



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

EVALUACIÓN DE LA DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN EXTRACTOS ENZIMÁTICOS MICROALGALES CRUDOS Y FRACCIONADOS POR CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE **DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

M. en C. JOSÉ EDUARDO BECERRIL MERCADO

Dra. MARTHA PATRICIA GARCÍA CAMACHO

Facultad de Química, Departamento de Química Analítica

Ciudad de México. Abril 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAestrÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

EVALUACIÓN DE LA DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN EXTRACTOS ENZIMÁTICOS MICROALGALES CRUDOS Y FRACCIONADOS POR CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. JOSÉ EDUARDO BECERRIL MERCADO

Dra. MARTHA PATRICIA GARCÍA CAMACHO

FACULTAD DE QUÍMICA, DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



Ciudad de México, 2023

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México, CONACYT (proyecto CB 283377).

Se agradece a la Dirección General de Asuntos de Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México DGAPA-UNAM (proyecto PAPIIT IT202718).

Se agradece al CONACYT por la beca de Doctorado No. 577195 para la realización de mis estudios.

Se agradece a la Universidad Nacional Autónoma de México, al posgrado en Ciencias Químicas y la Facultad de Química.

Agradezco a la Dra. Martha Patricia García Camacho por su asesoría durante la duración del proyecto. por la oportunidad que me otorgaron para formarme como profesional.

Agradezco a mi comité tutor conformado por mi asesora, la Dra. Alejandra Hernández Santoyo y el Dr. Gustavo Zelada Guillen que con sus comentarios en cada evaluación semestral enriquecieron el proyecto y mi formación.

Agradezco a la maestra Rosario Covarrubias por su apoyo en el desarrollo del proyecto.

Agradezco a los miembros del jurado por sus valiosas aportaciones durante la revisión de este trabajo.

Finalmente agradezco a mis compañeros con los que compartí estancia en el laboratorio y fuera de él.

DEDICATORIA

A mi esposa Aline, que durante la realización de este trabajo pasamos por altibajos de todo tipo y siempre se mantuvo ahí apoyándome y creyendo en mí, te amo.

A mis papás que siempre tuvieron una palabra de aliento y motivación, los quiero.

A mis suegros que me tratan ya como a un hijo, los llevo en mi corazón.

A ustedes dos que ya no están en este mundo, pero espero nos veamos en el siguiente.

Y a todos ustedes que siempre tuvieron una palabra reconfortante, gracias.

Esta tesis fue revisada, evaluada y aprobada por los siguientes sinodales

Presidente	Dra. Alicia Negrón Mendoza
Vocal	Dra. María del Pilar Cañizares Macías
Vocal	Dra. Alejandra Hernández Santoyo
Vocal	Dr. José Ramón Verde Calvo
Secretario	Dra. Selena Gutiérrez Flores

Esta tesis fue realizada bajo la dirección de la Dra. Martha Patricia García Camacho en el Departamento de Química Analítica, Laboratorio 227 en el edificio F de la Facultad de Química, C.U. UNAM.

PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

ARTÍCULO:

Becerril Mercado, J. E., García de Llasera, M. P., & Méndez García, M. (2022). Size Exclusion Chromatography Protein Profile of *Selenastrum capricornutum* Culture Extracts Degrading Benzo(a)Pyrene. Polycyclic Aromatic Compounds. <https://doi.org/10.1080/10406638.2022.2159987>

CONGRESOS

Presentación del trabajo: Separación de isómeros de metabolitos del benzo(a)pireno en el 53° Congreso Mexicano de Química / 37° Congreso Nacional de Educación Química por Becerril Mercado José Eduardo y García Camacho Martha Patricia. Realizado del 2 al 5 octubre del 2018 en la Coordinación General de Formación e Innovación Educativa y la Unidad Politécnica para el desarrollo y la competitividad Empresarial del Instituto Politécnico Nacional.

Presentación del trabajo: Empleo de sonda ultrasónica de alta potencia para la obtención de extractos intracelulares y evaluación de su actividad enzimática en el 5° Congreso de Ciencia y Tecnología / 1er Encuentro de buenas prácticas docentes por Becerril Mercado José Eduardo y García Camacho Martha Patricia. Realizado en el 2019 en la Facultad de Estudios Superiores, Cuautitlán, UNAM.

Presentación del trabajo: Tratamiento de lisados microalgales con actividad enzimática para la degradación del *B[a]P* y su evaluación por SEC en el 6° Congreso de Ciencia y Tecnología / 2° Encuentro de buenas prácticas docentes por Becerril Mercado José Eduardo y García Camacho Martha Patricia. Realizado el 11 de diciembre del 2020 vía remota por videoconferencia.

Presentación del trabajo: *B[a]A* degradation in enzymatic activity bioassays with green microalgae extracts en el Congreso Internacional de la Sociedad Química de México 2021 “al Ritmo de nuestros tiempos” por Becerril Mercado José Eduardo y García Camacho Martha Patricia. Realizado del 30 de agosto al 3 de septiembre del 2021 vía remota por video-poster.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. HIPÓTESIS	6
3. OBJETIVOS	7
3.1. GENERAL	7
3.2. PARTICULARES	7
4. ANTECEDENTES	8
4.1. Hidrocarburos aromáticos policíclicos	8
4.1.1. Origen de los HAP	8
4.1.2. Exposición a HAP	9
4.2. Procesos de eliminación de HAP por biodegradación	10
4.2.1. Biodegradación de HAP por bacterias	12
4.2.2. Biodegradación de HAP por hongos	16
4.2.3. Biodegradación de HAP por microalgas	18
4.2.3.1. Microalgas de interés en degradación de HAP	19
4.2.3.1.1. <i>Scenedesmus acutus</i>	21
4.2.3.1.2. <i>Selenastrum capricornutum</i>	22
4.3. Lisis celular	23
4.3.1. Ultrasonido como método de lisis celular	23
4.3.1.1. Tipos de ultrasonido	25
4.3.1.2. Ventajas y desventajas de los métodos ultrasónicos	25
4.3.1.3. Lisis de microalgas por ultrasonido	25
4.4. Cromatografía de exclusión molecular	27
4.4.1. Modalidades exclusión molecular	28
4.4.2. Parámetros cromatográficos en exclusión molecular	28
4.4.3. Condiciones o variables para optimizar en exclusión molecular	30
4.4.4. Tipos de empaques en exclusión molecular	32
4.4.5. Aplicaciones de la exclusión molecular	35
4.5. Métodos de extracción de metabolitos de HAP con adsorbentes	35
4.5.1. Extracción en fase sólida	36
4.5.2. Dispersión de matriz en fase sólida	37
4.6. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución y análisis de HAP	39
4.7. Electroforesis	41

4.7.1. Electroforesis en gel	41
4.7.2. Electroforesis (SDS-PAGE)	43
4.7.2.1 Empleo de electroforesis en la proteómica de microorganismos degradadores de contaminantes.....	43
4.7.3. Enzimas microbianas identificadas en el proceso de degradación de HAP	44
5. METODOLOGÍA.....	50
5.1. Descripción del plan general.....	50
5.1.1. Instrumentación y material	53
5.2. Metodología analítica	56
5.2.1. Análisis cromatográfico de HAP	56
5.2.2. Análisis cromatográfico de metabolitos	56
5.2.3. Extracción en fase sólida	57
5.2.4. Dispersión de matriz en fase sólida.....	57
5.2.5. Validación de la metodología cromatográfica y del tratamiento de muestra.....	57
5.2.5.1. Análisis de <i>B[a]A</i> y <i>B[a]P</i> por Extracción en Fase Sólida / Dispersión de Matriz en Fase Sólida-Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución	58
5.2.5.2. Análisis de metabolitos de interés de <i>B[a]A</i> y <i>B[a]P</i> por Extracción en Fase Sólida / Dispersión de Matriz en Fase Sólida-Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución	59
5.2.6. Evaluación de configuración geométrica	59
5.2.7. Obtención de extractos enzimáticos	60
5.2.7.1. Lisis celular	60
5.2.7.2. Concentración de extractos crudos por evaporación y filtración	61
5.2.8. Análisis de extractos crudos por Cromatografía de Exclusión Molecular	62
5.2.9. Fraccionamiento de extractos crudos concentrados en fases SEPHADEX por cromatografía de exclusión molecular preparativa.....	62
5.2.10. Análisis de subfracciones del extracto crudo intracelular por electroforesis	64
5.3. Bioensayos	64
5.3.1. Crecimiento de cultivos de <i>Scenedesmus acutus</i> y <i>Selenastrum capricornutum</i>	64
5.3.2. Bioensayos con cultivos de <i>Selenastrum capricornutum</i> a diferentes tiempos.....	64
5.3.3. Bioensayos preliminares en extractos crudos.....	65
5.3.4. Selección de condiciones de activación para los bioensayos con extractos crudos.....	65
5.3.4.1. Bioensayos de evaluación de biodegradación con extractos crudos no concentrados	66
5.3.5. Evaluación de biodegradación en extractos crudos concentrados	67
5.3.6. Evaluación de biodegradación en fracciones obtenidas por Cromatografía de Exclusión Molecular de extractos crudos con Sephadex G-50	67
5.3.7. Evaluación de biodegradación en fracciones obtenidas por Cromatografía de Exclusión Molecular de extractos crudos con Sephadex G-100	68
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	69

6.1. Metodología Analítica.....	69
6.1.1 Análisis cromatográfico de HAP	69
6.1.2. Análisis cromatográfico de metabolitos	69
6.1.3. Validación del método	72
6.1.3.1. Análisis de metabolitos de seguimiento.....	75
6.1.4. Evaluación de configuración geométrica	77
6.1.5. Lisis celular	79
6.1.6. Análisis de extractos crudos por cromatografía de exclusión molecular, calibración.....	82
6.2. Bioensayos	84
6.2.1. Crecimiento de cultivos de <i>Scenedesmus acutus</i> y <i>Selenastrum capricornutum</i>	84
6.2.2. Bioensayos con cultivos de células.....	85
6.2.3. Ensayos preliminares de evaluación de la biodegradación con extractos crudos.....	87
6.2.3.1 Comparación de la evaluación de la degradación en extractos crudos y en cultivos con células	88
6.2.4. Evaluación de la degradación en extractos crudos de <i>S. capricornutum</i>	89
6.2.4.1. Activación de <i>S. capricornutum</i> frente B[a]P por periodos de 48 y 72 h	89
6.2.4.2. Activación de <i>S. capricornutum</i> frente B[a]A por periodos de 48 y 72 h	91
6.2.4.3. Evaluación de biodegradación en extractos crudos de <i>S. capricornutum</i> a diferentes tiempos de incubación con B[a]P.....	91
6.2.4.4. Evaluación de biodegradación en extractos crudos de <i>S. capricornutum</i> a diferentes tiempos de incubación con B[a]A.....	93
6.2.5. Evaluación de la degradación en extractos crudos de <i>Scenedesmus acutus</i>	94
6.2.5.1. Activación de <i>S. acutus</i> frente B[a]P a diferentes tiempos	94
6.2.5.2. Activación de <i>S. acutus</i> frente B[a]A a diferentes tiempos	95
6.2.6. Selección de tiempos de activación para los ensayos de evaluación de degradación en extractos crudos de <i>S. capricornutum</i> y <i>S. acutus</i>	97
6.2.7. Evaluación de biodegradación en extractos crudos de <i>S. capricornutum</i> concentrados por evaporación o filtración	97
6.2.8. Análisis de extractos crudos de <i>Selenastrum capricornutum</i> por cromatografía de exclusión molecular	99
6.2.9. Bioensayos de evaluación de degradación por exposición al B[a]P de extractos crudos concentrados fraccionados en Sephadex G-50.....	101
6.2.10. Bioensayos de evaluación de degradación por exposición al B[a]P de extractos crudos concentrados fraccionados con Sephadex G-100	103
6.2.11. Análisis de subfracciones de extractos crudos por electroforesis (SDS-PAGE) y descripción del perfil enzimático	112
7. CONCLUSIONES	120
8. PERSPECTIVA	121
9. REFERENCIAS.....	122

10. MATERIAL ANEXO	132
A.1. Determinación de proteínas totales en extractos crudos por método de Lowry.	132
A.2. Cambio de procesador ultrasónico	133
A.3. Ejemplo de prueba de hipótesis para evaluación de cantidad de proteína en cultivos expuestos y no a <i>B[a]P</i>	134
A.4. Artículo publicado en la revista Polycyclic Aromatic Compounds.....	136

ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATSDR	Agencia para sustancias tóxicas y registro de enfermedades
<i>B[a]A</i>	Benzo [a] antraceno
<i>B[a]P</i>	Benzo [a] pireno
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
C.V.	Coefficiente de variación
DMFS	Dispersión de Matriz en Fase Sólida
DS	Desviación estándar
ECs	Extracto crudo
ECE	Extracto crudo extracelular
ECl	Extracto crudo intracelular
EFS	Extracción en Fase Sólida
h	Horas
HAP	Hidrocarburo Aromático Policíclico
Kav	Constante de distribución promedio
<i>kd</i>	Factor de distribución / partición
kDa	Kilo Dáltones
kHz	Kilo Hertz
<i>k_w</i>	Factor de retención (fase móvil es agua)
<i>k_{ow}</i>	Constante de reparto octanol/agua
m	Pendiente
MHz	Mega Hertz
mM	Milimolar
ML	Medio líquido
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótida
LC	Límite de cuantificación
LD	Límite de detección
LE	Límite de exclusión
PAG	Geles de poliacrilamida
PM	Peso molecular
R ²	Linealidad
R _s	Resolución
RSD	Desviación estándar relativa
<i>S. acutus</i>	<i>Scenedesmus acutus</i>
<i>S. capricornutum</i>	<i>Selenastrum capricornutum</i>
SDS-PAGE	Electroforesis por gel de una dimensión
SEC	Cromatografía de Exclusión Molecular
T	Temperatura

t_r	Tiempo de retención
USEPA	Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos
V_c	Volumen de columna
V_{e_n}	Volumen de elución
V_i	Volumen interno
V_o	Volumen de vacío
V_r	Volumen de retención
V_t	Volumen total
W_n	Ancho a la base del pico

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 4.1. Características fisicoquímicas de metabolitos tipo <i>di</i> -hidrodiol provenientes de la degradación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos de alto peso molecular.	15
Tabla 4.2. Métodos para el estudio de la biodegradación de contaminantes por empleo de microalgas.	20
Tabla 4.3. Estudios de biodegradación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos por uso de las microalgas <i>Selenastrum capricornutum</i> y <i>Scenedesmus acutus</i>	22
Tabla 4.4. Principales métodos físicos, químicos y biológicos de lisis celular	23
Tabla 4.5. Ejemplos de estudios que usaron ultrasonido para la lisis de microalgas.....	24
Tabla 4.7. Principales efectos provocados por tratamiento ultrasónico en algas verde-azules y microalgas	26
Tabla 4.8. Principales propiedades fisicoquímicas de las fase estacionaria usadas en la cromatografía por exclusión molecular con base en su conformación.	33
Tabla 4.9. Análisis de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución en diversas muestras por uso de distintas técnicas de tratamiento.	39
Tabla 4.10. Enzimas microbianas involucradas en la degradación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos.....	48
Tabla 5.1. Resumen de condiciones, materiales y actividades desarrolladas en esta investigación.	53
Tabla 5.2. Sistemas cromatográficos usados en el análisis de <i>B[a]A</i> y <i>B[a]P</i> y sus metabolitos.....	56
Tabla 5.3. Condiciones utilizadas en la validación del método usado en la determinación y cuantificación de <i>B[a]P</i> y <i>B[a]A</i> en medio líquido o biomasa.....	58
Tabla 5.4. Condiciones utilizadas en la validación del método usado en la determinación y cuantificación de 4,5- <i>cis</i> - <i>dB[a]P</i> , 7,8- <i>cis</i> - <i>dB[a]P</i> y 5,6- <i>cis</i> - <i>dB[a]A</i> en medio líquido y biomasa.....	59
Tabla 5.5. Evaluación del proceso de lisis. Condiciones usadas en la optimización del proceso automatizado de ultrasonido.....	60
Tabla 5.6. Determinación del volumen de exclusión e intervalo de trabajo de Sephadex G-50 y Sephadex G-100, empaques usados al realizar la cromatografía de exclusión molecular.....	63
Tabla 5.7. Condiciones evaluadas en los bioensayos de activación y la evaluación de degradación realizados con <i>S. capricornutum</i> y <i>S. acutus</i>	66
Tabla 6.1. Parámetros cromatográficos determinados en el análisis de los metabolitos <i>cis</i> - y <i>trans</i> - 4,5- y 7,8- <i>dB[a]P</i>	70
Tabla 6.2. Resultados de la validación de los métodos (n=3) de cuantificación de <i>B[a]A</i> , <i>B[a]P</i> , 5,6- <i>cis</i> - <i>dB[a]P</i> , 4,5- <i>cis</i> - <i>dB[a]P</i> y 7,8- <i>cis</i> - <i>dB[a]P</i>	74
Tabla 6.3. Calibración primaria usada en cromatografía de exclusión molecular analítica utilizando estándares de peso molecular conocido y las columnas SRT SEC 300 y Agilent Bio SEC-5.	82
Tabla 6.4. Corroboración de biodegradación en medio líquido y biomasa de <i>Selenastrum capricornutum</i> por bioensayos de exposición de tiempo variable y cuantificación de <i>B[a]P</i> (μg) y sus metabolitos (ng).	86
Tabla 6.5. Cantidades del 4,5- <i>cis</i> - <i>dB[a]P</i> cuantificadas en las fracciones de los Extractos Crudos obtenidas por cromatografía de exclusión molecular y analizadas por cromatografía de líquidos de alta resolución..	103
Tabla 6.6. Pesos moleculares observados en el análisis de las fracciones y subfracciones de los Extractos Crudos realizado por cromatografía de exclusión molecular analítica y electroforesis SDS PAGE.....	116

