o disminuir el flujo. También se esperaba encontrar en 1 mL/min el flujo óptimo para RSL con disminuciones al incrementar el flujo.

4.2.8. Estudio aumento de volumen y flujo (escalamiento de 30 a 45 y 60 mL con flujos de 2, 3 y 4 mL/min respectivamente)

En este estudio se analizaron los porcentajes de remoción obtenidos al escalar el ensayo 1V a 2, 3 y 4 veces. En ellos, al igual que en el apartado anterior se conservó la similaridad en tamaño, forma y composición de los ensayos realizados. De esta manera se llevó el ensayo de 15 mL de muestra a: 30 mL, 45 mL y 60 mL manteniendo la forma y composición del reactor, pero incrementando el volumen de la muestra de 15 mL (1V) a: 30 mL (2V), 45 mL (3V) y 60 mL (4V). Dichos ensayos fueron evaluados en el RSI170 y RSL170. Con ello la cantidad de perlas, microgramos de hidrocarburos, flujo de recirculación y microalgas inmobilizadas de la especie *S. capricornutum*.

Los porcentajes de remoción resultado de este estudio son presentados a continuación en la Tabla 3.18 y de manera visual en la Figura 3.19.

Tabla 4.18 Porcentaje de remoción de BaA y BaP al escalar el volumen de muestra 1V. Evaluación de las posiciones de salida de recirculación. Tiempo 6 horas, flujos: 1V 1 mL/min, 2V 2 mL/min, 3V 3 mL/min y 4V 4 mL/min

VOLUMEN	Porcentaje de remoción							
	Control abiótico RSI		<i>S. cap</i> RSI		Control abiótico RSL		<i>S. cap</i> RSL	
	B(a)A	B(a)P	B(a)A	B(a)P	B(a)A	B(a)P	B(a)A	B(a)P
1V	45 ± 2	50 ± 1	68 ± 3	64 ± 1	35 ± 5	23 ± 2	52 ± 7	53 ± 3
2V	48 ± 4	37 ± 6	79 ± 4	67 ± 3	38 ± 5	36 ± 4	62 ± 0.3	60 ± 2
3V	53 ± 1	59 ± 3	91 ± 1	84 ± 1	46 ± 0.1	50 ± 0.1	90 ± 0.1	83 ± 0.1
4V	53 ± 2	58 ± 1	85 ± 1	75 ± 0.5				

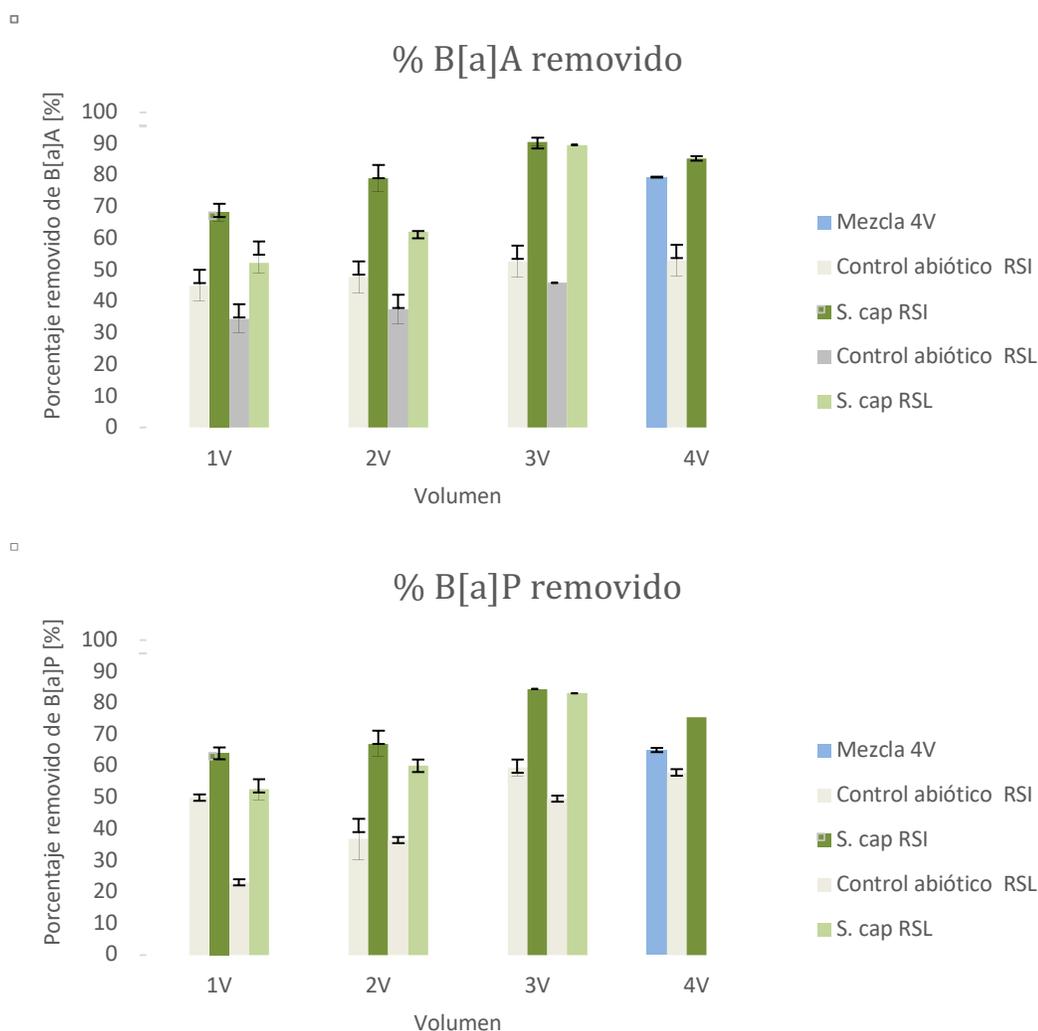


Figura 4.19 Porcentajes de remoción de BaA y BaP en RSI170 y RSL170, t=6 horas, utilizando microalgas inmobilizadas de la especie *S. capricornutum*. Aumento de volumen de muestra y flujo 1V=1mL/min; 2V=2mL/min; 3V=3mL/min;

4V=4mL/min. Concentración de HAPs 266 µg/L (resultado promedio +/- desviación estándar, n=3)

Donde podemos apreciar lo siguiente:

- a) El comportamiento de la remoción en los Blancos es menor al de los bioensayos tanto para RSI como para RSL. Sin embargo, en los ensayos 3V y 4V se encontró que la remoción de los controles abióticos presenta un incremento que, aunque poco considerable, sigue manteniéndose menor a la remoción en los bioensayos. Por lo tanto, aun cuando se distingue la biorremoción de la remoción por sorción del alginato, se considera conveniente disminuir la cantidad de alginato en ensayos de mayor volumen.
- b) En los ensayos realizados, el máximo porcentaje de remoción es obtenido cuando se utilizó el RSI, comparado con el diseño alternativo RSL. Lo cual se puede apreciar en el ensayo 3V.
- c) En ambos reactores RSI y RSL se observa que la remoción incrementa al incrementar el volumen del reactor con 1V, 2V y 3V, en ensayos de 6 horas, mientras que para 4V en RSI, se presentó una disminución, que si bien no es drástica, indica que el tiempo de operación debería optimizarse para mantener la remoción.

4.2.8.1 Comparación de la remoción con el volumen de muestra 4V (S. *capricornutum* y una mezcla de perlas de las especies S. *capricornutum* y S. *acutus* con el RSI)

En este estudio se mantuvo la similaridad entre el ensayo de 4V (60 mL en RSI170) con la especie *Selenastrum capricornutum* y se comparó con un ensayo que contiene una mezcla de perlas de alginato de las especies S. *capricornutum* y S. *acutus* en una proporción 50:50. Los porcentajes de remoción de BaA con la mezcla de especies fueron de 79.5 ± 0.30 y para BaP 65.1 ± 1.37 y con S. *capricornutum* sola fue de 85.4 ± 0.7 para BaA y 75.5 ± 0.5 para BaP. Estos datos no se muestran en la Tabla 26, pero si se incluyen en la Figura 3.19.

De los resultados anteriores podemos observar lo siguiente:

- d) El porcentaje de remoción en el ensayo utilizando la especie *Selenastrum capricornutum* para ambos hidrocarburos es mayor comparado con el ensayo en el que se utiliza la mezcla de especies. Lo anterior es similar a lo que sucede en los reactores más pequeños. Se demuestra una mayor remoción por la especie *Selenastrum capricornutum* sola que en mezcla con *S. acutus*. El porcentaje de remoción obtenido al utilizar la mezcla sigue siendo mayor al obtenido con el control abiótico, demostrándose la biorremoción.

De lo anterior, podemos apreciar lo siguiente: La remoción utilizando microalgas inmovilizadas en la perlas de alginato siempre es superior comparada con los Blancos. Sin embargo, se recomienda la disminución del alginato a fin de propiciar una mayor remoción por las microalgas, que se diferencia de la remoción por sorción al alginato. Al igual que en los ensayos anteriores, la remoción utilizando el RSI es superior al RSL. En el ensayo 4V se observó una disminución en la tendencia de remoción de ambos HAPs mostrando que en volúmenes mayores es necesario el incrementar el tiempo de exposición a fin de permitir la interacción entre las perlas de alginato y el medio para promover la remoción.

Dada la gran cantidad de biomasa necesaria para efectuar ensayos, se consideró la viabilidad de utilizar una mezcla al 50% de *S. cap* y *S. ac.*, aun cuando su capacidad de remoción fuera un poco menor comparada con la utilización de *S. cap* sola; dado que el crecimiento de la especie *S. acutus* es más rápido y productivo en biomasa. En los bioensayos se observó que si bien el porcentaje de remoción de la mezcla comparado con un ensayo utilizando la especie *S. cap* es menor, presenta porcentajes de remoción superiores a los Blancos por lo que la mezcla es eficiente en la remoción de BaA y BaP.

4.2.9. Implementación de un ensayo en un reactor RSI4000 con volumen de muestra de 2,880 mL

Para este fin, se analizaron los porcentajes de remoción obtenidos en los diferentes ensayos y se seleccionaron los parámetros operacionales óptimos. Escalando el proceso a un volumen mayor, casi 200 veces que el bioensayo original con 15 mL de muestra. Se cuidó de mantener la similaridad de los procesos en cuanto a geometría, composición y forma. Para ello se decidió trabajar en el RSI por sus altos porcentajes de remoción, comparado con los obtenidos con RSL, extrapolando cuarenta veces los valores óptimos encontrados en el ensayo 4V efectuado en RSI170.

Del análisis de remoción mediante el uso de *Selenastrum capricornutum*, *Scenedesmus acutus* y la mezcla de ambas especies inmovilizadas por separado, se consideraron los siguientes puntos para la implementación del reactor RSI4000:

1. Flujo de recirculación: dadas las dimensiones del medio acuoso que era necesario mover, se consideró el utilizar un flujo equivalente al volumen escalado, 160 mL/min para lo cual era necesario trabajar con bombas de mayores dimensiones. Dadas las limitantes del equipo de trabajo, se decidió utilizar dos bombas peristálticas para producir un flujo en conjunto de 40 mL/min (20 mL/min cada una) adaptadas a la salida del reactor mediante una "T" de vidrio
2. Tiempo de exposición: se decidió incrementar el tiempo de exposición del ensayo en la misma escala es decir a 240 horas (10 días), permitiendo la mezcla y homogenización del medio. Al mismo tiempo, también propició un mayor tiempo de contacto entre las perlas de alginato y el medio acuoso. Se decidió evaluar en dos tiempos diferentes, 96 y 240 horas, los porcentajes de remoción tanto del medio líquido, como en las perlas de alginato (alginato y biomasa)

3. La viabilidad de utilizar la mezcla de especies. Si bien, en todos los casos los ensayos con perlas de alginato que contienen a la especie *S. capricornutum* fueron los que presentaron los mayores porcentajes de hidrocarburos removidos, seguido por la mezcla y finalmente por las perlas de alginato con la especie *S. acutus*, se optó por utilizar la mezcla por la cantidad de biomasa necesaria para efectuar un ensayo de estas dimensiones. Además de obtener un porcentaje de remoción estadísticamente parecido al obtenido por *S. cap* en tiempos largos
4. Volumen de alginato: el uso de una cantidad tan alta de perlas presenta una desventaja para nuestro sistema, por la adsorción por parte del alginato, es por ello que se plantearon dos alternativas:
 - I. Utilizar la cantidad total de perlas de alginato necesarias es decir 90 perlas por cada 15 mL de muestra de agua de la llave con la concentración de microalgas por perla utilizada hasta ahora, $7.50E+05$ células/perla
 - II. Utilizar la mitad de este número de perlas, manteniendo constante la cantidad total de microalgas, pero aumentando al doble su concentración en las perlas de alginato. Es decir $1.50E+06$ células/perla, este segundo sistema presenta antecedentes de remoción altos según lo obtenido en el grupo de trabajo (León-Santiago2016, Baca-Ibañez 2019)

Con el objetivo de disminuir el porcentaje de remoción obtenido por el alginato se decidió utilizar la propuesta dos. En la Tabla 3.19 se presentan las propuestas planteadas para el reactor así como una imagen de la puesta en marcha del reactor **RSI4000**, en la Figura 3.20.

Tabla 4.19 Propuestas para la implementación del reactor de 4,000 mL

Variable	4V	1V60 (4V*40veces)	
		Propuesta 1	Propuesta 2
Número de perlas Totales	360	14,400	7,200
<i>Perlas con la especie S. capricornutum</i>	360	7,200	3,600
<i>Células por perla</i>	7.50E+05	7.50E+05	1.50E+06
<i>Células totales</i>	2.70E+08	1.08E+10	1.08E+10
<i>Perlas con la especie S. acutus</i>	No aplica	7200	3600
<i>Células por perla</i>	2.70E+05	2.70E+05	1.33E+06
<i>Células totales</i>	2.38E+08	9.5E+09	9.5E+09
<i>Volumen de muestra (mL)</i>	60	2,880	2,880
<i>Volumen de alginato 3% (mL)</i>	16	700	370
<i>Flujo (mL/min)</i>	4	40	40
<i>Tiempo (horas)</i>	6	240	240
<i>Masa de hidrocarburo (µg)</i>	16	640	640

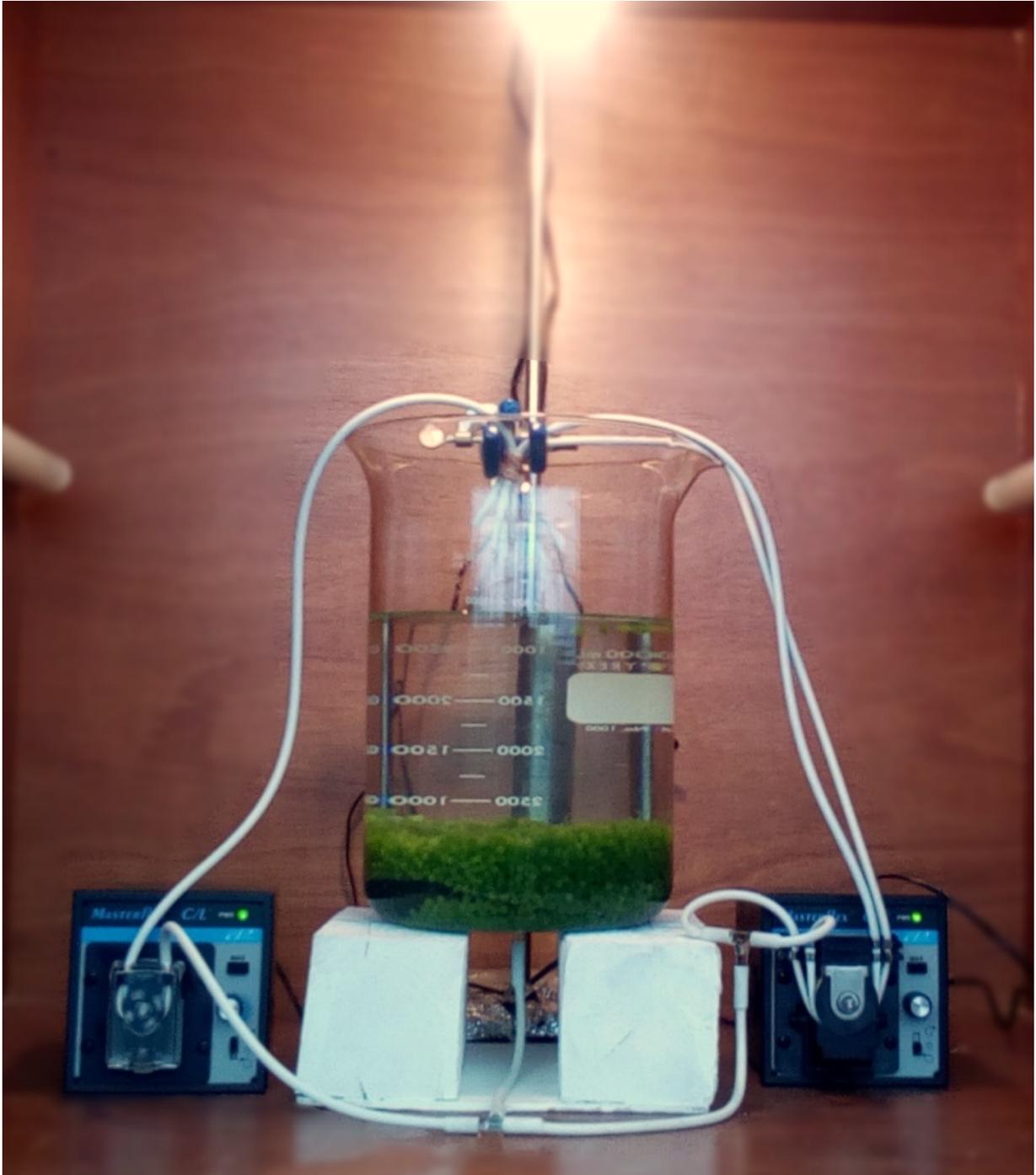


Figura 4.20 Puesta en marcha del reactor de salida inferior de 4,000 mL con adaptación de salida inferior a dos bombas peristálticas MasterFlex

A continuación, se presentan gráficamente los resultados de remoción en el medio acuoso del reactor de cuatro litros para BaA y BaP en 96 y 240 horas en la Figura

3.21. El volumen de muestra fue de 2,800 mL para no llenar hasta el borde del reactor.

Los resultados del promedio de remoción para BaA y BaP en el reactor tipo tanque de salida inferior para el medio acuoso se consideró cercano a 100%, debido a que la cantidad presente de BaA y BaP en 240 horas se encontraron por debajo del límite de cuantificación, sin embargo el valor es tan pequeño que el porcentaje de remoción.