Tabla a.1. Composición de los reactivos A y B usados en el método de Lowry para la cuantificación de proteínas totales. 132

Tabla a.2. Composición de los niveles de concentración de la curva de calibración de albumina de suero bovino (BSA) usada en la determinación de proteínas por el método de Lowry 132

Tabla a.3. Pruebas de hipótesis para el Extracto Crudo Extracelular (A) el Extracto Crudo Intracelular (B) y ambos extractos crudos (C) 134

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 4.1. Estructura de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos de investigación prioritaria para la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos y sus principales propiedades fisicoquímicas.....	9
Figura 4.2. Propuesta de biodegradación microbiana aerobia y anaerobia de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos. Enzimas observadas al inicio de la biodegradación de alcanos, cicloalcanos y alquilbencenos.	12
Figura 4.3. Degradación de <i>B[a]P</i> por bacterias.....	13
Figura 4.4. Proceso general aerobio de biodegradación microbiana de hidrocarburos ligado a la producción de biomasa.....	14
Figura 4.5. Degradación de <i>B[a]P</i> por hongos a compuestos hidroxilados y dihidrodioles vía epóxidos y <i>diol</i> -epóxidos para obtener <i>cis</i> - y <i>trans</i> - tetraol	17
Figura 4.6. Mecanismo de degradación de fenantreno por el hongo <i>Irpex lacteus</i>	18
Figura 4.7. Degradación de compuestos <i>mono</i> - y <i>poli</i> - aromáticos por acción de <i>mono</i> - y <i>di</i> -oxigenasas	19
Figura 4.8. Microalgas usadas en la investigación. A) <i>Scenedesmus acutus</i> , B) <i>Scelenastrum capricornutum</i>	21
Figura 4.9. Esquema instrumental de un equipo de ultrasonido por sonda.	26
Figura 4.10. Esquema del proceso de cromatografía de exclusión molecular a nivel analítico y preparativo para el análisis, fraccionamiento y limpieza.	32
Figura 4.11. Diagrama de los 4 pasos presentes en el proceso de Extracción en Fase Sólida para la eliminación de impurezas y la colecta de compuestos de interés a partir de muestras líquidas.....	36
Figura 4.12. Diagrama de los 4 pasos presentes en el proceso de Dispersión de Matriz en Fase Sólida para la eliminación de impurezas y la colecta de compuestos de interés a partir de muestras sólidas.	38
Figura 4.13. Esquema de la instrumentación utilizada en la realización de electroforesis SDS PAGE.....	42
Figura 5.1. Diagrama general de los bioensayos y análisis realizados para la evaluación de la degradación de <i>B[a]A</i> y <i>B[a]P</i> en extractos crudos y fraccionados por Cromatografía de Exclusión Molecular.	51
Figura 6.1. Cromatograma obtenido de la separación de <i>B[a]A</i> ($\lambda= 263$ nm) y <i>B[a]P</i> ($\lambda= 287$ nm) por cromatografía de líquidos de alta resolución.	69
Figura 6.2. Cromatogramas obtenidos en la optimización de la separación de metabolitos <i>cis</i> - / <i>trans</i> - 4,5- y 7,8- <i>dB[a]P</i> a una concentración de 10 ng mL ⁻¹	71
Figura 6.3. Optimización de la separación de los metabolitos de interés 5,6- <i>cis</i> - <i>dB[a]P</i> , 4,5- <i>cis</i> - <i>dB[a]P</i> y 7,8- <i>cis</i> - <i>dB[a]P</i>	72
Figura 6.4. Curvas de calibración construidas con el cromatógrafo Varian 9065 Polychrom y la columna Hypersil ODS para la determinación y cuantificación de <i>B[a]A</i> y <i>B[a]P</i> en A) medio líquido y B) biomasa usando extracción en fase sólida y dispersión de matriz en fase sólida como tratamiento de muestra; respectivamente.	73
Figura 6.5. Curvas de calibración construidas con el cromatógrafo Varian ProStar y la columna Microsorb-MV para la determinación y cuantificación de 5,6- <i>cis</i> - <i>dB[a]A</i> , 4,5- <i>cis</i> - <i>dB[a]P</i> y 7,8- <i>cis</i> - <i>dB[a]P</i> en A) medio líquido y B) biomasa usando extracción en fase sólida y dispersión de matriz en fase sólida; respectivamente, como tratamiento de muestra.	76
Figura 6.7. Absorbancia en lisados obtenidos con 1, 2 y 4 cultivos de activación asociada a la presencia de clorofila y proteína.....	79
Figura 6.8. Proteína total cuantificada en los extractos crudos obtenidos de <i>S. capricornutum</i> y <i>S. acutus</i> expuestas y no a <i>B[a]P</i> por 48 y 72 h a 34°C.....	80

Figura 6.9. <i>Scenedesmus acutus</i> expuesta a ultrasonido por pulsos automatizados de 10 seg y pausas de 5 seg para una exposición total de 5 min (30 % de amplitud).....	81
Figura 6.10. A) Curvas de calibración primaria usadas en cromatografía de exclusión molecular y los cromatogramas obtenidos con B) la columna Sephax SRT SEC-300 y C) la columna Agilent Bio SEC-5 (B)	83
Figura 6.11. Curvas de calibración secundarias usadas en el análisis de las subfracciones con el cromatógrafo Waters 1525 y las columnas Sepax SRT SEC-300 y Agilent Bio SEC-5.	84
Figura 6.12. Curvas de crecimiento de <i>Scenedesmus acutus</i> y de <i>Selenastrum capricornutum</i> en 200 mL de medio Bristol más peptona proteosa al 0.1% m/v y <i>S. capricornutum</i> más peptona proteosa al 0.01% m/v.....	85
Figura 6.13. Evaluación preliminar de la biodegradación presente en extractos crudos (3 h frente B[a]P). Cuantificación de la producción y remanente de A) 4,5-cis-dB[a]P y 7,8-cis-dB[a]P y B) B[a]P. Extractos obtenidos por activación de 72 h con B[a]P (266 ng mL ⁻¹).	88
Figura 6.14. Evaluación de la biodegradación de B[a]P en células completas, extracto crudo intracelular, medio líquido y la mezcla de los dos últimos (ML + ECI). Cuantificación del 4,5-cis-dB[a]P.....	89
Figura 6.15. Evaluación de la degradación en Extractos Crudos (ECs) de <i>Selenastrum capricornutum</i> por incubación de 3h con B[a]P (A) o B[a]A (B) de acuerdo con el Hidrocarburo Aromático Policíclico usado en el proceso de activación (48 y 72 h). Cuantificación del 4,5-cis-dB[a]P	90
Figura 6.16. Evaluación de la biodegradación en Extractos Crudos de <i>Selenastrum capricornutum</i> por incubación de 1.5, 3 y 6 h con B[a]P. Cuantificación del 4,5-cis-dB[a]P.....	92
Figura 6.17. Evaluación de la biodegradación en Extractos Crudos de <i>Scenedesmus acutus</i> por incubación de 3 h con B[a]P y activación (48, 72, 144, h y 2 semanas). Cuantificación del 4,5- y 7,8 - cis-dB[a]P.....	95
Figura 6.18. Evaluación de degradación en Extractos Crudos de <i>Scenedesmus acutus</i> por incubación de 3 h con B[a]A y activación (48 y 72 h). Cuantificación del 5,6-cis-dB[a]A con el equipo Varian ProStar y columna Microsorb MV.....	96
Figura 6.19. Cromatogramas de la evaluación de biodegradación del B[a]P en (A) Extracto Crudo Intracelular concentrado y (B) Extracto Crudo Extracelular concentrado (x4) de <i>Selenastrum capricornutum</i> , frente sus controles (negro).....	98
Figura 6.20. Cromatogramas de A) Extracto Crudo Intracelular concentrados (x4), y B) Extracto Crudo Extracelular concentrados (x4), incubados por 3 h con B[a]P y también usado en la activación (72 h), frente Extractos Crudos concentrados (x4) sin activación (negro). Espectro de absorción de los picos de 10.4 min (C) y 10.3 min (D).	100
Figura 6.21. Cromatogramas de A) Extracto Crudo Intracelular > 30 kDa y B) Extracto Crudo Intracelular 30 kDa - 1.5 kDa ambos extractos concentrados (x12) e incubados por 3 h con B[a]P, también usado en la activación.....	102
Figura 6.22. Histograma de las fracciones A1 a B4 del Extracto Crudo Intracelular obtenidas por el uso de la fase G-100 y analizadas con la columna analítica Sephax SRT SEC-300 y el cromatógrafo Waters 1525.	106
Figura 6.23. Cromatogramas de A) la fracción A1 (230 nm) y B) la fracción A2 (258.3 nm). Obtenidos por el uso de la columna Sephax SRT SEC-300 y el equipo Waters 1525.	106
Figura 6.24. Cromatograma de la fracción A1.....	107
Figura 6.25. Histograma de las fracciones A1 a B4 del Extracto Crudo Intracelular obtenidas por el empleo de la fase G-100 y analizadas con la columna analítica Agilent Bio SEC-5 y el cromatógrafo Waters 1525.	108
Figura 6.26. A) Histograma de las subfracciones A1a a A2b analizadas a diferentes longitudes de onda para seguimiento del Peso Molecular 82.73 kDa. B) Cromatograma (245.4 nm) obtenido del análisis de la fracción (A1b, 1 mL) realizado con el equipo Waters 1525 y la columna Agilent Bio Sec-5. C) Espectro Ultravioleta de la señal de interés.	110

Figura 6.27. Gel de electroforesis SDS PAGE usado en el análisis de las subfracciones A1a a A2b. Comparación de las cantidades de proteína cuantificada en las subfracciones provenientes de cultivos activados y no activados por *B[a]P*..... 112

Figura 6.28. Histograma de las subfracciones A1a a A2b por electroforesis SDS PAGE. Seguimiento de las señales observadas en las fracciones obtenidas de cultivos activados con *B[a]P* (72 h) frente los controles 114

Figura a.1. Evaluación del cambio de sonda de ultrasonido por cuantificación del 4,5-cis-d*B[a]P* a causa de la biodegradación en el Extracto Crudo Intracelular de *Selenastrum capricornutum* y *Scenedesmus acutus*. 134

RESUMEN

Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP) naturales o sintéticos son ubicuos, recalcitrantes y tóxicos; con interés ambiental y para la salud. La biodegradación de los HAP por la acción de enzimas específicas de microalgas verdes aún no se ha reportado. Con el objetivo de describir este tipo de sistema enzimático se utilizaron bioensayos de degradación de benzo[*a*]antraceno (*B[a]A*) y benzo[*a*]pireno (*B[a]P*) por las microalgas *S. capricornutum* y *S. acutus* y el análisis conjunto de los metabolitos producidos y los componentes moleculares presentes en extractos enzimáticos.

En los bioensayos de degradación mencionados se usaron cultivos líquidos de *S. capricornutum* y *S. acutus* expuestos a *B[a]A* o *B[a]P* (266 ng mL⁻¹) a diferentes intervalos de tiempo y condiciones específicas, proceso llamado de activación, con el cual se obtuvo el sistema enzimático involucrado en la biodegradación y se determinó cromatográficamente la isomería geométrica de los metabolitos producidos. Posteriormente, por centrifugación y lisis ultrasónica se obtuvieron los extractos crudos *intra-* y *extra-*celulares para su fraccionamiento y evaluación de la biodegradación de HAP bajo luz-temperatura ambiente, agitación constante, diferentes intervalos de tiempo y frente al HAP usado en la activación. Además, en los extractos crudos intracelulares y extracelulares se cuantificó la proteína total por el método de Lowry, teniendo mayor concentración en el extracto crudo extracelular sin importar el tiempo de exposición. Las muestras se trataron por Extracción en Fase Sólida y Dispersión de Matriz en Fase Sólida y los metabolitos de HAP se analizaron por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

De entre los bioensayos de activación, en los de *S. capricornutum* frente *B[a]P* por 6 h se produjo la mayor cantidad del 4,5-*dB[a]P* (159 ± 4 ng en medio líquido; 75 ± 2.4 ng en biomasa) y del 7,8- *dB[a]P* (45 ± 1.83 ng en medio líquido), mientras la menor concentración del 4,5-*dB[a]P* se halló a las 72 h (11 ± 0.37 ng en medio líquido), este comportamiento permitió la obtención de extractos crudos con cantidades remanentes mínimas de metabolitos que favorecieron su cuantificación en la subsecuente evaluación de biodegradación en los extractos crudos por exposición al contaminante; siendo mayor a las 3 h y 6 h en el extracto crudo extracelular (604.54 ng) e intracelular (250.72 ng); respectivamente. La biodegradación de *B[a]A* en el extracto crudo extracelular de *S. capricornutum* permitió cuantificar al 5,6-*cis*-*dB[a]A* (10.8 ng) después de 17 h al no estar presente el metabolito en el control mientras en el extracto crudo intracelular se cuantificó a las 14 h (2.76 ng).

La biodegradación de *B[a]P* por extractos crudos de *S. acutus* no se cuantificó incluso con una activación de dos semanas pues la cantidad del metabolito en el bioensayo no se diferenció de la presente en el control. La evaluación de la biodegradación de *B[a]A* por *S. acutus* se cuantificó con el 5,6-*cis*-*dB[a]P* en el extracto crudo intracelular (0.44 ng) y en el extracto crudo extracelular (4.57 ng) a las 48 h. Con base en las condiciones metodológicas presentadas y el comportamiento degradativo observado; el estudio de la biodegradación en extractos crudos fraccionados contó con un fuerte enfoque en *S. capricornutum* frente a *B[a]P*.

Después de determinar las condiciones óptimas de activación de *S. capricornutum* se evaluó la biodegradación de *B[a]P* en los extractos crudos provenientes de 12 cultivos activados por *B[a]P* y concentrados por evaporación o filtración (extracto crudo intracelular y extracelular; respectivamente). Estos se analizaron por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución y detección por fluorescencia comparándolos con controles, extractos crudos no expuestos a HAP, determinando la presencia de metabolitos y así la biodegradación. Además, en los extractos crudos se determinaron pesos moleculares (PM) de interés por Cromatografía de Exclusión Molecular, entre ellos: 27.2 ± 0.41, 38.15 - 41.97, 91.08 ± 29.3 y 215.68 ± 5.34 kDa, usando las columnas SRT SEC 300 y Agilent Bio SEC-5.