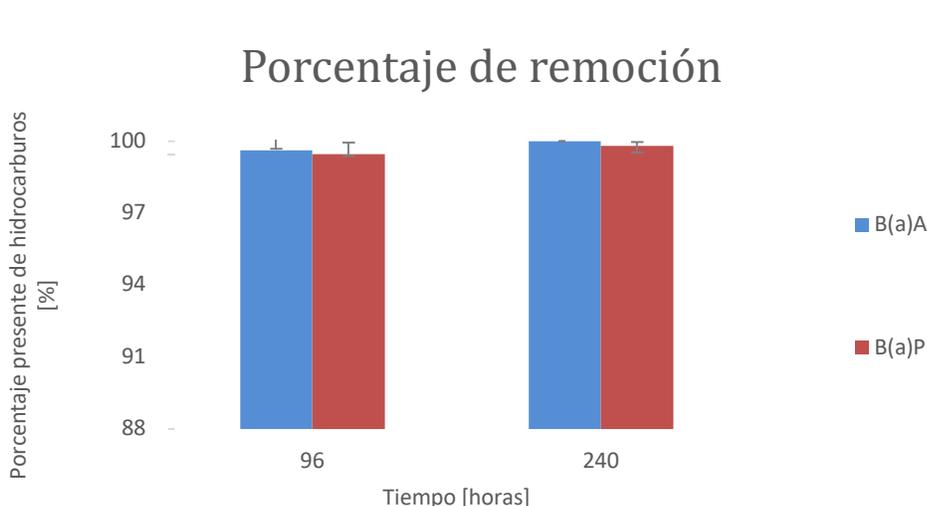


Figura 4.21 Porcentajes de remoción de BaA y BaP RSI4000 a 96 y 240 horas utilizando microalgas inmobilizadas de las especies *S. capricornutum* y *S. acutus* en perlas de alginato de calcio. Volumen de muestra 2 880 mL, concentración de HAPs 266 µg/L

Los resultados aportados por la Figura 3.21 presentaron altos niveles de remoción de los hidrocarburos desde las 96 horas. Los ensayos en escalas menores nos permitieron observar que tiempos de 6 horas son suficientes para la remoción de los HAPs del medio acuoso. Además se conoce del poder de remoción de ambas especies en tiempos de 72 horas, por lo que en 96 horas la remoción es superior al 99%.

Para verificar la biorremoción de los HAPs y diferenciarla de la remoción por sorción al alginato, se analizó por separado la concentración de estos en el alginato disuelto de las perlas y en la biomasa una vez que fue liberada. Estos análisis fueron

efectuados mediante la metodología descrita en el **apartado 2.3.1.3 y 2.3.1.4** sus resultados se describen en la sección siguiente.

4.2.9.1 Análisis HAPs del alginato, la biomasa y la muestra acuosa en el reactor de RSI4000 con 2,880 mL de muestra

En la Tabla 3.20 y la Figura 3.22 se muestran los porcentajes remanentes de ambos HAPs en los diferentes compartimientos de la muestra: medio acuoso, alginato y biomasa presentes en el reactor de 4,000 mL. Para su análisis se tomaron alícuotas de medio acuoso y esferas de alginato y se calculó el remanente total mediante un balance de materia.

Tabla 4.20 Porcentajes remanentes de hidrocarburos en RSI4000, n=3

Tiempo [horas]	Porcentaje remanente											
	Medio Líquido				Alginato				Biomasa			
	BaA		BaP		BaA		BaP		BaA	BaP		
0	100 ±	100 ±	100 ±	100 ±	100 ±	100 ±	100 ±	100 ±	100 ±	100 ±		
96	2.3 ±	0.6 ±	3.2 ±	0.5 ±	5.5 ±	0.4 ±	5.8 ±	0.1 ±	22.8 ±	1.1 ±	15.8 ±	0.2 ±
240	0.0 ±	0.0 ±	1.1 ±	0.2 ±	1.4 ±	0.6 ±	1.5 ±	0.2 ±	8.7 ±	3.4 ±	4.6 ±	2.2 ±

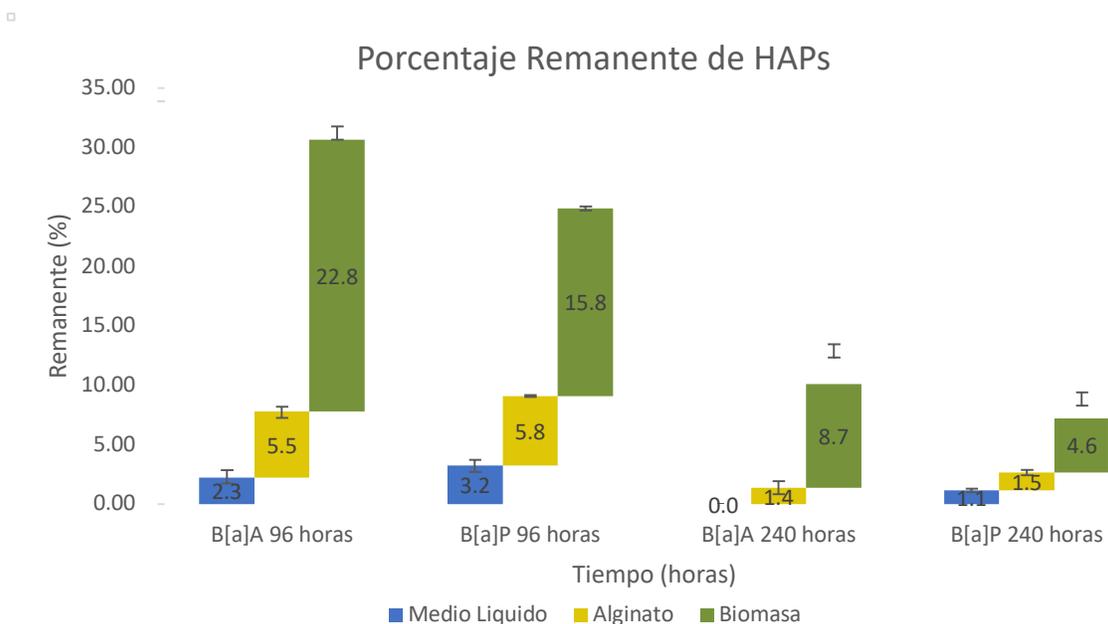


Figura 4.22 Porcentaje remanente de BaA y BaP en las diferentes fases de la muestra en el RS4000. Tiempo 96 y 240 horas, utilizando mezcla de microalgas inmovilizadas de las especies *S. capricornutum* y *S. acutus* en cuentas de alginato de calcio

Se observa lo siguiente:

En el medio acuoso:

Dado que el porcentaje de remanente en el medio acuoso es muy bajo en todos los casos, el porcentaje de remoción de ambos hidrocarburos es alto en los dos tiempos analizados, 96 y 240 horas, aunque menor para el BaP en comparación con el BaA, que es más hidrófobo lo cual provoca una mayor resistencia a su remoción y mayor sorción.

Los porcentajes de remoción a 96 horas son de 95 % y 94% para BaA y BaP respectivamente, los porcentajes de remoción a 240 horas son de 99% para ambos HAPs. La remoción parece estar completa a las 240 horas por la baja presencia de los HAPs en el medio. Sin embargo, aún existe una cantidad de los hidrocarburos en la biomasa y el alginato que componen las perlas siendo mayor el remanente en la biomasa los dos casos son discutidos a continuación.

Por otra parte, para calcular la masa total de HAPs contenida en el volumen de muestra total del reactor (2,880 mL), una vez obtenida la masa de HAPs contenida en la muestra de 15 mL de medio acuoso del reactor, se calculó el remanente total mediante la siguiente relación:

$$\left(\frac{\mu g \text{ de HAPs}_{muestra}}{vol. muestra EFS} \right) * vol. total reactor = \left(\frac{\mu g \text{ de HAPs}_{muestra}}{15 mL} \right) * 2,880 mL$$
$$= \mu g_{medio líquido totales}$$

En las perlas de alginato con microalgas:

Dado el bajo porcentaje remanente de los HAPs en el medio acuoso se utilizó la metodología de DMFS-CLAR-UV mencionada en el apartado **2.3.1.4** para cuantificar los hidrocarburos presentes en la biomasa, pero también en el alginato que las contenía, Este último se manejó disuelto, por el método de EFS-CLAR-UV reportado en el **apartado 2.3.1.3**. Por lo que en este ensayo se apreció no sólo la remoción de los HAPs del medio acuoso, sino también se cuantificó el porcentaje

remanente en el alginato y la biomasa en los diferentes tiempos. La determinación de las cantidades de los HAPs en la biomasa permitió calcular indirectamente la degradación de BaA y BaP de acuerdo a la siguiente relación , la cual es usada en los estudios de degradación en cultivos acuosos con microorganismos libres.

$$\%degradación = \frac{\mu g_{iniciales} - \mu g_{remanentes\ totales}}{\mu g_{iniciales}} * 100$$

donde:

$$\mu g_{remanentes\ totales} = \mu g_{medio\ líquido} + \mu g_{biomasa}$$

Sin embargo debido a que en este caso se maneja a las microalgas inmovilizadas y existe cierta cantidad de HAPs sorbida en el alginato. La relación anterior se modifica considerando que los μg remanentes totales también incluyen la cantidad sorbida en el alginato.

Para las perlas de alginato se dividió en dos partes, dado que se utilizaron microalgas de ambas especies se analizó el remanente para el alginato proveniente de 90 perlas y se extrapoló el total de acuerdo al número de perlas de alginato totales con la relación:

$$\begin{aligned} & \left(\frac{\mu g\ de\ HAPs_{muestra\ de\ alginato\ disuelto}}{perlas\ de\ alginato\ de\ la\ muestra} \right) * perlas\ totales\ en\ el\ reactor \\ & = \left(\frac{\mu g\ de\ HAPs_{muestra\ de\ alginato\ disuelto}}{90\ perlas} \right) * 7200perlas = \mu g_{alginato} \end{aligned}$$

Muestra 2 alginato de sodio.

$$\begin{aligned} & \left(\frac{\mu g\ de\ HAPs_{muestra\ de\ biomasa}}{\mu g\ de\ HAPs_{contenidos\ biomasa\ de\ 90\ perlas}} \right) * perlas\ totales\ en\ el\ reactor \\ & = \left(\frac{\mu g\ de\ HAPs_{muestra\ de\ biomasa}}{\mu g\ de\ HAPs_{contenidos\ biomasa\ de\ 90\ perlas}} \right) * 7200perlas = \mu g_{biomasa} \end{aligned}$$

En la Tabla 3.20 y la Figura 3.22, puede observarse que el remanente de ambos hidrocarburos en el alginato es parecido, cercano a 5% a 96 horas y a 1 % a 240

horas. En este caso dado que sólo es una sorción pasiva de los HAPs en el alginato, no se observa una diferencia entre ambos HAPs. Lo que es muy interesante observar es que se aprecia una disminución conforme pasa el tiempo, lo que evidencia una captación de los HAPs por parte de las microalgas, por lo que en tiempos mayores de exposición las microalgas van reduciendo el remanente contenido en el alginato. Este fenómeno es muy positivo para implementar un proceso de biorremediación con este reactor, ya que aunque inicialmente el alginato sorbe una cantidad de los HAPs, está no se mantiene en el, si no que tiende a desaparecer con el tiempo gracias a su captación por las microalgas.

Por otra parte, en la biomasa (microalgas) se observa que el porcentaje de BaA presente, tanto a 96 como a 240 horas, es mayor que el porcentaje de BaP, lo cual evidencia una mayor facilidad de adsorción comparativamente hablando.

Lo que también es muy positivo es que la disminución del remanente de los HAPs en la biomasa conforme aumenta el tiempo de exposición, es una clara evidencia de la biodegradación. Encontrando que a 96 horas el porcentaje de degradación es 69% de BaA y 74 % de BaP mientras que a 240 horas es de 90% para BaA y 92% para BaP. Así, se demuestra que la biomasa no es acumuladora de HAPs.

En todos los casos, se aprecia una disminución en el remanente conforme pasa el tiempo, con lo cual se puede observar no sólo la remoción de los HAPs del medio acuoso sino también una degradación de estos por las microalgas.

Los resultados obtenidos en el reactor de 4,000 mL fueron muy favorables al remover los HAPs contenidos en mas de un 90 % en 240 horas. Sin embargo, se debe mencionar que durante su implementación surgieron algunos inconvenientes, por lo que es recomendable considerarlos para tener un proceso con mayor eficiencia. Entre ellos se encuentran:

Previo a su implementación: la construcción del reactor de acuerdo a las limitantes del taller de vidrio de la Facultad, los cuales solo permiten modificar material existente, como el caso del vaso de precipitado. La obtención del flujo necesario

para promover la agitación, en la cual se requería una bomba mas grande y/o potente.

La obtención de la biomasa necesaria, la inmovilización de grandes cantidades de medios de cultivo, para lo que se requeriría un encapsulador industrial.

La necesidad de preparar asépticamente el reactor previo a su uso.

Durante su implementación: frotamiento del alginato y su consecuente disolución en el medio acuoso por el taponamiento y trituración en las tuberías, el desgaste de las tuberías de recirculación, taponamiento de estas y una posible contaminación durante un tiempo de funcionamiento mayor del reactor.

Atendiendo lo anterior podríamos plantear como perspectivas el uso de equipos automatizados para la inmovilización de las microalgas así como el uso de equipos de nivel operativo específico (bombas, tuberías y el reactor mismo) para los volúmenes de muestra tratados, esto desde el punto de vista operativo.

Mientras en los inconvenientes aludidos a las microalgas se plantean como perspectivas, en primer lugar la resistencia de las perlas de alginato utilizando una matriz inmovilizadora mejorada u optimizar la resistencia del alginato de calcio. La segunda es la implementación de redes de contención de las perlas de alginato con materiales poco adsorbentes que puedan evitar el taponamiento de las tuberías de recirculación permitiendo un flujo continuo de la muestra, y una extracción más simple de las microalgas inmovilizadas, del medio acuoso.

Conclusiones

La implementación de materiales menos adsorbentes al BaA y BaP como lo son la tubería de Viton, así como vidrio y malla de acero demostraron tener una baja adsorción a BaA y BaP, por lo que resultaron materiales aptos para trabajar con ellos en un biorreactor con recirculación. Por lo tanto, el análisis de los materiales de construcción del biorreactor fue fundamental para realizar una transferencia del proceso de agitación orbital a agitación mediante recirculación, el cual es más práctico de operar y construir.

La determinación de los porcentajes de remoción de HAPs mediante las microalgas inmovilizadas demostró que tanto biorreactores con agitación orbital como biorreactores tipo tanque con agitación mediante recirculación presentan altos porcentajes de remoción de los HAPs en medio acuoso (98 ± 0.4 y 94 ± 2 para BaA y BaP respectivamente con agitación orbital y 68 ± 3 y 64 ± 1 para BaA y BaP respectivamente con agitación mediante recirculación), evidenciando que la agitación es un factor determinante en la remoción mediante la cual se puede promover una homogenización en el medio al propiciar la difusión de los HAPs desde el medio a las microalgas inmovilizadas y por consiguiente la remoción.

La posición de la salida en el biorreactor con recirculación influyó en el porcentaje de remoción de los HAPs estudiados. Comparativamente se demostró que los porcentajes de remoción entre un reactor con salida inferior (RSI) son superiores a los obtenidos con un reactor con salida lateral (RSL).

Realizando estudios del principio de similaridad al considerar los parámetros óptimos encontrados de tiempo de exposición y flujo de recirculación se obtuvieron factores a nivel laboratorio para realizar el escalamiento e implementación del biorreactor tipo tanque con capacidad de cuatro litros. Demostrando la importancia de incrementar tanto la composición del medio (volumen de medio acuoso y cantidad de HAPs presentes) así como el tamaño del biorreactor y número de esferas de alginato con microalgas inmovilizadas .

Así mismo, se confirmó que para mantener porcentajes de remoción altos es necesario incrementar la velocidad del flujo de recirculación que en él proporciona la agitación en la misma escala, con el objetivo de proporcionar condiciones equivalentes a escalas menores y así promover la agitación y con ello la remoción.

La evaluación de la eficiencia de remoción con los reactores pequeños RSI50 y RSI170, proporcionó herramientas necesarias para realizar un acercamiento en la implementación de un biorreactor con un volumen de 4,000 mL. Dado el volumen de muestra acuosa y la capacidad de los equipos utilizados, se decidió modificar el tiempo de exposición de horas a 10 días, con el fin de proporcionar una mayor interacción de los HAPs y las microalgas inmovilizadas. En él se encontró que el sistema desde el día 4 presenta altos porcentajes de remoción de ambos HAPs en el medio acuoso y una remoción de más del 98% de ambos hidrocarburos en el día 10.

Para complementar los resultados anteriores se analizó el remanente de los HAPs en las perlas de alginato y la biomasa utilizados en el biorreactor de 4,000 mL. Se observó que los hidrocarburos se encontraban presentes en ambas fases, pero en mayor medida en la biomasa, evidenciando su capacidad de sorción a los HAPs. La evaluación de estos remanentes en diferentes tiempos nos permitió observar indirectamente la degradación de BaA y BaP por la disminución de estos y una capacidad de captación de los HAPs contenidos en el alginato por las microalgas.

Perspectivas

- Implementar una técnica automatizada para la inmovilización de las microalgas en perlas de alginato en el tratamiento de un mayor volumen de medio acuoso.
- Evaluar el efecto de equipos de nivel operativo específico para el reactor de 4 000 mL de capacidad, en particular las bombas peristálticas, dimensiones de la tuberías red de contención de perlas de alginato.
- Evaluar una manera de introducir y retirar las microalgas a sitios contaminados (pensando en la transferencia de tecnología no sólo a plantas

de tratamiento, sino a lugares al exterior) mediante redes de contención de las perlas de alginato en materiales poco adsorbentes que pudieran ser introducidos para la remoción de los HAPs.