Posteriormente con el fraccionamiento de los extractos crudos concentrados por Cromatografía de Exclusión Molecular, usando Sephadex G-50, se observó mayor biodegradación en la fracción con componentes > 30 kDa confirmando el PM 38.15-41.97 kDa. Las subfracciones obtenidas por uso de Sephadex G-100 y degradadoras de *B[a]P* se analizaron por Cromatografía de Exclusión Molecular analítica y electroforesis (SDS-PAGE) determinando PM de 20 y 50 kDa vinculándose con subunidades de *di*-oxigenasas; de 38 y 82 kDa relacionándose con peroxidasas y de 48 kDa compatible con la descripción de peroxidasas degradadoras de HAP. Finalmente, los PM ≥ 200 kDa resultaron de interés al considerar sistemas multicomponentes degradadores de HAP.

Con la información colectada se concluyó la presencia de distintas moléculas en la microalga verde *S. capricornutum* que presuntamente forman parte de un sistema proteico multicomponente involucrado en el proceso de degradación de HAP, liderado por *di*-oxigenasas en el curso temprano de la eliminación de estos contaminantes.

ABSTRACT

Natural or synthetic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) are ubiquitous, recalcitrant, and toxic, with environmental and health interest. The biodegradation of PAHs by the action of specific enzymes of green microalgae has not yet been reported. To describe this enzymatic system, bioassays for the degradation of benzo[a]anthracene (B[a]A) and benzo[a]pyrene (B[a]P) by the microalgae *S. capricornutum* and *S. acutus* and the joint analysis of the metabolites produced, and the molecular components present in enzyme extracts.

The aforementioned degradation bioassays used liquid cultures of *S. capricornutum* and *S. acutus* exposed to B[a]A or B[a]P (266 ng mL⁻¹) at different timeslots and specific conditions, a process called activation, with which the enzymatic system involved in the biodegradation was obtained and the geometric isomerism of the metabolites produced was determined chromatographically. Subsequently, by centrifugation and ultrasonic lysis, the crude *intra*- and *extra*- cellular extracts were obtained for their fractionation and evaluation of the biodegradation of HAP under light-room temperature, constant agitation, different timeslots and against the HAP used in the activation. In addition, in the *intra*- and *extra*- cellular crude extracts, the total protein was quantified by the Lowry method, having a higher concentration in the extracellular crude extract regardless of the exposure time. Samples were treated by Solid Phase Extraction and Matrix Solid Phase Dispersion and PAH metabolites were analyzed by High Performance Liquid Chromatography.

Among the activation bioassays, those of *S. capricornutum* against B[a]P for 6 h produced the highest amount of 4.5-dB[a]P (159 ± 4 ng in liquid medium; 75 ± 2.4 ng in biomass) and 7.8-dB[a]P (45 ± 1.83 ng in liquid medium), while the lowest concentration of 4.5-dB[a]P was found at 72 h (11 ± 0.37 ng in liquid medium), this behavior allowed obtaining crude extracts with minimal remaining amounts of metabolites that favored their quantification in the subsequent evaluation of biodegradation in the crude extracts due to exposure to the contaminant; being greater at 3 h and 6 h in the extracellular (604.54 ng) and intracellular (250.72 ng) crude extracts; respectively. The biodegradation of B[a]A in the crude extracellular extract of *S. capricornutum* allowed the quantification of 5,6-cis-dB[a]A (10.8 ng) after 17 h as the metabolite was not present in the control while in the crude intracellular extract was quantified at 14 h (2.76 ng).

The biodegradation of B[a]P by crude extracts of *S. acutus* was not quantified even with a two-week activation as the amount of the metabolite in the bioassay did not differ from that present in the control. The evaluation of the biodegradation of B[a]A by *S. acutus* was quantified with 5,6-cis-dB[a]P in the crude intracellular extract (0.44 ng) and in the crude extracellular extract (4.57 ng) at 48 hours. Based on the methodological conditions presented and the degradative behavior observed; the study of biodegradation in fractionated crude extracts had a strong focus on *S. capricornutum* versus B[a]P.

After determining the optimal conditions for activation of *S. capricornutum*, the biodegradation of B[a]P was evaluated in crude extracts from 12 cultures activated by B[a]P and concentrated by evaporation or filtration (intracellular and extracellular crude extract; respectively). These were analyzed by High Performance Liquid Chromatography and fluorescence detection, comparing them with controls, crude extracts not exposed to HAP, determining the presence of metabolites and thus biodegradation. In addition, molecular weights (MW) of interest were determined in the crude extracts by Molecular Exclusion Chromatography, including: 27.2 ± 0.41, 38.15 - 41.97, 91.08 ± 29.3 and 215.68 ± 5.34 kDa, using the SRT SEC 300 and Agilent Bio columns. SEC-5.

Subsequently, with the fractionation of the concentrated crude extracts by Molecular Exclusion Chromatography, using Sephadex G-50, greater biodegradation was observed in the fraction with components > 30 kDa, confirming the PM 38.15-41.97 kDa. The subfractions obtained by using Sephadex G-100 and degrading B[a]P were analyzed by analytical Molecular Exclusion Chromatography and electrophoresis (SDS-PAGE) determining PM of 20 and 50 kDa binding with subunits of di-oxygenase subunits; of 38 and 82 kDa relating to peroxidases and of 48 kDa compatible with the description of HAP-degrading peroxidases. Finally, PM ≥ 200 kDa were of interest when considering PAH-degrading multicomponent systems.

With the information collected, it was concluded the presence of different molecules in the green microalga *S. capricornutum* that presumably form part of a multicomponent protein system involved in the PAH degradation process, led by di-oxygenases in the early course of the elimination of these contaminants.

1. INTRODUCCIÓN

Los HAP son un conjunto de más de 100 compuestos conformados por la fusión de dos o más anillos aromáticos que presentan una configuración lineal, angular o de racimo. Por su peso molecular se clasifican en HAP de bajo peso molecular y de alto peso molecular, estos últimos formados por al menos la fusión de 4 anillos de benceno. Los HAP son resultado de la combustión incompleta de materiales orgánicos a altas temperaturas y su deposición a bajas temperaturas (Haritash y Kaushick, 2009), y proceden de actividades antropogénicas o naturales (Guntupalli et al., 2019, Lee et al., 2017),

Los HAP son contaminantes ubicuos y recalcitrantes por su resonancia de electrones, carácter hidrofóbico, altos puntos de ebullición y baja presión de vapor (Suresh, et al., 2012). Los sistemas vivos pueden estar expuestos a los HAP por inhalación, contacto o ingesta de animales y vegetación contaminados (ATSDR, 1995, Wagrowski e Hites, 1997). Los HAP al ingresar a los sistemas vivos cuentan con una gran afinidad por tejido adiposo provocando daños a la salud, siendo el cáncer el más grave (USEPA, 2017).

El alto impacto de los HAP a la salud genera interés en organismos ambientales como la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA, por sus siglas en inglés). Esta agencia ha determinado una lista prioritaria de HAP para su investigación (Stellman et al., 2001). Dentro de esta se encuentra el benzo[*a*]pireno (*B[a]P*), el HAP con mayor potencial carcinogénico, usado como modelo de remoción y degradación de este tipo de compuestos (Srivastava y Kumar 2019, Chen et al., 2018; Fanali et al., 2018; Qin et al., 2017).

La degradación de los HAP se puede realizar por procesos físicos, químicos y microbiológicos (ATSDR, 2020). Mientras la degradación fisicoquímica se basa en métodos caros con alta demanda energética, peligrosos y contaminantes (Suresh, et al., 2012, Bilińska et al., 2019, Sriprapat y Thiravetyan, 2016), la degradación microbiológica se posiciona como una alternativa en la eliminación de HAP al proporcionar un alto nivel de remoción (Haritash y Kaushik, 2009), siendo una técnica económica y ambientalmente segura (Giovannella et al., 2020, Subashchandrabose et al., 2012).

La biodegradación de HAP de bajo peso molecular se ha estudiado con bacterias y hongos publicando

distintos sistemas enzimáticos mediados por oxigenasas, peroxidasas, el sistema del citocromo P-450, entre otros (ATSDR, 2017, Rodríguez et al., 2015, Zhu et al., 2019). Estos procesos de degradación están limitados por la presencia de HAP de alto peso molecular y condiciones ambientales como el tipo de microorganismos presentes impactando en la formación de los metabolitos (Kanally y Harayama, 2010; Koukkou y Vandera, 2011; Vila y Gri foll, 2009). (Suresh, et al., 2012).

Entre los productos de la degradación de organismos eucariontes y procariontes figuran los compuestos oxigenados resultado de la actividad de *mono*-oxigenasas con un PM de 21.9 a 49 kDa (Kim et al., 2004; Luo et al., 2016), *di*-oxigenasas con subunidades grandes (α) con PM de 50 kDa y subunidades pequeñas (β) de 20 kDa (Krivokok et al., 2003; Van Beilen y Witholt, 2007). También, se han publicado *mono*-oxigenasas que trabajan en conjunto con el sistema citocromo P-450, con tamaños de 44.8 kDa a 48.7 kDa (Luo et al., 2016; Brezna et l., 2006; Abdel-Shafy et al., 2016) y enzimas extracelulares como ligninas y lacasas con PM de 62 kDa (Wang et al., 2018; Arun y Eyini, 2011; Teng et al., 2019; Steffen et al. 2003; Gianfreda et al. 1999; Acevedo et al., 2011), incorporando un átomo de oxígeno (Ghosal et al. 2016) produciendo principalmente *trans*-dihidrodiol como sucede en hongos lignolíticos (Subashchandrabose et al., 2012). Por otra parte, las *di*-oxigenasas actúan como complejos enzimáticos con ferredoxinas reductasas con un PM de 43.82 kDa (Hunold 2021) y acoplándose al ion hierro sulfuro con PM de 9.91 a 22 kDa (Cvetkovska et al., 2018), estos complejos enzimáticos catalizan la adición de 2 átomos de oxígeno (Cerniglia, 1993; Kanaly y Harayama 2010) generando principalmente *cis*-dihidrodiol, proceso observado en bacterias (Kelley et al., 1990, Wang et al., 2018). El sistema enzimático responsable de la degradación de HAP presente en las microalgas aún no se define.

El proceso de degradación de HAP por microalgas se ha centrado en compuestos de bajo peso molecular. La literatura ha involucrado la presencia de *di*-oxigenasas posterior a la detección de *cis*-dihidrodiol (Warshawsky, et al., 1995). Estudios posteriores contraponen esta declaración mostrando evidencia de *mono*-oxigenasas al identificar *trans*-dihidrodiol y compuestos *mono*-hidroxilados (Ke et al., 2010; Heitkamp y Cerniglia, 1989). El análisis de estos productos de degradación se ha dificultado ante su inestabilidad a la luz, temperatura, y sus bajos niveles de producción (Clark, 1993).

La Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución es un método óptimo para la determinación y análisis, incluso a niveles traza, de los metabolitos de HAP, que puede aportar información del proceso de

biodegradación involucrado. Adicionalmente, esta técnica se combina con pretratamientos de muestra basados en la Extracción en Fase Sólida y Dispersión de Matriz en Fase Sólida que favorecen el análisis de matrices complejas y proveen mejores resultados (Olmos-Espejel et al., 2012), en comparación con técnicas clásicas como extracción líquido-líquido, permitiendo el seguimiento de la degradación.

El proceso de biodegradación se puede estudiar por un monitoreo continuo, realizando una lectura constante de los compuestos de interés, o un monitoreo discontinuo con la determinación de productos al final del proceso ó a intervalos de tiempo establecidos (Bergmeyer, 1974), usando Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución como metodología de análisis (Churchwell et al., 2005) y seguimiento de metabolitos y componentes proteicos (Schnell et al 2006).

La obtención de los componentes proteicos de microsistemas biológicos puede realizarse por métodos físicos y químicos. En bacterias figura el método físico de ultrasonido, seguido del uso de materiales porosos para la limpieza y fraccionamiento de extractos obtenidos por Cromatografía de Exclusión Molecular (Brezinski y Gorczyca 2019). Este proceso de obtención además ha favorecido la determinación de sistemas enzimáticos a través de la descripción de sus PM (Li et al., 2019) y la determinación de procesos de biodegradación a través de la fortificación de los extractos obtenidos usando contaminantes y el seguimiento de sus productos de degradación (Tammen et al., 2007).

Este trabajo contribuye con una novedosa descripción del perfil proteico que se presenta en el proceso de degradación de HAP presente en microalgas verdes como *Selenastrum capricornutum*, el cual en la actualidad solo deduce la existencia de oxigenasas como el posible sistema enzimático, a través del tipo de metabolitos. Este trabajo confirma que los productos de degradación formados por *S. capricornutum* están relacionados con la actividad de *di*-oxigenasas. También, describe por primera vez el perfil proteico de extractos celulares crudos y fraccionados por Cromatografía de Exclusión Molecular capaces de degradar a los HAP en estudio. Los resultados muestran que en el proceso de degradación participa un sistema enzimático multicomponente. El perfil proteico obtenido por Cromatografía de Exclusión Molecular se corroboró por electroforesis (SDS-PAGE).

2. HIPÓTESIS

Si se obtienen extractos de cultivos de microalgas verdes como *Scenedesmus acutus* y *Selenastrum capricornutum*, que para activar su capacidad degradadora de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos de alto peso molecular se expondrán a estos contaminantes por un intervalo de tiempo adecuado y bajo condiciones específicas, se podrá aislar el contenido proteico con el que se caracterice el perfil de peso molecular correspondiente a los componentes enzimáticos involucrados en el proceso de degradación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos de alto peso molecular.

3. OBJETIVOS

3.1. GENERAL

Obtener extractos *extra* e *intracelulares* provenientes de cultivos de *Selenastrum capricornutum* y *Scenedesmus acutus* que manifiesten actividad degradativa de B[a]P y B[a]A, con el fin de caracterizar por sus tamaños moleculares a las enzimas o componentes enzimáticos participantes en su degradación mediante análisis por cromatografía de exclusión molecular.

3.2. PARTICULARES

- ❖ Determinar al B[a]P y B[a]A y sus respectivos metabolitos en cultivos y extractos enzimáticos *extra* e *intracelulares* de *S. capricornutum* y *S. acutus* expuestos a los contaminantes, a través del uso de una metodología analítica validada.
- ❖ Encontrar las condiciones de lisis celular, mediante el empleo de una sonda de ultrasonido, apropiadas para la obtención de extractos intracelulares que contengan enzimas activas para degradar HAP procedentes de cultivos de las microalgas verdes *S. capricornutum* y *S. acutus*.
- ❖ Determinar las condiciones apropiadas de incubación para la activación o inducción de enzimas degradantes de B[a]P y B[a]A en cultivos de *S. capricornutum* y *S. acutus*.
- ❖ Evaluar la biodegradación en el extracto crudo extracelular e intracelular mediante la cuantificación de B[a]P, B[a]A y sus respectivos metabolitos en ensayos de exposición individuales a cada uno de los HAP.
- ❖ Realizar el fraccionamiento y subfraccionamiento de los extractos crudos para su posterior análisis por Cromatografía de Exclusión Molecular analítica en donde se estimará el peso molecular de los componentes proteicos inducidos o inhibidos durante la degradación de los HAP.
- ❖ Corroborar por electroforesis (SDS-PAGE) los PM encontrados por Cromatografía de Exclusión Molecular.

4. ANTECEDENTES

4.1. Hidrocarburos aromáticos policíclicos

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) son contaminantes ubicuos, recalcitrantes y perjudiciales para la salud, provocando desde anemia hasta cáncer (USEPA, 2017). Por tanto, es de interés la remoción y la biodegradación de los HAP logrando el entendimiento de los mecanismos involucrados.

Los HAP son un grupo de más de 100 compuestos diferentes y se conforman por la fusión de 2 o más anillos aromáticos contando con una configuración angular, lineal o de racimo. Los HAP cuentan con altos puntos de ebullición y fusión, alta hidrofobicidad, baja presión de vapor y resonancia de electrones; características que les confieren su carácter recalcitrante favoreciendo su amplia distribución (Suresh, et al., 2012).

4.1.1. Origen de los HAP

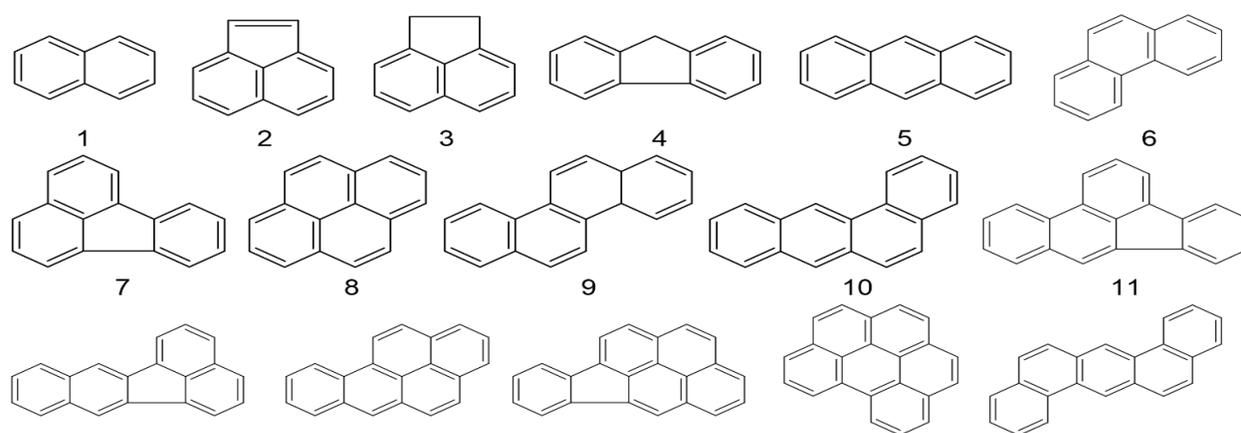
Los HAP son producto de la combustión incompleta de materiales orgánicos a altas temperaturas (500 – 800 °C) o deposición de estos a bajas temperaturas, 100 – 300 °C (Haritash y Kaushick, 2009). Por tanto, su origen se encuentra tanto en actividades antropogénicas como en procesos naturales como incendios o erupciones volcánicas favoreciendo su biodisponibilidad ambiental (Kaushick, 2006).

En el ambiente los HAP se encuentran como mezclas complejas (Cerniglia, 1993), los de bajo peso molecular suelen estar en fase gas, mientras los de alto peso molecular se unen a material particulado o materia orgánica (Zhang y Tao, 2009, Zhanget al.,2019), interactuando con componentes ambientales como el ozono atmosférico (Srogi, 2007). De esta manera, las condiciones ambientales determinarán su destino final (Alegbeleye et al., 2017), impactando la vía de exposición (Arey y Atkinson, 2003), al igual que sus propiedades fisicoquímicas (Kang et al., 2016). Por ejemplo, sus altos coeficientes de reparto carbón-agua ($\log K_{cw}$) y octanol-agua ($\log K_{ow}$) generarán procesos de acumulación y adsorción a la materia orgánica. Este proceso presente en organismos vivos recibe el nombre de bioacumulación, mientras que el incremento en la concentración del contaminante al avanzar por la cadena trófica se conoce como biomagnificación (Newman, 2014).

4.1.2. Exposición a HAP

El carácter hidrofóbico de los HAP permite su distribución en matrices adiposas por contacto, ingesta o inhalación generando diversas consecuencias como: el daño a riñones e hígado, anemia hemolítica, formación de aductos de ADN y cáncer (USEPA, 2017, Carrat, et al, 2019). Entre los HAP, *B[a]P* cuenta con un elevado nivel carcinogénico, siendo el índice de referencia de los demás HAP (Juhasz y Naidu, 2000).

Los HAP, debido a sus efectos insalubres y su amplia distribución, son monitoreados por organismos ambientales como la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA, por sus siglas en inglés). La USEPA en el año 1979 emitió una lista de 16 HAP, considerados para su investigación prioritaria, los cuales se muestran en la figura 4.1 junto con sus propiedades fisicoquímicas (Stellman et al., 20001; Haritash, 2009).



Compuesto	# de anillos	P.M. (g/mol)	Solubilidad (mg/mL)	Log K_{ow}	F.C. Vs <i>B[a]P</i>	Fusión °C	Ebullición °C
1. Naftaleno	2	128	31.7	3.37	0.001	80	218
2. Acenaftileno	3	152	16.1	4.00	0.001	92	280
3. Acenafteno	3	154	3.9	3.92	0.001	95	279
4. Fluoreno	3	166	1.8	4.18	0.001	116	295
5. Antraceno	3	178	0.07	4.54	0.01	216	342
6. Fenantreno	3	178	1.3	4.57	0.001	101	340
7. Fluoranteno	4	202	0.26	5.22	0.001	109	375
8. Pireno	4	202	0.14	5.18	0.001	393	150
9. Criseno	4	228	0.0006	5.91	0.01	254	448
10. Benzo[<i>a</i>]antraceno	4	228	0.002	5.91	0.1	159	435
11. Benzo[<i>b</i>]fluoranteno	5	252	0.0012	5.80	0.1	168	-
12. Benzo[<i>k</i>]fluoranteno	5	252	0.00055	6.00	0.1	217	480
13. Benzo[<i>a</i>]pireno	5	252	0.0033	5.91	1	179	495
14. Indeno[1, 2, 3, - <i>cd</i>]pireno	6	276	0.62	6.50	0.1	164	536
15. Benzo[<i>g</i> , <i>h</i> , <i>i</i>]perileno	6	276	0.00026	6.50	0.01	277	500
16. Dibenzo[<i>a</i> , <i>h</i>]antraceno	6	278	0.0005	6.75	5	262	-

P.M. : peso molecular *Solubilidad en agua.* *K_{ow}*: Concentración de una sustancia en una mezcla bifásica octanol agua 1:1 como mide la solubilidad diferencial de un soluto en los disolventes. *F.C.* Factor carcinogénico (Fuente: Kästner, 2000)

Figura 4.1. Estructura de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos de investigación prioritaria para la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos y sus principales propiedades fisicoquímicas.

Algunos metabolitos de los HAP cuentan con efectos más severos que los compuestos progenitores interactuando con proteínas celulares y generando efectos cancerígenos e incluso teratogénicos. Resultan de importancia los procesos de remoción de estos contaminantes, siendo los tratamientos químicos los más caros y peligrosos (Suresh, et al., 2012).

4.2. Procesos de eliminación de HAP por biodegradación.

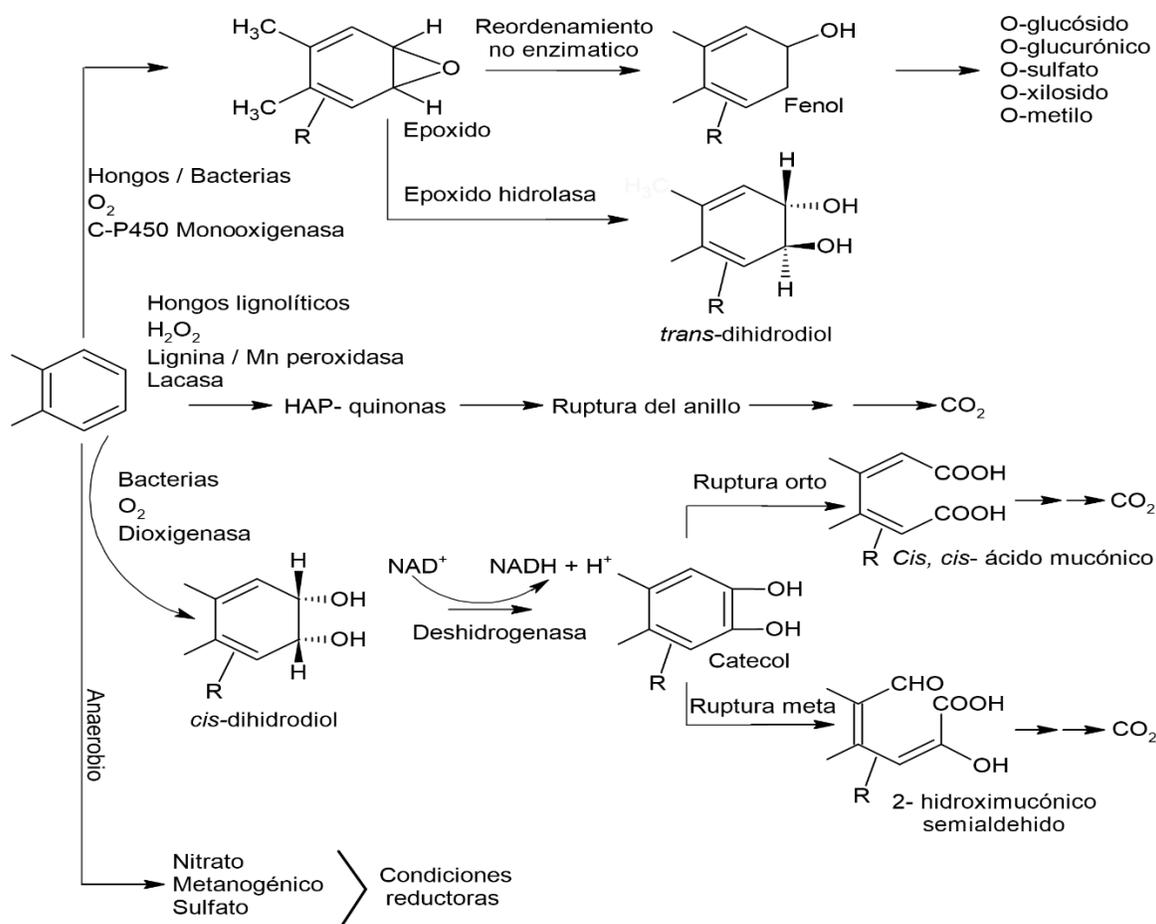
La biodegradación es una alternativa de remoción y degradación de los HAP que también puede ser usada en conjunto con procesos fisicoquímicos como: la incineración, extracción de peróxidos y procesos de calentamiento (Rivas et al., 2009 y Gaur et al., 2018). La biodegradación es un proceso realizado por organismos vivos para el manejo de contaminantes en el ambiente y se puede realizar a través de bacterias, hongos y plantas (Kanaly y Harayama, 2010; Koukkou y Vandera, 2011; Vila y Grifoll, 2009, Kim et al., 2008, Talano et al., 2012 y Lu et al., 2019).

El proceso de biorremediación transforma moléculas orgánicas complejas, como los HAP, a otras de carácter más simple denominados metabolitos. Esta conversión usa tres mecanismos: adsorción, absorción y degradación. Los dos primeros mecanismos solo remueven los contaminantes. La adsorción es independiente del metabolismo, por tanto, la unión entre grupos funcionales de los contaminantes y la superficie celular sucede en células vivas y muertas como con los metales que se enlazan a grupos carboxilo y fenol de *Chlorella vulgaris*, una microalga verde (Birungi y Chirwa, 2015). En la absorción, los contaminantes son ayudados por portadores que atraviesan la membrana celular acumulándose dentro de los sistemas vivos, como por ejemplo los HAP de bajo peso molecular que difunden pasivamente la membrana celular de *Pseudomonas fluorescens* LP6a (Bugg et al., 2000). La degradación por otra parte usa los HAP como fuente de carbono, mineralizándolos gradualmente por ataques oxidativos dirigidos por oxigenasas hidroxilantes. En la degradación participan sistemas enzimáticos que adicionan átomos de oxígeno formando productos de degradación que podrán ser incorporados en metabolismo central del sistema vivo (Haritash y Kaushik, 2009).

Factores ambientales como pH, temperatura, humedad, salinidad y contaminantes adicionales e igualmente la microbiota complementaria juegan un papel importante en los procesos de remoción y degradación (Suresh, et al., 2012). Por ejemplo, se ha publicado que metales pesados ralentizan los procesos mencionados inhibiendo el crecimiento microbiano por toxicidad (Ke et al., 2010 y Gojkovic et al., 2015). Además, la presencia conjunta de diferentes HAP de alto peso molecular está ligada al aumento

de toxicidad e inducción de la biodegradación (Rodríguez et al., 2013). Por otra parte, algunos microorganismos mesófilos a su temperatura óptima de crecimiento, 25 - 40 °C (Kadri et al., 2017) y bajo condiciones aerobias, se ha publicado favorecen el proceso de oxidación de HAP. (Jones et al., 2008 y Sayara et al., 2010). Este proceso en organismos procariontes y eucariontes se realiza por enzimas como *mono-oxigenasas*, *di-oxigenasas* o peroxidasas que logran la formación de radicales que desestabilizan los HAP (Bumpus et al., 1989 y Da Silva et al., 2004, Haritash y Kaushik, 2009). La oxidación que se realiza por este proceso puede ser del tipo: terminal, sub terminal u ω -oxidación (Beilen y Witholt, 2003).

La oxidación terminal sucede en el último carbono de un hidrocarburo lineal generando un grupo -OH que por acción de una deshidrogenasa y una aldehído-deshidrogenasa formará un aldehído y un ácido graso; respectivamente. Después, por una β -oxidación el metabolito se incorporará al metabolismo central, o por una ω -oxidación se realizará un segundo ataque oxidativo en el carbono terminal del extremo opuesto formando un ácido graso. La oxidación sub terminal formará un alcohol secundario que por deshidrogenación producirá una cetona sub terminal y después de un ataque oxidativo un éster. Este proceso romperá el hidrocarburo, formando una molécula de acetato y una de alcohol. Un proceso similar se observará en la oxidación de moléculas aromáticas. La figura 4.2. muestra las propuestas del inicio del proceso de biodegradación de HAP en bacterias y hongos además de las enzimas involucradas.



Enzima	Características	Tamaño del sustrato	Huésped
PMR, propano Mono-oxigenasas	Mono-oxigenasa hierro no-hemo similar a MMOs	C3	Bacterias
BMOs, butano Mono-oxigenasa	Mono-oxigenasa hierro no-hemo similar a MMOs	C2-C9	Bacterias
BMOp, butano Mono-oxigenasa	Mono-oxigenasa ligada a cobre	C2-C9	Bacterias
CYP153	C-P450 soluble	C5-C12	Bacterias
CYP52	C-P450 unida a membrana	C10-C16	Levaduras
Relacionadas con Alk B	Mono-oxigenasa hierro no-hemo	C3-C13, C10- C20	Bacterias
AlmA	Mono-oxigenasa unida a flavinas	C20-C30	Bacterias
LadA	Mono-oxigenasa termofilica dependiente de flavinas	C10-C30	Bacterias
Dioxigenasa	Dioxigenasa cobre dependiente de flavinas	C10-C30	Bacterias

Figura 4.2. Propuesta de biodegradación microbiana aerobia y anaerobia de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (Haritash y Kaushik, 2009). La tabla muestra las enzimas observadas al inicio de la biodegradación de alcanos, cicloalcanos y alquilbencenos (Beilen y Funhoff, 2007).

4.2.1. Biodegradación de HAP por bacterias

Distintos tipos de bacterias, entre ellos Gram (-) como *Pseudomonas* y Gram (+) formadoras o no de

esporas (Paenibacilos y Nocardias; respectivamente), han sido evaluados en el proceso de biodegradación de HAP involucrando la presencia de *di*-oxigenasas (Haritash y Kaushik, 2009). Si bien los genes descritos en las bacterias Gram (-) y Gram (+) asociados a la degradación de HAP son distintos entre sí, ambos codifican para el empleo de HAP en ciclos celulares (Suenaga et al., 2009, Kweon et al., 2010) describiendo una posible evolución conjunta. En bacterias al igual que en otros sistemas vivos la degradación de HAP está definida por su número de anillos, para aquellos de más de 5, el *B[a]P* es el modelo de degradación. La figura 4.3. muestra una propuesta de su proceso de degradación por bacterias.