Referencias

- Aizenshtat, Z., Baedecker, M. J., y Kaplan, I. R. (1973). Distribution and diagenesis of organic compounds in joides sediment from gulf of Mexico and western Atlantic. *Geochimica et Cosmochimica*, 37(8), 1881-1898.
- Anaya Durand, A., y Pedroza Flores, H. (2008). Escalamiento, el arte de la ingeniería química: Plantas piloto, el paso entre el huevo y la gallina. *Tecnología, Ciencia, Educación*, 23, 31-39.
- Baasel, W. D. (1990). *Preliminary Chemical Engineering Plant Design* Nueva York, EEUU. *Van Nostrand Reinhold*, 9-21.
- Baca Ibañez, A. (2019). *Remoción de Benzo[a]pireno y Benzo[a]antraceno del agua potable por Selenastrum capricornutum y Scenedesmus acutus contenidas en discos de alginato*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Behymer, T. D., y Hites R. A. (1988). Photolysis of polycyclic aromatic hydrocarbons adsorbed on fly ash. *Environ. Sci. Technol.*, 22: 1311-1319.
- Bernal Toris, D. N. (2015). *Evaluación de la capacidad de Selenastrum capricornutum inmovilizada en alginato para remover Benzo[a]pireno de medio de cultivo acuoso*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Bisio, A., y Kabel, R. (1985). *Scale up of chemical processes: conversion from laboratory scale test to sucessful commercial size design*. New York: John Wiley and Sons Inc, 365-368.
- Blanco Álvarez, J., y Linarte Lazcano, R. (1978). *Diseño de reactores químicos*. México, Trillas, 13-18.
- Bourcereau, L. (2010). Accumulation des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) dans les sediments de la rivière doubs. Rapport de l'Université de Franche-Comté.

- Camel, V. (2003). Solid phase extraction of trace elements. Review. *Spectrochimica Acta*, Part B 58, 1177-1233.
- Casablanco, F. G., y Santin, J. L. (1998). Ingeniería Bioquímica. Madrid: Síntesis S.A.
- Cerniglia, C. E. (1993). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Current opinion in biotechnology*, 4(3), 331-338.
- Chahin, A. (2010). *Bioindicateurs Métaboliques de l'exposition des Ruminants Laitiers aux Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP): Domaines Scientifiques: Biochimie, Métabolisme des Xénobiotiques, Biologie Animale*. Thèse de Doctorat. Institut National Polytechnique de Lorraine.
- Chen, H. C., y Hu, Y. C. (2006). Bioreactors for tissue engineering. *Biotechnology letters*, 28(18), 1415-1423.
- EPA, Environmental Protection Agency. (2013). Office of Solid Waste and Emergency Response. Washington, DC 20460
- Faham, L. (2013). Techniques de traitement in situ des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques dans les eaux de surface. These Université de Sherbrooke.
- García de Llasera, M. P., y García Cicourel, A. R. (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, 584-592.
- García de Llasera, M. P., León Santiago, M., Loera Flores, E. J., Bernal Toris D. N., y Covarrubias Herrera, M. R. (2018). Mini-bioreactors with immobilized microalgae for the removal of benzo[a]anthracene and benzo[a]pyrene from water. *Ecological Engineering*, 10.
- García de Llasera, M. P., Olmos Espejel, J.J., Díaz Flores, G., y 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(4), 3365-3375.

Ghosal, D., Ghosh, S., Dutta, T. K., y Ahn, Y. (2016). Current state of knowledge in microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Frontiers in microbiology*, 7, 1369.

González Castellanos, R. A. (2000). PRINCIPIOS BÁSICOS DE ESCALADO. Universitaria del Ministerio de Educación Superior de la República de Cuba, Cuba.

Grova, N., Feidt, C., Laurent, C., y Rychen, G., (2002). [14C] Milk, urine and faeces excretion kinetics in lactating goats after an oral administration of 14C polycyclic aromatic hydrocarbons *International Dairy Journal* 12, 1025-1031.

Guamán Bumeo, M. C., y González Romero, N. P. (2016). *Catálogo de microalgas y cianobacterias de agua dulce del Ecuador: biodiversidad de los principales géneros de microalgas y cianobacterias encontradas en sistemas lacustres de áreas protegidas de los Andes y Amazonía del Ecuador*. Ecuador.

Gündel, J., Mannschreck, C., Büttner, K., Ewers, U., y Angerer, J. (1996). Urinary levels of 1-Hidroxypyrene, 1-, 2-, 3-, and 4-Hidroxyphenanthrene in females living in a industrial area of Germany. *Environmental contamination and Toxicology*.

Hennion, M. C. (1999). Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 856(1-2), 3–54.

Hofrichter, M., Vares, T., Kalsi, M., Galkin, S., Scheibner, K., Fritsche, W., y Hatakka, A. (1999). Production of manganese peroxidase and organic acids and mineralization of 14C-labelled lignin (14C-DHP) during solid-state fermentation of wheat straw with the white rot fungus *Nematoloma frowardii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(5), 1864-1870.

Hong, Y. W., Yuan, D. X., Lin, Q. M., y Yang, T. L. (2008). Accumulation and biodegradation of phenanthrene and fluoranthene by the algae enriched from a mangrove aquatic ecosystem. *Marine Pollution Bulletin*, 56(8), 1400-1405.

- Huynh, C. K., Duc, T. V., Deygout, F., Le Coutaller, P., y Surmont, F. (2007). Identification and quantification of PAH in bitumen by GC-ion-trap MS and HPLC-fluorescent detectors. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 27(2), 107-121
- IARC, Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer. (1983). Monographs on the Evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, vol. 32, Lyon, France, 33-91.
- JOCE (2004). *Commission directive 2004/73/ec of 29 april 2004 adapting to technical progress for the 29th time council directive 67/548/eec on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances*. Official Journal of the European Communities. L216: 308.
- Karel, S. F., Libicki, S. B., y Robertson, C. R. (1985). The immobilization of whole cells: engineering principles. *Chemical Engineering Science*, 40(8), 1321-1354.
- Kossen, N. (1994). Advances in bioprocesses engineering. *De Scale-Up*, Holanda, 53-65.
- Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., Banat, I. M., Marchant, R., y Koutinas, A. A. (2004). Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food microbiology*, 21(4), 377-397.
- Laflamme, R. E., y Hites, R. A. (1978). The global distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in recent sediments. *Geochimica et cosmochimica Acta*, 42(3), 289-303.
- Lawal, A. T. (2017). Polycyclic aromatic hydrocarbons. A review. *Cogent Environmental Science*, 3(1), 1339841.
- Lee, R. F., Sauerheber, R., y Benson, A. A. (1972). Petroleum hydrocarbons: uptake and discharge by the marine mussel *Mytilus edulis*. *Science*, 177(4046), 344-346.
- Lei, A. P., Hu, Z. L., Wong, Y. S., y Tam, N. F. Y. (2007). Removal of fluoranthene and pyrene by different microalgal species. *Bioresource technology*, 98(2), 273-280.

- León Santiago, M. (2016). Bioremoción de contaminantes orgánicos de medio acuoso con sistemas algales. Tesis Maestría en Ciencias Químicas. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Levenspiel, O. (1962) "Ingeniería de las reacciones químicas" 3a ed. México, D.F.
- Loera Flores, J. E. (2017). Biorremoción de hidrocarburos aromáticos policíclicos en agua mediante microalgas inmovilizadas en un reactor no continuo: etapa experimental a pequeña escala. Tesis Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Mackay, D., Shiu, W.Y., Ma, K.C., y Lee S. C. (1992). *Illustrated handbook of physical-chemical properties and environmental fate for organic chemicals: Polynuclear aromatic hydrocarbons, polychlorinated dioxins and dibenzofurans*. Lewis Publishers, Chelsea, Michigan, USA.
- Mallick, N. (2002). Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: a review. *Biometals*, 15(4), 377-390.
- Manoli, E., y Samara, C. (1996). Polycyclic aromatic hydrocarbons in waste waters and sewage sludge: extraction and clean-up for HPLC analysis with fluorescence detection. *Chromatographia*, 43(3-4), 135-142.
- Marcé, R. M., y Borrull, F. (2000). Solid-phase extraction of polycyclic aromatic compounds. *Journal of chromatography A*, 885(1-2), 273-290.
- Mastandrea, C., Chichizola, C., Ludueña, B., Sánchez, H., Álvarez, H., y Gutiérrez, A. (2005). Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Riesgos para la salud y marcadores biológicos. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 39(1), 27-36.
- McElroy, A. E., y Sisson, J. D. (1989). Trophic transfer of benzo [a] pyrene metabolites between benthic marine organisms. *Marine environmental research*, 28(1-4), 265-269.