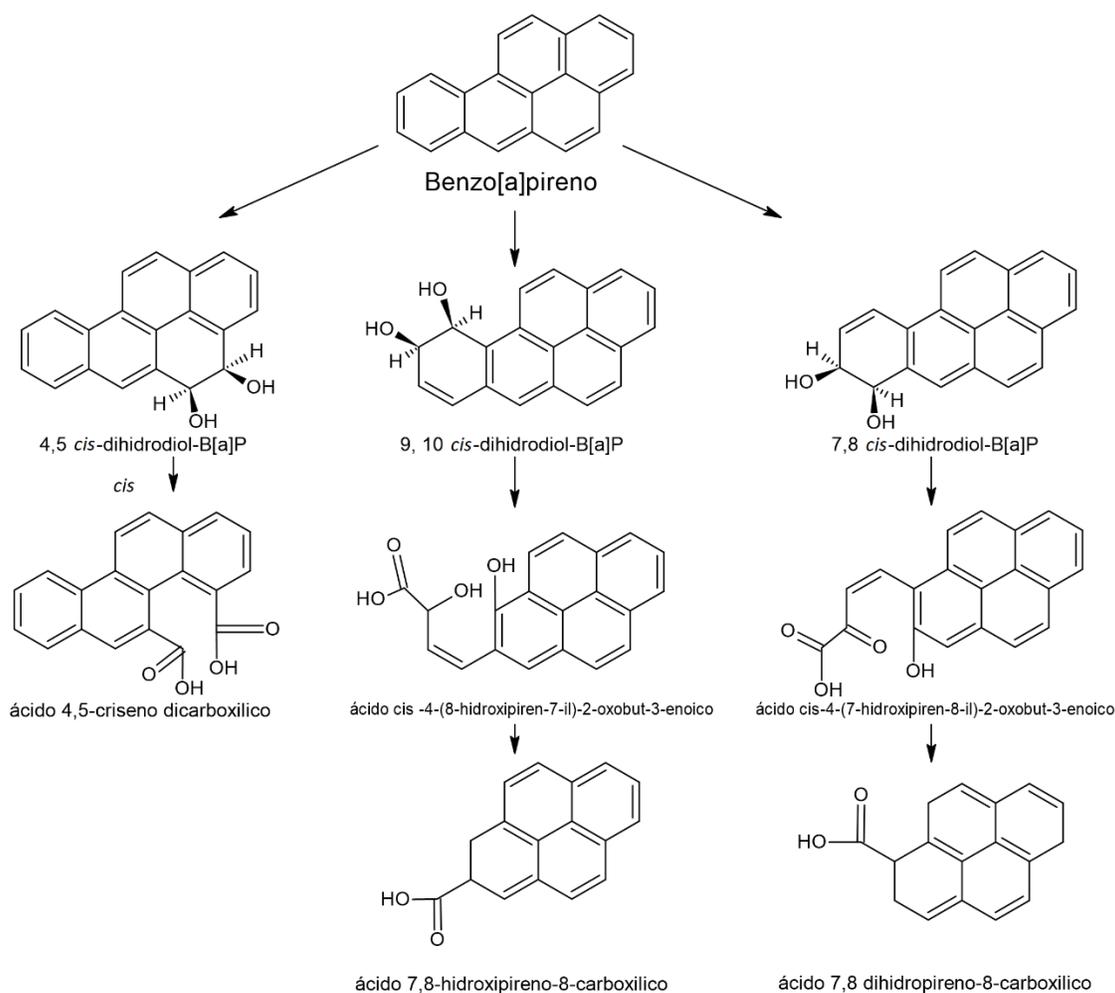


Figura 4.3. Degradación de *B[a]P* por bacterias. Los compuestos *cis*- 7,8- y 9,10- *dB[a]P* fueron separados después de incubar *Beijernickia B836* (Gibson et al., 1975). Además, *cis*- 4,5- y 9,10- *dB[a]P* fueron propuestos al aislar los ácidos 4,5-criseno di carboxílico y *cis*-4-(8-hidroxi-piren-7-il)-2-oxobut-3-enoico (Schneider et al., 1996). Las flechas en el esquema involucran múltiples pasos de degradación.

Como se ha observado en las bacterias, las *di*-oxigenasas forman parte de un complejo enzimático no ligado a membrana conformado por: reductasas (que catalizan la ganancia de electrones de un agente oxidante), hidroxilasas y ferredoxinas que en conjunto catalizan la adición de dos átomos de oxígeno a través de un proceso óxido-reductor aerobio que rompe el anillo aromático; proceso mediado por la aportación de 2 electrones a través de la coenzima NADH que actúa como agente reductor. (Cerniglia, 1993; Kanaly y Harayama 2000). Los electrones aportados se transfieren a una ferredoxina, proteína de bajo peso molecular con un núcleo de hierro-azufre (Cammack, 1992). La ferredoxina acarreará los electrones a una hidroxilasa con sitios de unión para el oxígeno y se incorporarán los dos átomos de éste.

En el proceso de degradación se producen metabolitos *cis-di*-hidroxilados los cuales pierden su aromaticidad (Wang et al., 2017). Posteriormente, el cofactor NAD⁺ reconstituirá el anillo formando catecol que será escindido en posición orto o meta entre grupos hidroxilos por un ataque mediado por *di*-oxigenasas. Finalmente, se formarán intermediarios del ciclo del ácido cítrico, parte del metabolismo central. La figura 4.4 muestra el proceso general de la degradación microbiana aeróbica.

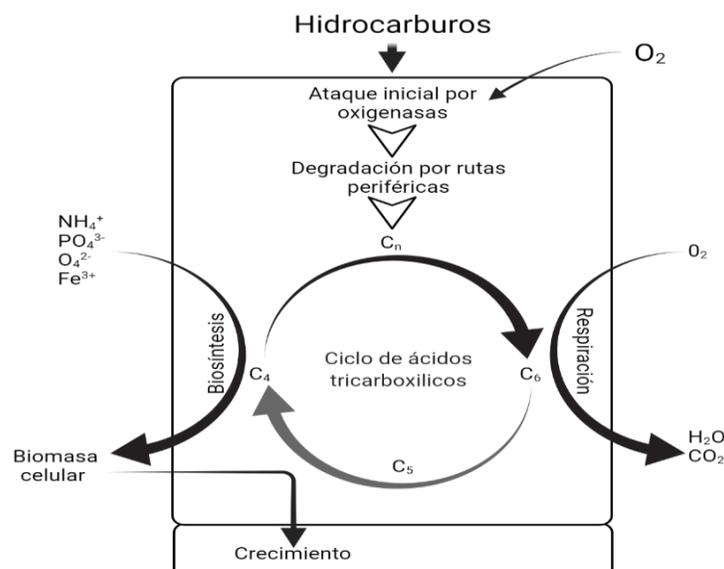
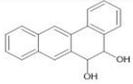
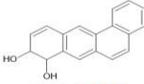
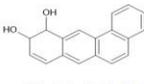
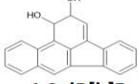
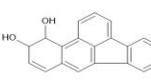
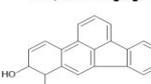
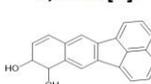
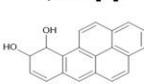
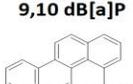
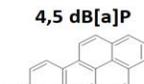


Figura 4.4. Proceso general aerobio de biodegradación microbiana de hidrocarburos ligado a la producción de biomasa (Fritsche y Hofrichter, 2008).

La tabla 4.1. muestra características fisicoquímicas de algunos metabolitos de HAP de alto peso molecular (Heitkamp et al., 1988a; 1988b; Kelley et al., 1990). Las condiciones anaerobias no suelen ser

favorecedoras y la degradación sucede en presencia de moléculasceptoras de electrones como NO_3^- , SO_4^{2-} , CO_2 , Fe^{3+} (Rainer y Housna, 2011 y Boopathy, 2017).

Tabla 4.1. Características fisicoquímicas de metabolitos tipo *di*-hidrodíol provenientes de la degradación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos de alto peso molecular.

Compuesto	# de anillos	P. molecular g/mol	Fusión °C	Ebullición °C	Solubilidad $\mu\text{g L}^{-1}$ (a)	Log K_{ow} (b)
 5,6 dB[a]A	4	262.3	198	460	2.05	4.56
 8,9 dB[a]A	4	262.3	178	496	1.87	3.25
 10,11 dB[a]A	4	262.3	178	475	1.87	3.42
 1,2 dB[b]F	5	286.32	200	470	0.214	2.53
 11,12 dB[b]F	5	286.32	200	470	0.214	2.53
 9,10 dB[b]F	5	286.32	202	478	0.67	4.39
 8,9 dB[k]F	5	286	212	498	0.43	4.01
 9,10 dB[a]P	5	286.32	210	499	0.43	4.01
 4,5 dB[a]P	5	286.32	218	512	0.61	3.83
 7,8 dB[a]P	5	286.32	218	512	0.42	4.01

a: 20 °C

b: Valores obtenidos con el software USEPA (2012) Estimation programs Interface suite™ for Microsoft v 4.10 USEPA, Washington, DC, USA

Un proceso de degradación a cargo de un sistema multicomponente microbiano se ha observado en *Pseudomonas sp. LB400* frente benceno, naftaleno y tolueno, que cuenta con tres fracciones proteicas solo activas en conjunto. En este proceso se describieron involucradas *di*-oxigenasas, flavoproteínas y el cofactor NADH que en conjunto median la ruptura de los anillos aromáticos y la degradación *di*-hidrodioles (Haddock et al., 1993). Este sistema multicomponente también se describió en la degradación de naftaleno de nueva cuenta por *Pseudomonas sp. NCIB 9816* presentando una *di*-oxigenasa colectada a través de 3 fracciones las cuales mostraron actividad en una relación 1:1:1 y de nueva cuenta en presencia del cofactor NADH (Enseley et al., 1981).

4.2.2. Biodegradación de HAP por hongos

Como se ha mencionado, los sistemas eucariontes como los hongos son capaces de degradar HAP con enzimas que se presentan en función de los contaminantes de exposición y la composición del sustrato. Los hongos lignolíticos como: *Bjerkandera adusta*, *Phanerochaete chrysosporium* y *Pleurotus ostreatus* cuentan con enzimas *mono*-oxigenasas que incrustan un átomo de oxígeno al anillo de benceno mientras un átomo más de oxígeno es reducido hasta la formación de agua (Suresh, et al., 2012). La figura 4.5. muestra una propuesta del proceso de degradación de *B[a]P* por hongos.

Los sistemas de enzimas extracelulares lignolíticas degradan e incluso mineralizan HAP de bajo peso molecular (Cajthaml et al., 2002) por oxidación a través de la formación de cationes radicales y subsecuentes quinonas (Vyas et al., 1994). Estos sistemas están conformados por tres grupos de enzimas degradadoras de HAP: peroxidasa de lignina, fenol oxidasa (lacasa, tirosinasa) y peroxidasa (Hofrichter et al., 1998 y Mori et al., 2015).

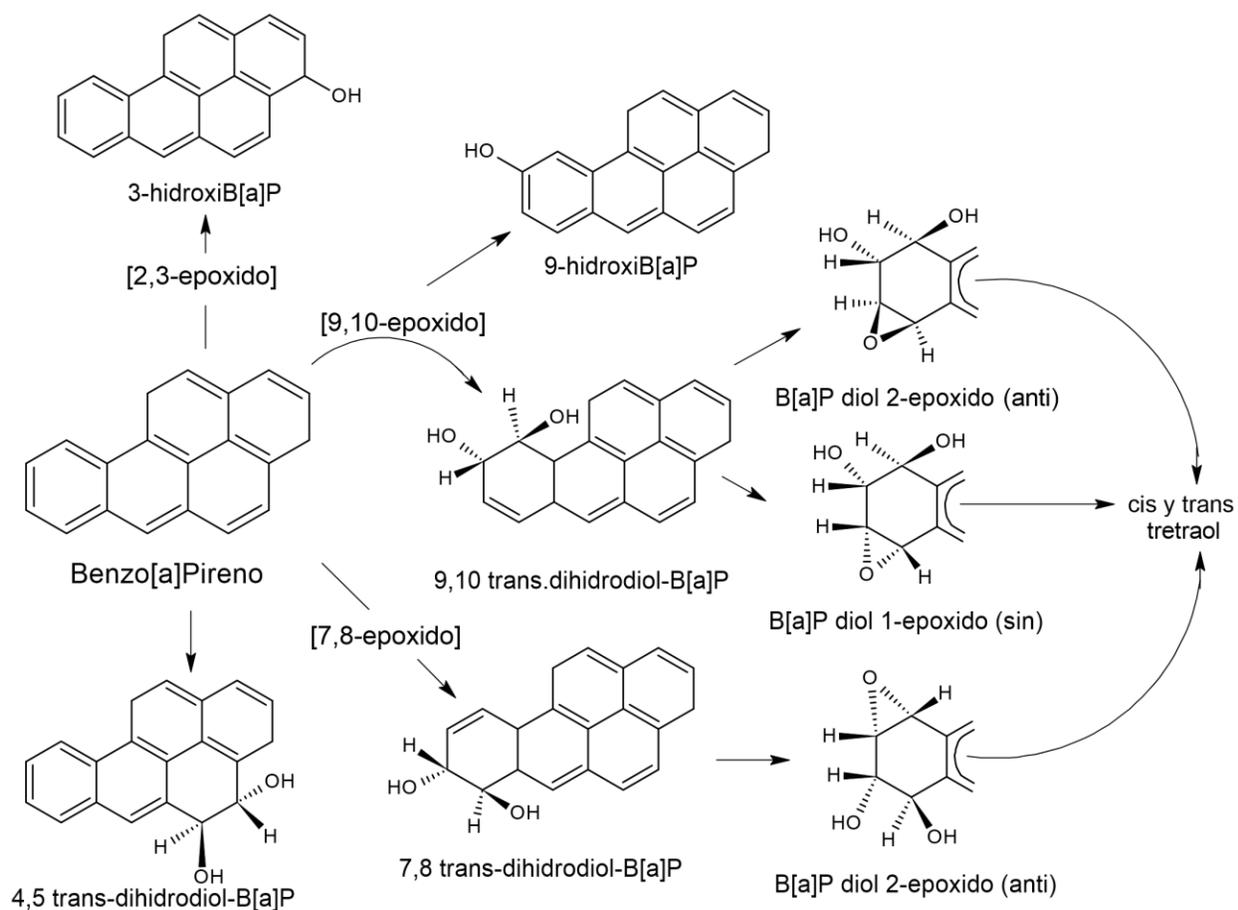


Figura 4.5. Degradación de *B[a]P* por hongos a compuestos hidroxilados y dihidrodiolos vía epóxidos y *diol*-epóxidos para obtener *cis*- y *trans*- tetraol (Juhasz y Naidu, 2000)

En levaduras, la presencia de *mono*-oxigenasas, hidrolasas y el sistema citocromo P-450 reorganizan los HAP en compuestos *mono*-hidroxilados para degradarlos en *trans*-di-hidrodiolos y posteriormente generar una ruptura orto o meta entre carbonos hidroxilados o entre carbono y carbono hidroxilado; respectivamente (Cerniglia et al., 1985). Este proceso genera compuestos *mono*-aromáticos como catecol y protocatecuato parte del metabolismo central. La figura 4.6. ilustra un proceso de degradación observado en hongos. La degradación de *B[a]P* por hongos además de generar los metabolitos mencionados también involucra la formación de quinonas y tetrahidroxilados (Haemmerli et al., 1986).

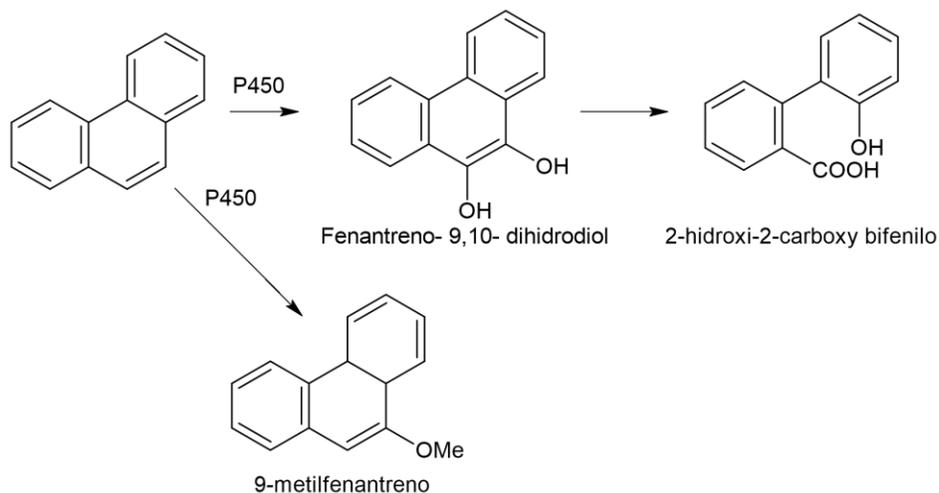


Figura 4.6. Mecanismo de degradación de fenantreno por el hongo *Irpex lacteus* (Haritash y Kaushik, 2009)

4.2.3. Biodegradación de HAP por microalgas

La amplia biodegradación de HAP de bajo peso molecular estudiada en microalgas como *Chlorella vulgaris* (Kong et al., 2010), *Scenedesmus platydiscus*, *Scenedesmus quadricauda* y *Selenastrum capricornutum* (Lei et al., 2007) contrasta con la poca investigación de la biodegradación de HAP de alto peso molecular como *B[a]P* o *B[a]A*. En la biodegradación de HAP de alto peso molecular se ha usado, entre otras microalgas, a *Selenastrum capricornutum* como modelo de degradación obteniendo *di*-hidrodioles, hidróxidos y quinonas (Warshawsky et al, 1995; Olmos- Espejel et al., 2012; García de Llasera et al, 2016). La figura 4.7. muestra la hidroxilación de compuestos *mono*- y *poli*- cíclicos y su ruptura por oxigenasas para posteriormente participar en el metabolismo central. Sin embargo, no existe identificación del sistema enzimático involucrado en la degradación de los HAP por microalgas.

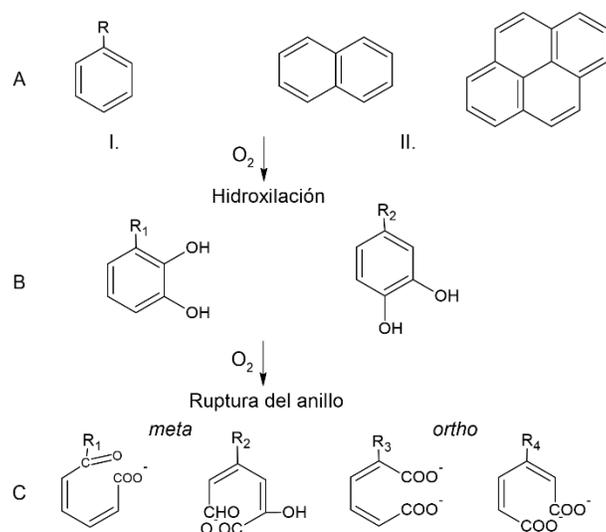


Figura 4.7. Degradación de compuestos *mono-* y *poli-* aromáticos por acción de *mono-* y *di-*oxigenasas. Se muestra en las secciones A) I. Hidrocarburos aromáticos mono y policíclicos, A) II. Naftaleno y Pireno, B) sustratos de *mono-* y *di-*oxigenasas y C) metabolitos intermediarios comunes en la ruptura meta y orto del anillo (Izquierdo, 2013)

La identificación de *cis*-dihidrodiolos en la biodegradación de HAP por microalgas verdes ha permitido el establecimiento de la presencia de *di*-oxigenasas (Warshawsky, et al., 1995). Por otra parte, la presencia de compuestos monohidroxilados ha determinado la acción conjunta de *mono*-oxigenasas y el sistema citocromo P-450 (Ke, et al., 2010). La biodegradación y vida media de los contaminantes depende de factores como las características del sistema vivo, el medio de contención e interacción microbiana. Algunas microalgas capaces de degradar HAP (Suresh, 2016), adicionalmente, han presentado efectos de degradación sinérgica ante la presencia de más de un HAP o sistema vivo (Haritash y Kaushick, 2009).

La evaluación de la biodegradación de HAP por microalgas verdes ha mostrado que el proceso cuenta con similitudes con la degradación fúngica transformando a los HAP en *trans*-dihidrodiolos y quinonas (Subashchandrabose et al., 2015). En contra parte Warshawsky y colaboradores (1995) propusieron que las microalgas generan *cis*-dihidrodiolos por acción de *di*-oxigenasas como en sistemas procariontes heterotróficos.

4.2.3.1. Microalgas de interés en degradación de HAP

La nutrición de las microalgas puede ser heterótrofa, autótrofa o la mezcla de ambas. La fotosíntesis, vía principal de su nutrición, emplea la clorofila α para absorber luz en el intervalo de 430 a 663 nm, al igual que las plantas superiores. Su estrecha relación con las plantas, además de bacterias, hongos y

protozoarios otorga variabilidad en su clasificación taxonómica teniendo una agrupación artificial (Dreckmann, et al., 2013).

La estructura de las microalgas es eucariótica, excepto por las verde-azules que son procariotas. Pueden contar con flagelos como estructuras de locomoción, su pared celular está formada por celulosa, glicoproteínas e incrustaciones de sílice o carbonato de calcio. Sus cloroplastos le aportan carácter estructural mientras los tilacoides paralelos a la membrana pueden semejar hasta cuatro cubiertas más. Sus reservas de almidón se distribuyen en el citoplasma en forma de gránulos (Rojo, 2010).

La reproducción con la que cuentan las microalgas es sexuada o asexuada con recombinación genética o sin ella; respectivamente. Se desarrollan predominante en sistemas acuáticos o en asociación con un sustrato. La adaptación y evaluación conjunta de diferentes cepas de microalgas se ha evidenciado por transferencia genética, enriquecimiento selectivo, hibridación de colonias y componentes proteicos similares como algunas *di*-oxigenasas (Suresh, et al., 2012, Dreckmann, et al., 2013).

Se ha publicado que las microalgas verdes son capaces de degradar hidrocarburos alifáticos e HAP al ser una fuente de carbono ideal. Algunas especies que cuentan con esta capacidad son *Scenedesmus acutus*, y *Selenastrum capricornutum* entre otras (Izquierdo, 2013; Olmos, et al., 2012). A través del tiempo se han estudiado mediante distintos métodos los procesos de degradación de diferentes contaminantes, como el de los HAP, realizados por diferentes microalgas verdes. La tabla 4.2. muestra algunos de estos estudios.

Tabla 4.2. Métodos para el estudio de la biodegradación de contaminantes por empleo de microalgas (Subashchandabrose, et al., 2013).

Contaminante	Alga	Método	Referencia
Substitutos de anilina y fenoles	<i>Scenedesmus obliquus</i>	Relación cuantitativa estructura-actividad	Lu et al. (2007)
Cu, Cd y Zinc	<i>Chorella sp.</i>	Diseño de mezcla terciaria	Franklin et al. (2002)
Cd y antraceno	<i>Desmodesmus subspicatus</i>	Prueba de inhibición de crecimiento	Baścik-Remisiewicz et al. (2011)

Contaminante	Alga	Método	Referencia
Fármacos	<i>Pseudokirchneirella subcapitata</i>	Longitud de polimorfismo de fragmentos amplificados (ALFP) y análisis proteico 2-DE	Vannini et al. (2011)
Diferentes compuestos orgánicos	<i>Scenedesmus vacuolatus</i>	Concepto de acción independiente y concentración de adiciones	Walter et al. (2002)
Cu y Cd	<i>Chlorella vulgaris</i>	Transcripción de genes por dos vías, prueba de ANOVA	Qian et al. (2009)
Fenantreno, B[a]P, Cd y Pb	<i>Chlorococcum sp.</i>	Estudios por diseño factorial	Suresh et al. 2013

4.2.3.1.1. *Scenedesmus acutus*

Scenedesmus es un género de microalga verde con más de 70 especies (Guiry, 2015). De entre ellos *Scenedesmus acutus* es una microalga verde clorofita unicelular, de forma alargada a causa de sus polos celulares, con paredes lisas, cenobial, agrupada comúnmente en pares, no móvil. Es formadora de colonias comúnmente en agua potable. Esta especie es usada en la obtención de biocombustibles (Timmins, et al., 2009; Kapdan, et al., 2006). La figura 4.8A muestra este microorganismo.



Figura 4.8. Microalgas usadas en la investigación. A) *Scenedesmus acutus* (Y. Tsukii, Japón, 2003) B) *Scelenastrum capricornutum* (Virág Hajnalka, Hungría, sin reporte de año).

4.2.3.1.2. *Selenastrum capricornutum*

Selenastrum capricornutum es una microalga verde clorofita unicelular, no móvil, con forma de medialuna y un volumen aproximado de 40 a 50 μm^3 . Esta microalga, proveniente de sistemas acuáticos epicontinentales eutróficos u obligatorios, es sensible a sustancias tóxicas, por tanto, su crecimiento se usa para evaluar la calidad del agua (ISO, 1989, Environment Canada, 2007). La figura 4.8. B muestra este microorganismo.

Las dos microalgas descritas en las 2 secciones previas han sido empleadas para evaluar el proceso de degradación de los HAP otorgando datos de remoción de diferentes HAP y el tipo de metabolitos generados en la degradación. La tabla 4.3. resume algunos estudios de biodegradación de HAP por *Selenastrum capricornutum* y *Scenedesmus acutus* publicados en la literatura.

Tabla 4.3. Estudios de biodegradación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos por uso de las microalgas *Selenastrum capricornutum* y *Scenedesmus acutus*

Referencia	Especie	Exposición ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Metabolitos generados	% Remoción / t. exposición (días)
Warshawsky <i>et al.</i> , 1995	<i>S. capricornutum</i> <i>S. acutus</i>	<i>B[a]P</i> 40 a 1200	dihidrodióles-HAP, quinonas, hidroxi-HAP	99% y 97.4% / 4
Lei <i>et al.</i> , 2003	<i>S. capricornutum</i>	Pireno 0.1	SR	88.4% / 0.5
Chan <i>et al.</i> , 2006	<i>S. capricornutum</i>	Pir, fen, flu, <i>B[a]P</i> 0.1 a 1.0	dihidrodióles, hidroxi-HAP dihidrodióles	96 - 100% / 7 99% / 0.67 (<i>B[a]P</i>)
Warshawsky <i>et al.</i> , 2007	<i>S. capricornutum</i>	<i>B[a]P</i> 0.16	hidroxi- <i>B[a]P</i> y dihidrodióles	50% / 14
Lei <i>et al.</i> , 2007	<i>S. capricornutum</i>	Flu, Fen, Pir, <i>B[a]P</i> 0.10 a 1.0	hidroxi-HAP y benzopiranona	40-90% / 7
Ke <i>et al.</i> 2010	<i>S. capricornutum</i>	Flu, Fen, Fluoreno, <i>B[a]P</i> , Pir 0.15 a 1	Hidroxi-HAP, quinonas, dihidroxi-HAP	75-92% / 7
Olmos-Espejel <i>et al.</i> , 2012 García de Llasera <i>et al.</i> , 2016	<i>S. capricornutum</i> <i>S. acutus</i>	<i>B[a]P</i> 0.26	dihidrodióles	95% / 3

4.3. Lisis celular

La extracción de componentes intracelulares por lisis celular permite su evaluación. La lisis se puede realizar por métodos físicos, químicos o biológicos y se pueden obtener componentes proteicos con los que se puede evaluar la biodegradación de HAP. La selección del método de extracción dependerá de las características del sistema y del producto intracelular (pureza y resistencia); determinando las operaciones a realizar, el tiempo y costo. Los principales métodos de lisis celular se presentan en la tabla 4.4. Posteriormente, se describirá el método de lisis por ultrasonido, que es el que se utilizó en este trabajo.

Tabla 4.4. Principales métodos físicos, químicos y biológicos de lisis celular

	Métodos físicos	Métodos químicos	Métodos biológicos
● Medio líquido	● Ultrasonido	● Tratamiento con ácido	● Enzimas digestivas
	● Liofilización	● Detergentes	● Fagos
	● Prensas Gaulin / Manton	● Extracción con disolventes	● Agentes inhibidores de pared celular
● Medio sólido	● Prensa de French	● Cambio en la presión osmótica	
	● Molinos Dyno / Coloidal		
	● Molino de perlas		
	● Prensas X / Hughes		
	● Congelación-descongelación		

4.3.1. Ultrasonido como método de lisis celular

El ultrasonido es usado en tratamientos de desinfección, filtración, deshidratación y extracción además de procesos médicos (Posch, 2008). Los equipos de extracción por ultrasonido emplean medios líquidos y generadores eléctricos, magnéticos o cinéticos que por empleo de un transductor generan energía acústica rondando los 20 KHz (Adam, et al., 2012).

La energía acústica generará zonas de baja presión que evaporarán rápidamente el líquido formando burbujas de gas colapsando por diferencias de presión, provocando un flujo acelerado con una tensión de corte sobre las células de hasta 10 kilo Pascal. Este proceso conocido como cavitación genera poros hasta la necrosis de la célula (Yuan et al., 2015), efectos dependientes de factores como la intensidad, señales de transducción intracelular, reorganización del citoesqueleto, cambios en la expresión de genes y la síntesis de proteínas (Lecina, et al., 2016).

El ultrasonido como método de extracción es eficiente, económico y ecológico frente a los métodos

químicos o biológicos (Posch, 2008). La tabla 4.5. muestra estudios de microalgas en donde se usó el ultrasonido.

Tabla 4.5. Ejemplos de estudios que usaron ultrasonido para la lisis de microalgas

Autor (año)	Especie	Frecuencia e intensidad	Volumen	Tiempo (min)	Efectividad
Simon (1974)	<i>Anabaera cylindrica</i>	No publicada; 1000 W cm ⁻³	100 µL	2	75% de las proteínas son liberadas
Tang et al (2003)	<i>Spirulina plantensis</i>	1.7 MHz; 0.6 W cm ⁻³	No publicado	9	Inhibición del crecimiento
Hao et al (2004)	<i>Spirulina plantensis</i>	1.7 MHz; 0.07 W cm ⁻³ 20 kHz; 0.014 W cm ⁻³	800 mL	5	~50% destrucción 33.33% destrucción
Mahvi y Dehghani (2006)	<i>Cyanobacteria</i>	42 kHz; 0.07 W cm ⁻³	1000 mL	2.5	100% destrucción
Zhang et al (2006)	<i>Microcystis aeruginosa</i>	20 kHz; 0.08 W cm ⁻³ 1320 kHz; 0.08 W cm ⁻³	1000 mL	10	14.29% destrucción 55% destrucción
Joyce et al. (2010)	<i>Microcystis aeruginosa</i>	40 kHz; 0.021 W cm ⁻³ 864 kHz; 0.049 W cm ⁻³	200 mL	30	Aglutinación 21.3% destrucción
Pawalee et al (2011)	Crecimiento natural de microalgas	200 kHz; 0.015 W cm ⁻³	200 mL	30	94.9% destrucción
Wu (2011)	<i>Microcystis aeruginosa</i>	40 kHz; 0.0466 W cm ⁻³ 864 kHz; 0.0929 W cm ⁻³	400 mL	30	4.31% destrucción 61.11% destrucción

4.3.1.1. Tipos de ultrasonido

Por intensidad de emisión los equipos se clasifican de intensidad baja (100 KHz a 1 MHz) y de intensidad alta o de potencia (18-100 KHz) y son usados en procesos de monitoreo y extracción; respectivamente. Los más usados son los de potencia que procesan una muestra generando cambios físicos y químicos en ella (Azuola y Vargas, 2015). Por el transductor con el que pueden contar los equipos de ultrasonido se clasifican en los de manejo de líquidos y cuentan con un vibrador que homogeneiza y mezcla; los magnéticos que generan un cambio de dimensiones por un flujo magnético, siendo de gran potencia, pero con menor eficiencia eléctrica y los piezoeléctricos que con cristales generan vibraciones de alta frecuencia amplificadas por un cono metálico con una eficiencia > 95% y capacidad de usar distintas frecuencias, volviéndose los más usados. (Posch, 2008).