- Menichini, E., Monfredini, F., y Merli, F. (1999). The temporal variability of the profile of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in urban air: a study in a medium traffic area in Rome, 1993–1998. *Atmospheric Environment*, 33(23), 3739-3750.
- Mi, H. H., Lee, W. J., Tsai, P. J., y Chen, C. B. (2001). A comparison on the emission of polycyclic aromatic hydrocarbons and their corresponding carcinogenic potencies from a vehicle engine using leaded and lead-free gasoline. *Environmental health perspectives*, 109(12), 1285–1290. doi:10.1289/ehp.011091285.
- Montaño Montiel, A. (2013). *Remoción de hidrocarburos aromáticos policíclicos en medio acuoso por Scenedesmus acutus*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Neff, J. M. (1979). *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment. Sources, Fates and Biological Effects*. A lied Science Publishers Ltd., Essex, England, p. 262.
- NOM-138-SEMARNAT/SS-2003. Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y las especificaciones para su caracterización y remediación.
- Noüe, J., y Proulx, D. (1988). Tertiary treatment of urban wastewaters by chitosan-immobilized Phormidium sp. *Algal biotechnology*/edited by T. Stadler [et al.].
- Olmos Espejel, J. J., García de Llasera, M. P., y Velasco-Cruz, M. (2012). Extraction and analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons and benzo [a] pyrene metabolites in microalgae cultures by off-line/on-line methodology based on matrix solid-phase dispersion, solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1262, 138-147.
- OSHA, Occupational Safety and Health Administration. (1997). Coal Tar Pitch Volatiles (CTPV) Coke Oven Emissions (COE) Selected Polynuclear Aromatic Hydrocarbons (PAH's) Recuperado de <https://www.osha.gov/chemicaldata/chemresult.html?Reano=380>.
- Richmond, A. (1986). Technological aspects of mass cultivation – A general outline. In: Richmond A, ed. *Hand-book of Microalgal Mass Culture*. Boca Raton: CRC Press

Inc.,245–263. Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology.

Sharma, H., Jain, V. K., y Khan Zahid, H., (2008). Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the urban air of Delhi during 2003. *Environ. Monit. Assess.* 147, 43–55.

Singh, J., Kaushik, N., y Biswas, S. (2014). Bioreactors–technology & design analysis. *The Scitech Journal*, 1, 28-36.

Slooff, W., Janus, J.A., Matthijsen, A. J. C. M., Montizaan, G. K. y Ros J. P. M. (1989). “Integrated Criteria Document PAHs”, National Institute of Public Health and Environmental Protection (RIVM)., Buthoven, Netherlands, Report.

Soriano Sanz, J. A. (2009). “Evaluación y seguimiento del contenido en hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) en mejillón silvestre de la costa de Galicia y Cantábrico, antes y después del vertido del B/T Prestige”. Tesis de Doctorado Universidade da Coruña.

Spier, M. R., Vandenberghe, L. P. D. S., Pedroni Medeiros, A. B., y Soccol, C. R. (2011). Application of different types of bioreactors in bioprocesses. *Bioreactors: Design, Properties and Applications; Nova Science Publishers: Hauppauge, NY, USA*, 53-87.

Snyder, L. R., Kirkland, J. J. y Dolan, J. W. (1979). Introduction to modern liquid chromatography. Recuperado de https://www.academia.edu/27327048/INTRODUCTION_TO_MODERN_LIQUID_CHROMATOGRAPHY).

Tampion, J. y Tampion, M. D. (1987). Immobilized cells, principles and applications Cambridge Studies in Biotechnology 5, Cambridge University Press. Cambridge,

Velasco, Cruz, M. (2011). *Metodología analítica cromatográfica para la determinación de metabolitos de hidrocarburos aromáticos policíclicos en cultivos de microalgas*. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.

- Wakeham, S. G., Schaffner, C., y Giger, W. (1980). Polycyclic aromatic hydrocarbons in recent lake sediments-I. Compounds having anthropogenic origins. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 44(3), 44, 415-429.
- Warshawsky, D., Keenan, T., Reilman, R., Cody T. E., y Radike, M. (1990). Conjugation of Benzo[a]pyrene metabolites by freshwater green alga *Selenastrum capricornutum*. *Chem-Biol Interactions*, 74, 93-105.
- WHO, Organización Mundial de Salud. (1998). Polynuclear aromatic hydrocarbons in Drinking-water Guidelines for drinking-water quality, 2nd ed. Addendum to Vol. 2. Health criteria and other suorting information. World Health Organization, Geneva.
- Wilson S. C., y Jones K. C. (1992) Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Enviromental Pollution*. P 229-249.
- Wise, S. A., Sander, L. C. y May, W. E. (2018). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 642(1-2), 329-349.
- Żwir-Ferenc, A. y Biziuk, M. (2006). Solid Phase Extraction Technique - Trends, Opportunities and Applications. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15(5), 677-690.

Anexo 1

A continuación se presenta el análisis estadístico de los ensayos realizados mediante Software SPSS15.0 (alfa de 0.05).

Análisis estadístico de la sección 4.2.1 Ensayos con agitación orbital

Pruebas de normalidad

Hipótesis para la prueba de normalidad

H₀: La distribución se asemeja a la normal.

H₁: La distribución no se asemeja a la normal.

	BaA		BaP	
	valor p	Shapiro-Wilk	valor p	Shapiro-Wilk
Orbital Control abiotico3h	0.125	Distribución normal	0.542	Distribución normal
Orbital Control abiótico 6h	0.223	Distribución normal	0.037	Distribución no Normal
Orbital Bioensayo3h	0.239	Distribución normal	0.433	Distribución normal
Orbital Bioensayo6h	0.525	Distribución normal	0.811	Distribución normal

Se trabaja con un alfa de 0.05

Una vez evaluada la prueba de normalidad, primera condición necesaria para realizar la prueba t, se evaluó la igualdad de varianza, segunda condición necesaria para realizar la prueba t.

Prueba de igualdad de varianza

Hipótesis para la prueba de igualdad de varianza

H₀: Las varianzas son iguales

H₁: Las varianzas no son iguales

	BaA		BaP	
	Valor-p	Estadístico de Levene	Valor-p	Estadístico de Levene
Orbital Control abiótico 3h Orbital Control abiótico 6h	0.071	Varianzas iguales	NA	Na
Orbital Bioensayo 3h Orbital Bioensayo 6h	0.053	Varianzas iguales	0.707	Varianzas iguales
Orbital Control abiótico 3h Orbital Bioensayo 3h	0.022	Varianzas diferentes	NA	Na
Orbital Control abiótico 6h Orbital Bioensayo 6h	0.053	Varianzas iguales	0.104	Varianzas iguales

Prueba t de student

Hipótesis para la prueba de igualdad de medias de remoción

H_0 : Existe diferencia entre las medias de remoción

H_1 : No existe diferencia entre las medias de remoción

	BaA		BaP	
	Valor p	Prueba t	Valor p	Prueba t
Orbital Control abiótico 3h vs Orbital Control abiótico 6h	0.876	Muestras estadísticamente Iguales	NA	NA
Orbital Bioensayo 3h vs Orbital Bioensayo 6h	0.001	Muestras estadísticamente diferentes	0.0003	Muestras estadísticamente diferentes
Orbital Control abiótico 3h vs Orbital Bioensayo 3h	0.002	Muestras estadísticamente diferentes	0.014	Muestras estadísticamente diferentes
Orbital Control abiótico 6h vs Orbital Bioensayo 6h	0.00015	Muestras estadísticamente diferentes	0.003	Muestras estadísticamente diferentes

Análisis estadístico de la sección 4.2.2 Remoción abiótica en RSI50

Pruebas de normalidad

Hipótesis para la prueba de normalidad

H_0 : La distribución se asemeja a la normal.

H_1 : La distribución no se asemeja a la normal.

	BaA		BaP	
	valor p	Shapiro-Wilk	valor p	Shapiro-Wilk
Orbital Blanco L. amarilla 3h	0.101	Distribución normal	0.251	Distribución normal
Orbital Blanco L. amarilla 6h	0.413	Distribución normal	0.426	Distribución normal
Orbital Blanco L. amarilla 24h	0.456	Distribución normal	0.547	Distribución normal
Orbital Blanco L. blanca 3h	0.906	Distribución normal	0.978	Distribución normal
Orbital Blanco L. blanca 6h	0.259	Distribución normal	0.372	Distribución normal
Orbital Blanco L. blanca 24h	0.993	Distribución normal	0.451	Distribución normal

Una vez evaluada la prueba de normalidad, primera condición necesaria para realizar la prueba t, se evaluó la igualdad de varianza, segunda condición necesaria para realizar la prueba t.

Prueba de igualdad de varianza

Hipótesis para la prueba de igualdad de varianza

H₀: Las varianzas son iguales

H₁: Las varianzas no son iguales

	BaA		BaP	
	Valor-p	Estadístico de Levene	Valor-p	Estadístico de Levene
luz amarilla 3h luz natural 3h	0.877	Varianzas iguales	0.117	Varianzas iguales
luz amarilla 6h luz natural 6h	0.96	Varianzas iguales	0.789	Varianzas iguales
luz amarilla 24h luz amarilla 24h	0.052	Varianzas iguales	0.741	Varianzas iguales

Prueba t de student

Hipótesis para la prueba de igualdad de medias de remoción

H₀: Existe diferencia entre las medias de remoción

H₁: No existe diferencia entre las medias de remoción

	BaA		BaP	
	Valor p	Prueba t	Valor p	Prueba t
luz amarilla 3h luz natural 3h	0.028	Muestras estadísticamente diferentes	0.519	Muestras estadísticamente Iguales
luz amarilla 6h luz natural 6h	0.007	Muestras estadísticamente diferentes	0.001	Muestras estadísticamente diferentes
luz amarilla 24h luz natural 24h	0.00043	Muestras estadísticamente diferentes	0.052	Muestras estadísticamente Iguales

Criterio de aprobación p-valor \geq 0.05.