4.3.1.2. Ventajas y desventajas de los métodos ultrasónicos

Los elevados requerimientos de energía en los equipos de ultrasonido generan altas temperaturas de operación que pueden dañar los componentes celulares termolábiles por formación de radicales libres o vórtices que aumentan la tensión de corte (Li, et al., 2012). Su control se puede lograr con el ajuste de volumen total de la muestra, de ciclos y de potencia, con periodos intermedios sin cavitación permitiendo el enfriamiento de la muestra. (Posch, 2008).

Factores adicionales que afectan el proceso de extracción por ultrasonido son: adhesión, propiedades celulares, tipo y volumen de disolventes a emplear, además de la composición de la muestra (Azuola y Vargas, 2007). En conjunto incrementan la reactividad, el rendimiento de las reacciones, y la descomposición molecular (Posch, 2008).

4.3.1.3. Lisis de microalgas por ultrasonido

Las células más sensibles a las ondas ultrasónicas son las de origen animal después las bacterias Gram (-) y bacterias Gram (+). Siendo las levaduras las menos afectadas y las esporas, el componente celular más resistente (Yuan et al., 2015). La composición de las microalgas es similar a la de bacterias Gram (-) lo que abre la posibilidad de emplear el ultrasonido para degradar la pared celular y extraer componentes intracelulares.

Los equipos útiles en la lisis de microalgas, ilustrados en la figura 4.9., cuentan con una demanda

energética de 100 a 400 w y una salida acústica que comienza en los 20 KHz. Cuentan con parámetros modulables como intensidad, temperatura y tiempo de ejecución incluso por ciclos (Posch, 2008). Algunos equipos cuentan con sondas intercambiables (sonotrodos).

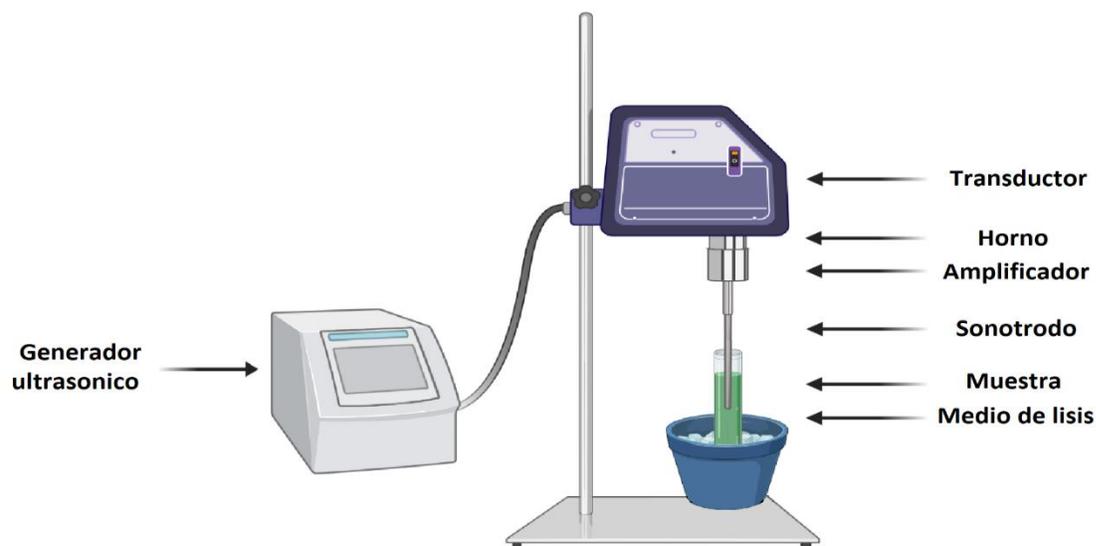


Figura 4.9. Esquema instrumental de un equipo de ultrasonido por sonda.

Se ha observado que los medios líquidos de microalgas sometidos a ultrasonido moderado pierden su flotabilidad, sin efectos perjudiciales mostrando cambios limitados en la superficie del sistema y estrés dentro de la célula (Lecina, et al., 2015), favoreciendo la visualización de componentes intracelulares por la dispersión de las burbujas de gas en su interior. Al aumentar la energía proporcionada, la concentración extracelular de clorofila aumenta asumiendo una ruptura celular (Lecina et al., 2017, Wu et al., 2011). Los efectos del ultrasonido se ilustran con algas verde-azules y microalgas listadas en la tabla 4.7.

Tabla 4.7. Principales efectos provocados por tratamiento ultrasónico en algas verde-azules y microalgas (Lecina, et al, 2017)

Energía	Microalga	Objetivo	Frecuencia	kWh ⁻¹ / m ⁻³	Mecanismo	Referencia
	<i>Arthrospira platensis</i>	Extracción de β carotenos	20 KHz	214.8		Dey y Rathod (2013)
Alta	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Inhibición de crecimiento ruptura celular	25 KHz	26.67	Cavitación transitoria	Zhang et al. (2006)

Energía	Microalga	Objetivo	Frecuencia	kWh ⁻¹ / m ⁻³	Mecanismo	Referencia
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Disrupción celular	20 KHz	22.2		Gerde et al. (2012)
Separación ultrasónica	<i>Monodus subterraneus</i>	Agregación celular	2.1 MHz	16-24	Agregación inducida	Bosma et al. (2003)
Baja	<i>Arthrospira sp</i>	Ruptura de vesículas de gas	20 KHz	1.1 - 2.2.	Cavitación estable	Lecina, et al. (2017)

Con la microalga *Chorella vulgaris* sometida a ultrasonido se demostró una destrucción del 56.7% al contar con una pared celular robusta. Su pared compuesta por ácido úrico que varía el pH y la viscosidad provocó el aislamiento de componentes celulares de modo que, los medios de lisis deben estar compuestos por amortiguadores como el amortiguador TRIS o el amortiguador O'Farrell para favorecer la digestibilidad, mantener estables los componentes celulares extraídos (Janczyk, 2005) y posteriormente analizarlos por técnicas analíticas como Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (Li et al., 2012).

4.4. Cromatografía de exclusión molecular

La Cromatografía de Exclusión Molecular conocida también como filtración sobre gel o permeación sobre gel, es útil en el fraccionamiento de muestras, purificación y separación de biomoléculas como proteínas, enzimas, polisacáridos, ácidos nucleicos y otras macromoléculas. Cuenta con una fase estacionaria porosa que permite la elución diferencial de los solutos en función de su tamaño, y/o forma molecular, disminuyendo la complejidad de la muestra y el empleo de técnicas posteriores permitiendo el análisis de componentes menos abundantes (UAH, 2017).

Este proceso cromatográfico no depende de interacciones fisicoquímicas entre los analitos y la fase estacionaria, la cual cuenta con una adsorción mínima de los componentes de tal manera que el amortiguador de trabajo (fase móvil), no afecta la resolución y con un flujo isocrático se pueden obtener los componentes de interés. Cromatografía de Exclusión Molecular permite un análisis automático de biomoléculas sensibles a cambios de pH y condiciones ambientales, además de muestras con iones metálicos o cofactores pudiendo tratarlas a un intervalo amplio de temperaturas sin necesitar tratamientos posteriores obligados. Y lo más importante, posibilita la extracción secuencial de los componentes por su PM favoreciendo el proceso de purificación, y posterior almacenamiento de las

fracciones. El fraccionamiento sucede sobre el gel y por dentro de éste usando disolventes acuosos (Life Ciencias, 2017). La Cromatografía de Exclusión Molecular consta de tres modalidades: preparativa, analítica y de desalado.

4.4.1 Modalidades exclusión molecular

La modalidad preparativa separa dos o más biomoléculas a través del fraccionamiento de la muestra correspondiente del 0.5 al 4 % del volumen total de la columna (V_t), a un flujo bajo, para su análisis o almacenamiento. El tamaño habitual de las partículas de la fase ronda los 12 μm , en función del tamaño y la calidad del empaquetamiento se proporcionará una resolución de moderada a alta. La longitud de las columnas está en el intervalo de 30 a 100 cm. La altura y el diámetro del empaque determinarán el volumen de muestra, volúmenes pequeños de muestra pueden eluir por gravedad.

La modalidad analítica se emplea para realizar el análisis de los componentes de una muestra sin un proceso obligado de fraccionamiento. El análisis emplea detectores Ultravioleta con arreglo de fotodiodos, de dispersión de luz de multiángulo o de fluorescencia, además de espectrómetros de masa. Esta modalidad es útil en la evaluación de la calidad y propiedades de una muestra con un volumen del 0.3 al 0.5 % del V_t de la columna y una longitud promedio de 30 cm. El tamaño de partícula de las fases ronda los 4 a 12 μm proveyendo una alta resolución en columnas pre-empacadas. La precisión y reproducibilidad se favorece con sistemas de cromatografía líquida en lugar de emplear bombas peristálticas o flujo a gravedad.

La metodología de desalado e intercambio de amortiguador se usa para separar moléculas pequeñas, como la sal, de moléculas más grandes como las proteínas; proceso útil para el análisis cromatográfico y almacenamiento posterior. El volumen de la muestra puede alcanzar hasta el 30 % del V_t de la columna (10 cm de longitud promedio) empacada con partículas grandes que generan una contrapresión baja a flujos altos. La separación y análisis de los componentes de las muestras se pueden estudiar por ciertos parámetros cromatográficos.

4.4.2. Parámetros cromatográficos en exclusión molecular

Los resultados de esta técnica se expresan gráficamente en cromatogramas que muestran la concentración y elución de los componentes de la muestra de acuerdo con su tamaño molecular. Las moléculas grandes son acarreadas junto con el volumen de vacío (V_0 , aproximadamente, el 30% del

volumen total de la columna) mientras las moléculas de menor tamaño saldrán ligeramente antes del volumen geométrico que ocupa la fase (V_c).

El volumen de elución (V_e) de los componentes, a veces referido como volumen de retención (V_r) se puede observar gráficamente en los cromatogramas y varía en función del volumen de la muestra aplicado y las características del empaque de la columna. El factor de distribución o de reparto " K_d " define la elución de un componente como su distribución entre dos fases, independientemente de las dimensiones de la columna (ecuación 1).

$$\text{Ecuación 1. } K_d = \frac{\text{concentración del soluto en la fase estacionaria}}{\text{concentración del soluto en fase móvil}}$$

El volumen de la fase móvil entre las partículas de la fase compondrá el V_o mientras el volumen dentro corresponderá al volumen del poro (V_i), las moléculas pequeñas eluyen con el (V_t) de la columna, suma de los dos primeros volúmenes y que en conjunto describen el K_d como se muestra en la ecuación 2:

$$\text{Ecuación 2. } K_d = \frac{V_e - V_o}{V_i} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

De esta manera los componentes grandes tendrán un K_d cercano a 0 y los más pequeños mostrarán un valor de K_d cercano a 1. Valores > 1 reflejarán efectos de adsorción no específicos y valores alrededor de 0 mostrarán la formación de canales y la necesidad de *re*-empacar la columna. Al ser difícil de determinar el V_i se suele cambiar por la constante de distribución promedio (K_{av}) sustituyendo el V_t por el V_c . La K_{av} suele ser más sensible a variaciones de parámetros como el flujo siendo importante la determinación del V_c de la fase, su determinación se muestra en la ecuación 3.

$$\text{Ecuación 3. } K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_c - V_o}$$

Se ha observado que los PM de los componentes y su elución cuentan con una relación sigmoidea. Por tanto, se emplean los logaritmos de los PM para construir curvas de calibración y evaluar la selectividad de las columnas, característica dependiente de la distribución del tamaño de poro de las fases, obteniendo pendientes menos pronunciadas para moléculas globulares.

El intervalo de fraccionamiento de una fase refiere los PM con acceso parcial entre los poros. Por lo tanto, el límite de exclusión (LE) determinará las moléculas que serán excluidas y acarreadas por el V_0 , el cual puede ser determinado por la curva de calibración. La cual al contar con una pendiente pronunciada mostrará una mejor separación (alta selectividad). La selección de la fase debe procurar que los componentes de interés se encuentren dentro del intervalo lineal.

La Cromatografía de Exclusión Molecular solo se impacta por efectos estéricos, pero existen algunas interacciones generadas por la fase y biomoléculas altamente cargadas con una fuerza iónica muy baja. Por ejemplo, las moléculas aromáticas que eluyen en fases densas presentarán interacciones hidrofóbicas. Estas interacciones adicionales se pueden contrarrestar con la selección adecuada del amortiguador de corrida.

La resolución (R_s) de los componentes es el grado de separación de estos y depende de la selectividad de la fase y el ensanchamiento de los picos cromatográficos afectado por factores como las características y calidad de la fase y de la columna, el volumen de la muestra, el flujo, la viscosidad de la fase móvil y el equipo usado en el proceso. La expresión de R_s se muestra en la ecuación 4.

$$\text{Ecuación 4. } R_s = \frac{V_{e2} - V_{e1}}{1/2 (w_1 + w_2)}$$

Donde V_{e1} y V_{e2} son el volumen de elución de dos compuestos adyacentes y w_1 y w_2 son el ancho a la base de los picos de interés. La R_s se afectará por la calidad del empaquetamiento de la fase siendo inevitable la dilución de la muestra fenómeno conocido como difusión. La separación se limitará por el V_c y se caracterizará por la determinación de los platos teóricos por metro y el factor de asimetría de los picos.

4.4.3. Condiciones o variables para optimizar en exclusión molecular

La preparación de la muestra y el amortiguador debe procurar la eliminación de impurezas por centrifugación o filtración para minimizar el riesgo de bloqueo y la necesidad de procesos de limpieza astringente aumentando el tiempo de vida de los empaques. El amortiguador de fosfato de sodio usado en el intervalo de concentración de 10 a 50 mM y de pH de 7 a 7.4; en presencia de cloruro de sodio (150

mM), son usados ampliamente para la separación de distintos componentes proteicos facilitando procesos de purificación, análisis subsecuentes y almacenamiento. El ingreso de burbujas de aire al empaque se debe evitar con la desgasificación del amortiguador y manteniendo la temperatura similar a la columna antes de su uso.

La optimización de la resolución depende de factores como las características de la fase, el volumen de muestra, características de la columna y del sistema cromatográfico además de los parámetros experimentales. La fase debe contar con un adecuado intervalo de trabajo y un tamaño de partícula pequeño. Discernir entre dos columnas puede apoyarse en una pendiente pronunciada de la curva de calibración asociada a una óptima resolución de los componentes. Un tamaño de partícula pequeño será más eficiente con la desventaja de generar una alta contrapresión. Un proceso de desalado puede emplear fases con las que los componentes de alto peso molecular se obtengan en el V_0 .

Muestras de bajo volumen evitarán el traslape de picos cromatográficos, por el contrario, una muestra de alta concentración de proteínas afectará la viscosidad y por consiguiente la separación. El volumen de muestra que también influye en la resolución solo se podrá definir experimentalmente a pesar de las recomendaciones. El volumen de las muestras complejas debe corresponder al 0.3 - 5% del V_t de la columna. El tamaño de la columna generalmente definido por el volumen de la muestra determina así que muestras de gran volumen ocuparan columnas más largas impactando la resolución (mostrando una relación de la raíz cuadrada de la longitud) y los tiempos de trabajo. De no contar con la instrumentación adecuada, la separación de grandes volúmenes puede realizarse en diversas columnas pequeñas juntando al final las fracciones de interés o por previa concentración de las muestras.

Alcanzar una resolución adecuada en el menor tiempo posible puede afectarse por el flujo de la fase móvil. Por tanto, flujos bajos permitirán una la resolución adecuada, pero afectarán a moléculas pequeñas. Aumentos en el flujo mostrarán una pérdida de resolución, este efecto puede controlarse usando un mayor volumen de muestra. Una concentración alta de la muestra aumentará la viscosidad y de esta manera también aumentará el fenómeno de difusión determinando que algunas proteínas no deberán sobrepasar ciertos valores de concentración. Considerando que el flujo máximo posible decrece en función de la viscosidad del eluyente.