Prueba ANOVA

Hipótesis para la prueba de igualdad de medias de remoción

H₀: Existe diferencia entre las medias de remoción

H₁: No existe diferencia entre las medias de remoción

ANOVA	BaA		BaP	
	Valor p	Conclusión	Valor p	Conclusión
luz amarilla 3h- luz amarilla 6h	0.208	Muestras estadísticamente Iguales	0.131	Muestras estadísticamente Iguales
luz amarilla 3h- luz amarilla 24h	0.013	Muestras estadísticamente diferentes	0.135	Muestras estadísticamente Iguales
luz amarilla 6h- luz amarilla 24h	0.129	Muestras estadísticamente Iguales	1	Muestras estadísticamente Iguales
luz natural 3h- luz natural 6h	0.002	Muestras estadísticamente diferentes	0.001	Muestras estadísticamente diferentes
luz natural 3h- luz natural 24h	0.000296	Muestras estadísticamente diferentes	0.002	Muestras estadísticamente diferentes
luz natural 6h- luz natural 24h	0.08	Muestras estadísticamente Iguales	0.696	Muestras estadísticamente Iguales

Análisis estadístico de la sección 4.2.3 Estudio de remoción por *Selenastrum capricornutum* inmovilizada

Pruebas de normalidad

Hipótesis para la prueba de normalidad

H₀: La distribución se asemeja a la normal.

H₁: La distribución no se asemeja a la normal.

	BaA		BaP	
	valor p	Shapiro-Wilk	valor p	Shapiro-Wilk
C.abiótico 3h	0.249	Distribución normal	0.503	Distribución normal
C.abiótico 6h	0.982	Distribución normal	0.352	Distribución normal
C.abiótico 15h	0.569	Distribución normal	0.787	Distribución normal
Bioensayo 3h	0.471	Distribución normal	0.657	Distribución normal
Bioensayo 6h	0.625	Distribución normal	0.918	Distribución normal
Bioensayo 15h	0.388	Distribución normal	0.325	Distribución normal

Una vez evaluada la prueba de normalidad, primera condición necesaria para realizar la prueba t, se evaluó la igualdad de varianza, segunda condición necesaria para realizar la prueba t.

Prueba de igualdad de varianza

Hipótesis para la prueba de igualdad de varianza

H₀: Las varianzas son iguales

H₁: Las varianzas no son iguales

	BaA		BaP	
	Valor-p	Estadístico de Levene	Valor-p	Estadístico de Levene
C.abiótico 3h Bioensayo 3h	0.482	Varianzas Iguales	0.522	Varianzas Iguales
C.abiótico 6h Bioensayo 6h	0.423	Varianzas Iguales	0.994	Varianzas Iguales
C.abiótico 15h Bioensayo 15h	0.383	Varianzas Iguales	0.191	Varianzas Iguales

Prueba t de student

Hipótesis para la prueba de igualdad de medias de remoción

H₀: Existe diferencia entre las medias de remoción

H₁: No existe diferencia entre las medias de remoción

	BaA		BaP	
	Valor p	Prueba t	Valor p	Prueba t
C.abiótico 3h Bioensayo 3h	0.198	Muestras estadísticamente Iguales	0.151	Muestras estadísticamente Iguales
C.abiótico 6h Bioensayo 6h	0.001	Muestras estadísticamente diferentes	0.0001	Muestras estadísticamente diferentes
C.abiótico 15h Bioensayo 15h	0.00043	Muestras estadísticamente diferentes	0.024	Muestras estadísticamente diferentes

Prueba ANOVA

Hipótesis para la prueba de igualdad de medias de remoción

H₀: Existe diferencia entre las medias de remoción

H₁: No existe diferencia entre las medias de remoción

Conclusión	BaA		BaP	
	Valor p	Conclusión	Valor p	Conclusión
C.abiótico 3h- C.abiótico 6h	0.975	Muestras estadísticamente Iguales	0.835	Muestras estadísticamente Iguales
C.abiótico 3h- C.abiótico 15h	0.206	Muestras estadísticamente Iguales	0.709	Muestras estadísticamente Iguales
C.abiótico 6h- C.abiótico 15h	0.269	Muestras estadísticamente Iguales	0.401	Muestras estadísticamente Iguales
Bioensayo 3h-Bioensayo 6h	0.002	Muestras estadísticamente diferentes	0.027	Muestras estadísticamente diferentes
Bioensayo 3h-Bioensayo 15h	0.003	Muestras estadísticamente diferentes	0.018	Muestras estadísticamente diferentes
Bioensayo 6h-Bioensayo 15h	0.875	Muestras estadísticamente Iguales	0.923	Muestras estadísticamente Iguales

Análisis estadístico de la sección 4.2.4 Estudio de la remoción con dos especies de microalgas inmovilizadas *S. cap* y *S. ac*

Pruebas de normalidad

Hipótesis para la prueba de normalidad

H_0 : La distribución se asemeja a la normal.

H_1 : La distribución no se asemeja a la normal.

	BaA		BaP	
	valor p	Shapiro-Wilk	valor p	Shapiro-Wilk
C.abiótico 6h	0.982	Distribución normal	0.352	Distribución normal
C.abiótico 15h	0.316	Distribución normal	0.787	Distribución normal
Mezcla 6h	0.625	Distribución normal	0.918	Distribución normal
Mezcla 15h	0.388	Distribución normal	0.325	Distribución normal
<i>S. ac</i> 6h	0.824	Distribución normal	0.898	Distribución normal
<i>S. ac</i> 15h	0.223	Distribución normal	0.155	Distribución normal
<i>S. cap</i> 6h	0.998	Distribución normal	0.948	Distribución normal
<i>S. cap</i> 6h	0.969	Distribución normal	0.611	Distribución normal

Una vez evaluada la prueba de normalidad, primera condición necesaria para realizar la prueba t, se evaluó la igualdad de varianza, segunda condición necesaria para realizar la prueba t.

Prueba de igualdad de varianza

Hipótesis para la prueba de igualdad de varianza

H₀: Las varianzas son iguales

H₁: Las varianzas no son iguales

	BaA		BaP	
	Valor-p	Estadístico de Levene	Valor p	Estadístico de Levene
C.abiótico 6h- C.abiótico 15 h	0.713	Varianzas iguales	0.102	Varianzas iguales
<i>S. cap</i> 6h- <i>S. cap</i> 15 h	0.252	Varianzas iguales	0.13	Varianzas iguales
<i>S. ac</i> 6h- <i>S. ac</i> 15 h	0.37	Varianzas iguales	0.99	Varianzas iguales
Mezcla 6h-Mezcla 15 h	0.243	Varianzas iguales	0.05	Varianzas iguales

Prueba t de student

Hipótesis para la prueba de igualdad de medias de remoción

H₀: Existe diferencia entre las medias de remoción

H₁: No existe diferencia entre las medias de remoción

	BaA		BaP	
	Valor p	Prueba t	Valor p	Prueba t
C.abiótico 6h- C.abiótico 15 h	0.102	Muestras estadísticamente Iguales	0.262	Muestras estadísticamente Iguales
<i>S. cap</i> 6h- <i>S. cap</i> 15 h	0.529	Muestras estadísticamente Iguales	0.647	Muestras estadísticamente Iguales
<i>S. ac</i> 6h- <i>S. ac</i> 15 h	0.398	Muestras estadísticamente Iguales	0.016	Muestras estadísticamente Diferentes
Mezcla 6h-Mezcla 15 h	0.005	Muestras estadísticamente diferentes	0.804	Muestras estadísticamente Iguales

Prueba ANOVA

Hipótesis para la prueba de igualdad de medias de remoción

H₀: Existe diferencia entre las medias de remoción

H₁: No existe diferencia entre las medias de remoción

Muestras		Tiempo (horas)	B[a]A		B[a]P	
			valor-p	Conclusión	valor-p	Conclusión
C.abiótico	<i>S. ac</i>	6	0.098	Muestras estadísticamente Iguales	0.007	Muestras estadísticamente diferentes
	mezcla		0.038	Muestras estadísticamente diferentes	0.001	Muestras estadísticamente diferentes
	<i>S. cap</i>		0.000	Muestras estadísticamente diferentes	0	Muestras estadísticamente diferentes
	<i>S. ac</i>	15	0.344	Muestras estadísticamente Iguales	0.201	Muestras estadísticamente Iguales
	mezcla		0.035	Muestras estadísticamente diferentes	0.013	Muestras estadísticamente diferentes
	<i>S. cap</i>		0.01	Muestras estadísticamente diferentes	0.00	Muestras estadísticamente diferentes
mezcla	<i>S. ac</i>	6	0.906	Muestras estadísticamente Iguales	0	Muestras estadísticamente diferentes
	<i>S. cap</i>		0.000	Muestras estadísticamente diferentes	0	Muestras estadísticamente diferentes
	<i>S. ac</i>	15	0.05	Muestras estadísticamente diferentes	0.004	Muestras estadísticamente diferentes
	<i>S. cap</i>		0.019	Muestras estadísticamente diferentes	0.015	Muestras estadísticamente diferentes
<i>S. ac</i>	<i>S. cap</i>	6	0.000	Muestras estadísticamente diferentes	0	Muestras estadísticamente diferentes
		15	0.105	Muestras estadísticamente Iguales	0.159	Muestras estadísticamente Iguales

Análisis estadístico de la sección 4.2.5 Estudio de la posición de salida del reactor

Pruebas de normalidad

Hipótesis para la prueba de normalidad

H₀: La distribución se asemeja a la normal.

H₁: La distribución no se asemeja a la normal.

	BaA		BaP	
	valor p	Shapiro-Wilk	valor p	Shapiro-Wilk
C.abiótico 6h	0.982	Distribución normal	0.352	Distribución normal
Mezcla 6h	0.998	Distribución normal	0.948	Distribución normal
<i>S. ac</i> 6h	0.824	Distribución normal	0.898	Distribución normal
<i>S. cap</i> 6h	0.625	Distribución normal	0.918	Distribución normal

Una vez evaluada la prueba de normalidad, primera condición necesaria para realizar la prueba t, se evaluó la igualdad de varianza, segunda condición necesaria para realizar la prueba t.

Prueba de igualdad de varianza

Hipótesis para la prueba de igualdad de varianza

H_0 : Las varianzas son iguales

H_1 : Las varianzas no son iguales

	BaA		BaP	
	Valor-p	Estadístico de Levene	Valor -p	Estadístico de Levene
C.abiótico RSI- C.abiótico RSL	0.032	Muestras estadísticamente diferentes	0	Muestras estadísticamente diferentes
mezcla RSI- mezcla RSL	0.017	Muestras estadísticamente diferentes	0.117	Muestras estadísticamente Iguales
<i>S. ac</i> RSI- <i>S. ac</i> RSL	0.048	Muestras estadísticamente diferentes	0.84	Muestras estadísticamente Iguales
<i>S. cap</i> RSI- <i>S. cap</i> RSL	0.036	Muestras estadísticamente diferentes	0.009	Muestras estadísticamente diferentes

Prueba ANOVA

Hipótesis para la prueba de igualdad de medias de remoción

H_0 : Existe diferencia entre las medias de remoción

H_1 : No existe diferencia entre las medias de remoción

		B[a]A		B[a]P	
		p-Valor	conclusión	p-Valor	conclusión
C.abiótico RSI	<i>S. ac</i> RSI	0.098	Muestras estadísticamente Iguales	0.007	Muestras estadísticamente diferentes
	mezcla RSI	0.038	Muestras estadísticamente diferentes	0.001	Muestras estadísticamente diferentes
	<i>S. cap</i> RSI	0	Muestras estadísticamente diferentes	0	Muestras estadísticamente diferentes
C.abiótico RSL	<i>S. ac</i> RSL	0.9	Muestras estadísticamente Iguales	0.012	Muestras estadísticamente diferentes
	mezcla RSL	0.765	Muestras estadísticamente Iguales	0.045	Muestras estadísticamente diferentes
	<i>S. cap</i> RSL	0.043	Muestras estadísticamente diferentes	0.002	Muestras estadísticamente diferentes

Análisis estadístico de la sección 4.2.6 Estudio del flujo en las diferentes configuraciones de salida de recirculación

Pruebas de normalidad

Hipótesis para la prueba de normalidad

H₀: La distribución se asemeja a la normal.

H₁: La distribución no se asemeja a la normal.

	BaA		BaP	
	valor p	Shapiro-Wilk	valor p	Shapiro-Wilk
C.abiótico 1mL/min RSI	0.982	Distribución normal	0.352	Distribución normal
C.abiótico 2mL/min RSI	0.002	Distribución no Normal	0.648	Distribución normal
C.abiótico 4mL/min RSI	0.637	Distribución normal	0	Distribución no Normal
<i>S. cap</i> 1mL/min RSI	0.625	Distribución normal	0.918	Distribución normal
<i>S. cap</i> 2mL/min RSI	0.884	Distribución normal	0.842	Distribución normal
<i>S. cap</i> 4mL/min RSI	0.895	Distribución normal	0.341	Distribución normal
C.abiótico 1mL/min RSL	0.999	Distribución normal	0.672	Distribución normal
C.abiótico 2mL/min RSL	0.999	Distribución normal	0.999	Distribución normal

C.abiótico 4mL/min RSL	0.923	Distribución normal	0.025	Distribución no Normal
<i>S. cap</i> 1mL/min RSL	0.923	Distribución normal	0.099	Distribución normal
<i>S. cap</i> 2mL/min RSL	0.862	Distribución normal	0.351	Distribución normal
<i>S. cap</i> 4mL/min RSL	0.95	Distribución normal	0.702	Distribución normal

Se trabaja con un alfa de 0.05

Criterio de aprobación p-valor \geq 0.05.

Prueba t de student

Hipótesis para la prueba de igualdad de medias de remoción

H₀: Existe diferencia entre las medias de remoción

H₁: No existe diferencia entre las medias de remoción

Muestras comparadas	Flujo [mL/min]	BaA		BaP	
		Valor p	Prueba t	Valor p	Prueba t
C.abiótico RSI vs <i>S. cap</i> RSI	1	0.001	Muestras estadísticamente diferentes	<0.0001	Muestras estadísticamente diferentes
C.abiótico RSL vs <i>S. cap</i> RSL		0.032	Muestras estadísticamente diferentes	0.0002	Muestras estadísticamente diferentes
C.abiótico RSI vs <i>S. cap</i> RSI	2	0.029	Muestras estadísticamente diferentes	0.004	Muestras estadísticamente diferentes
C.abiótico RSL vs <i>S. cap</i> RSL		0.004	Muestras estadísticamente diferentes	0.04	Muestras estadísticamente diferentes
C.abiótico RSI vs <i>S. cap</i> RSI	4	0.454	Muestras estadísticamente Iguales	0.407	Muestras estadísticamente Iguales
C.abiótico RSL vs <i>S. cap</i> RSL		0.081	Muestras estadísticamente Iguales	0.52	Muestras estadísticamente Iguales

Análisis estadístico de la sección 4.2.7 Estudio del incremento de volumen (similaridad de condiciones)

Pruebas de normalidad

Hipótesis para la prueba de normalidad

H₀: La distribución se asemeja a la normal.

H₁: La distribución no se asemeja a la normal.

	BaA		BaP	
	valor p	Shapiro-Wilk	valor p	Shapiro-Wilk
C.abiótico RSI 1 mL/min	0.191	Distribución normal	0.253	Distribución normal
<i>S. cap</i> RSI 1 mL/min	0.817	Distribución normal	0.135	Distribución normal
C.abiótico RSI 2 mL/min	0.403	Distribución normal	0.474	Distribución normal
<i>S. cap</i> RSI 2 mL/min	0.702	Distribución normal	0.519	Distribución normal
C.abiótico RSL 1 mL/min	0.248	Distribución normal	0.809	Distribución normal
<i>S. cap</i> RSL 1 mL/min	0.99	Distribución normal	0.996	Distribución normal
C. abiótico RSL 2 mL/min	0.716	Distribución normal	0.374	Distribución normal
<i>S. cap</i> RSL 2 mL/min	0.154	Distribución normal	0.293	Distribución normal

Una vez evaluada la prueba de normalidad, primera condición necesaria para realizar la prueba t, se evaluó la igualdad de varianza, segunda condición necesaria para realizar la prueba t.

Prueba de igualdad de varianza

Hipótesis para la prueba de igualdad de varianza

H₀: Las varianzas son iguales

H₁: Las varianzas no son iguales

	BaA		BaP	
	Valor-p	Estadístico de Levene	Valor-p	Estadístico de Levene
C.abiótico RSI VS <i>S. cap</i> RSI 1 mL/min	0.069	Varianzas iguales	0.199	Varianzas iguales
C.abiótico RSI VS <i>S. cap</i> RSI 2 mL/min	0.947	Varianzas iguales	0.069	Varianzas iguales
C.abiótico RSL VS <i>S. cap</i> RSL 1 mL/min	0.4	Varianzas iguales	0.179	Varianzas iguales
C.abiótico RSL VS <i>S. cap</i> RSL 2 mL/min VS <i>S. cap</i> RSI 1 mL/min VS <i>S. cap</i> RSI 2 mL/min	0.069	Varianzas iguales	0.126	Varianzas iguales
<i>S. cap</i> RSL 1 mL/min VS <i>S. cap</i> RSL 2 mL/min	0.247	Varianzas iguales	0.698	Varianzas iguales
<i>S. cap</i> RSL 1 mL/min VS <i>S. cap</i> RSL 2 mL/min	0.272	Varianzas iguales	0.292	Varianzas iguales

Prueba t de student

Hipótesis para la prueba de igualdad de medias de remoción

H₀: Existe diferencia entre las medias de remoción

H₁: No existe diferencia entre las medias de remoción

	BaA		BaP	
	Valor p	Prueba t	Valor p	Prueba t
C.abiótico RSI VS <i>S. cap</i> RSI 1 mL/min	0.013	Muestras estadísticamente diferentes	0.012	Muestras estadísticamente diferentes
C.abiótico RSI VS <i>S. cap</i> RSI 2 mL/min	0.002	Muestras estadísticamente diferentes	0.004	Muestras estadísticamente diferentes
C.abiótico RSL VS <i>S. cap</i> RSL 1 mL/min	0.011	Muestras estadísticamente diferentes	0.001	Muestras estadísticamente diferentes
C.abiótico RSL VS <i>S. cap</i> RSL 2 mL/min	0.005	Muestras estadísticamente diferentes	0.009	Muestras estadísticamente diferentes
<i>S. cap</i> RSI 1mL/min- <i>S. cap</i> RSI 2 mL/min	0.009	Muestras estadísticamente diferentes	0.256	Muestras estadísticamente Iguales
<i>S. cap</i> RSL 1mL/min- <i>S. cap</i> RSL 2 mL/min	0.006	Muestras estadísticamente diferentes	0.452	Muestras estadísticamente diferentes