Características del amortiguador como: el pH, la fuerza iónica y la composición afectaran la estabilidad de

los componentes a separar. Condiciones extremas pueden generar disociaciones, asociaciones o formación de complejos proteicos. Estos efectos pueden controlarse por agentes aditivos repercutiendo en la viscosidad y por tanto en la separación. Por ejemplo, el empleo de detergentes favorecerá la separación de componentes membranales a costa del funcionamiento del componente a separar. Algunos desnaturizantes como clorhidrato de guanidina o urea aumentarán la solubilidad sin embargo las proteínas también pueden ser desnaturizadas (Janson,2011).

Por tanto, los soportes deben ser inertes, estables y resistentes, con un tamaño de poro uniforme y diámetro de partícula variable en función del uso, capaces de formar una red de poros que como se ha mencionado retengan los componentes de menor tamaño de la muestra entre los poros del soporte mientras los de mayor tamaño son excluidos y salen de la columna rápidamente, generando diferencias de elución (UAH, 2017). Este proceso se ilustra en la figura 4.10.

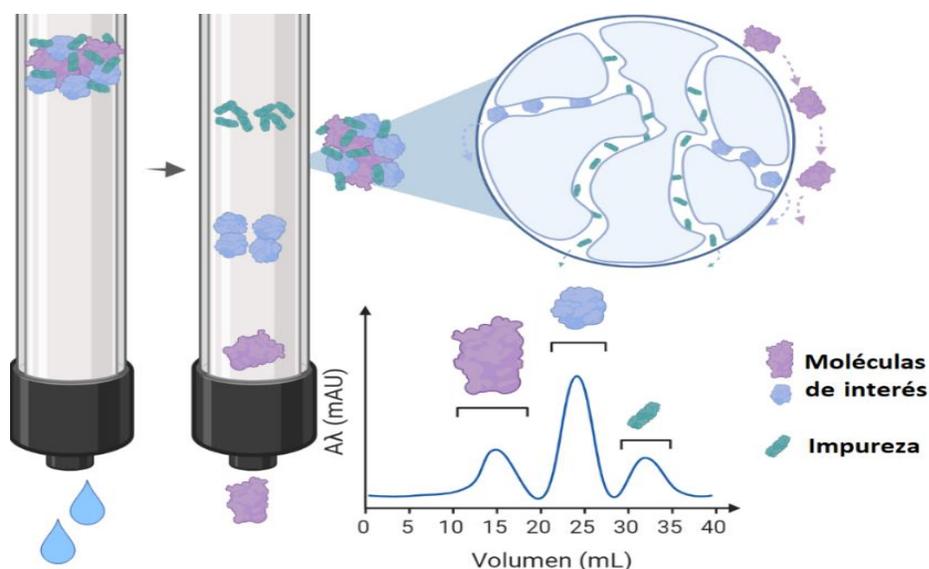


Figura 4.10. Esquema del proceso de cromatografía de exclusión molecular a nivel analítico y preparativo para el análisis, fraccionamiento y limpieza.

4.4.4. Tipos de empaques en exclusión molecular

Las fases usadas para realizar el proceso de filtración sobre gel, compatibles con el empleo de disoluciones acuosas, útiles en la separación de macromoléculas biológicas mayormente están conformadas por sílice

o agarosa con bajas cantidades de grupos iónicos o hidrófilos que puedan interactuar con los compuestos de interés. Algunas propiedades se muestran en la tabla 4.8.

Tabla 4.8. Principales propiedades fisicoquímicas de las fase estacionaria usadas en la cromatografía por exclusión molecular con base en su conformación.

Propiedad	Conformación	
	Sílice	Partículas de agarosa
Composición química	SiO ₂	Polisacáridos
Superficie de recubrimiento	Silanoles bloqueados para minimizar la adsorción	No requiere
Estabilidad de pH	2-8 a nivel operacional	3-11 operacional 1-12 limpieza y almacenamiento
Estabilidad mecánica	Rígida, alta estabilidad a la presión	Rigidez alcanzada por entrecruzamiento químico
Porosidad	Puede ser controlada para la variación de la separación	Puede ser controlada para la variación de la separación

Las fases comercialmente disponibles se clasifican por tamaño. Existen de tamaño estándar con una partícula de 4 a 12 μm y las usadas en Cromatografía de líquidos de ultra alta resolución con un diámetro < 4 μm . Generalmente entre más pequeña la partícula dará mejores resoluciones. Las fases para Cromatografía de líquidos de ultra alta resolución proveen corridas rápidas de alta resolución a costa de una alta contrapresión volviendo necesario equipamiento específico ante pérdidas de resolución por volúmenes muertos, calor y flujos de corte.

Las columnas pre-empacadas son altamente recomendables para análisis de rutina debido a su empaquetamiento uniforme. Las fases con base en agarosa cuentan con bajas interacciones no específicas derivando en leves variaciones entre diferentes inyecciones y análisis. Ofrecen una alta resolución acompañada de diferencias menores en el tiempo de retención y volumen de retención con una desviación estándar relativa <6% y <10%; respectivamente. Estas fases pueden ser utilizadas en la evaluación de formación de agregados (ensayos de pureza). La selección de la fase debe considerar el objetivo del experimento, el PM de los componentes de interés y la escala final de la purificación.

Las columnas con base en dextran y agarosa otorgan una estabilidad fisicoquímica en un intervalo de

temperatura de trabajo de 4 a 40 °C. Este tipo de fase con partículas de 13 µm ofrece intervalos de trabajo de 0.1 hasta 600 kDa. Por otra parte, las fases con partículas de 9 µm permiten una mejoría en la R_s de proteínas globulares de gran tamaño de hasta 1×10^4 kDa. Finalmente, fases con partículas de 34 µm son útiles en el escalamiento de ensayos.

Las fases de agarosa entrecruzada cuentan con amplios intervalos de separación y bajas interacciones entre las proteínas y la fase estacionaria. Son altamente rígidas permitiendo tratar con eluyentes viscosos. Su intervalo de trabajo va de 5 a 5000 kDa y de 1 a 300 kDa con partículas de 13 µm y 11 µm; respectivamente. Estas fases son ampliamente útiles con moléculas pequeñas y ensayos a microescala, mencionando que las moléculas pequeñas pueden sufrir interacciones hidrofóbicas.

Las fases de sefacril ofrecen una alta resolución en un intervalo amplio con partículas de un tamaño de hasta 50 µm siendo útiles para moléculas muy grandes. La composición de esta fase consta de la unión de dextran y *n-n*-metileno *bis*-acrilamida formando una fase hidrófila con fenómenos de adsorción no específicos. Estas columnas emplean amortiguadores acuosos, aditivos y agentes desnaturalizantes en el intervalo de 4 a 40 °C.

Las fases de Sephadex son útiles en diferentes aplicaciones como el fraccionamiento, desalado y cambio de amortiguador. Su empleo depende de los componentes de la muestra y el volumen de este no debe sobrepasar el 30% del V_t . Están conformadas por el entrecruzamiento de dextran con epíclorhidrina. En estas fases el LE y el intervalo de trabajo se controlan por la variación del entrecruzamiento de las fases. Los componentes con PM por encima del LE, además de sales y colorantes pueden ser separados de la muestra. Sephadex G-25 es la fase más común para realizar la separación de proteínas globulares. Por otra parte, G-10 es útil en el desalado, mientras la fase G-50 es usada en la separación de moléculas de gran tamaño (> 30 kDa). Las distintas fases se pueden adquirir en diferentes tamaños de partícula entre ellos la superfina, fina y media; siendo útiles a pequeña escala, flujos elevados y a gran escala; respectivamente. Estas fases son estables con amortiguador acuoso en un intervalo de pH de 2 a 13. La selección de la fase debe contemplar que el PM más alto exceda el LE. Comercialmente estas fases se encuentran como un polvo seco para empacar columnas usando fosfato de sodio (10 - 50 mM, pH 7 - 7.4) como amortiguador y fase móvil. Para evitar interacciones iónicas se pueden utilizar adiciones de cloruro de sodio (25 mM). La instrumentación cromatográfica emplea lámparas Ultravioleta con una emisión aproximada de 280 nm para la lectura de proteínas. Una configuración *tándem* de estas columnas puede separar muestras de

gran volumen (>60 mL) con componentes de alto peso molecular. También se pueden considerar procesos de concentración previos para muestras de gran volumen.

La limpieza de las fases se puede realizar con un Vc de hidróxido de sodio o ácido acético (0.5 M), para después usar 2 Vc del amortiguador. Dependiendo de la muestra analizada se cambiarán los filtros de la columna y/o se descartarán 2 a 3 mm de la fase superior. Las columnas usadas en procesos de preparación se sugieren sean removidas de la fase y esta sea sometida a un proceso de autoclave (121 °C / 20 min). El almacenamiento se puede realizar en el amortiguador de corrida al 20% de etanol en un intervalo de 4 a 30 °C. La consideración del flujo reverso solo se tomará en cuenta al contar con casos severos de contaminación.

4.4.5. Aplicaciones de la exclusión molecular.

Este procedimiento es exitoso en la separación, detección e identificación de proteínas de baja abundancia provenientes de células eucariotas o procariotas complejas, proveyendo tiempos de separación cortos y precisos a través de bandas cromatográficas definidas. No genera pérdida de muestra ni degradación del soporte al no interactuar entre ellos. El lisado celular previo puede producir baja presencia de proteínas totales volviendo necesario que la extracción se realice en condiciones estables (Life Science, 2017).

Las aplicaciones de esta metodología van desde analíticas pasando por el control de calidad hasta bio-terapéuticas. Es un método útil en la determinación del tamaño molecular de los componentes de una muestra determinando el perfil de los componentes presentes. Además, este proceso es útil en el monitoreo de la calidad y estabilidad de una proteína, complementando el estudio de formación de complejos, agregados y formas degradadas de las proteínas presentes describiendo su interacción y las condiciones en las que se realiza.

4.5. Métodos de extracción de metabolitos de HAP con adsorbentes

El aislamiento de componentes de muestras complejas por métodos convencionales como extracción líquido-líquido cuenta con la desventaja de requerir grandes cantidades de disolventes además de pasos adicionales de limpieza. Por lo que son necesarios métodos analíticos rápidos, selectivos y sensibles para determinar metabolitos potencialmente más tóxicos (Luan, et al., 2007). Como sucede con la identificación y análisis de metabolitos de HAP que se afectan por su propia inestabilidad resultado de factores como luz, temperatura, pH y aire (Clark, 1993) y su bajo nivel de concentración.

4.5.1. Extracción en fase sólida

Un procedimiento eficaz para el aislamiento de metabolitos de HAP es la Extracción en Fase Sólida o la Dispersión de Matriz en Fase Sólida. Estas técnicas basan su éxito en la miniaturización consumiendo menos reactivos, matriz y tiempo, proporcionando recobros altos.

Extracción en Fase Sólida es un tratamiento para la limpieza y preconcentración simultánea de muestras acuosas. Este procedimiento es similar a cromatografía de líquidos al retener compuestos de interés. La Extracción en Fase Sólida emplea columnas de 1 a 5 cm de longitud empacadas con 50 mg a 10 g de adsorbente de tipo hidrófilo o hidrofóbico (incluso de intercambio iónico o mixtos). El adsorbente será activado con un volumen de disolvente de hasta 8 veces el volumen del sorbente. La fase móvil involucrada en el proceso fluirá libremente o por un pequeño diferencial de presión por uso de vacío o un flujo de gas. La muestra se cargará para limpiar y retener componentes en la superficie del adsorbente relacionando su desempeño con el volumen de muestra, la cantidad de soporte y flujo usados. El subsecuente paso de lavado con disolventes de diferente polaridad elimina interferentes y el proceso culmina con la elución de los analitos de interés al detener la interacción con el adsorbente colectándolos en el menor volumen posible. El recobro estará gobernado por la interacción del analito con el sorbente (Cromlab, 2022). Este proceso se puede observar en la figura 4.11.

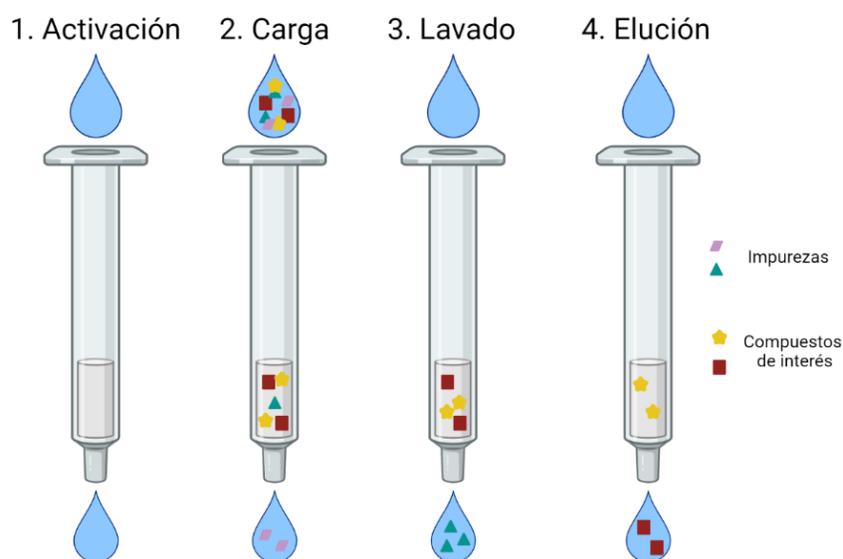


Figura 4.11. Diagrama de los 4 pasos presentes en el proceso de Extracción en Fase Sólida para la eliminación de impurezas y la colecta de compuestos de interés a partir de muestras líquidas.

En el análisis de HAP de bajo peso molecular a nivel traza la metodología de Extracción en Fase Sólida ha involucrado recobros >80% (He et al., 1998) y de 60-80% para HAP de alto peso molecular (Kanchanamiayoon y Tatrahun, 2009) empleando C-18 como fase sólida. Olmos-Espejel y colaboradores (2012) desarrollaron una metodología de Extracción en Fase Sólida en línea y fuera de línea acoplada a Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución para el análisis y cuantificación de metabolitos de *B[a]P* presentes en cultivos de *Selenastrum capricornutum*. Con esta técnica determinaron la presencia de compuestos tipo *di*-hidrodiole e hidroxilados. Con base en esta técnica Hernández Blanco y García de Llasera (2016), realizaron el seguimiento de *di*-hidrodioles hasta por 48 h empleando cultivos de la microalga verde *Selenastrum capricornutum* expuestos a HAP de alto peso molecular como *B[a]A* y *B[a]P*.

La Extracción en Fase Sólida es una técnica robusta y útil en el seguimiento de metabolitos de HAP tipo *di*-hidrodiole y *mono*-hidroxilados compatible con métodos cromatográficos y muestras biológicas de diverso origen (Marqués et al., 2021). Algunos factores importantes que impactan su rendimiento son: el equilibrio (relación de la concentración molar entre las dos fases), factor de retención (diferencia de elución entre un compuesto de interés y aquel que no es retenido en relación con el analito no retenido); exclusión (por adición excesiva del analito o un flujo rápido de los eluyentes que limita el equilibrio o alcanza el volumen de fuga), factores fisicoquímicos (área superficial, tamaño y dimensiones de partícula, la capacidad del sorbente, fuerza de disolventes y el diámetro del poro) (Simpson, 2000).

4.5.2. Dispersión de matriz en fase sólida

El tratamiento de materia orgánica para la extracción de hidrocarburos comúnmente usa el método de Soxhlet y gran cantidad de disolventes (Grice et al, 1988; Matchette y Dowel, 2012). Una alternativa a este método es Dispersión de Matriz en Fase Sólida en esta, la muestra es obtenida por centrifugación, maceración, pulverización entre otros métodos. Posteriormente la muestra se dispersa y homogeneiza con adsorbentes como la fase sílice C-18 previamente activada con disolventes en un recipiente inerte para su empaquetamiento en una columna de cristal o polímero. El proceso continúa con el lavado, que realiza la eliminación de interferentes y termina con la elución de los analitos (Stashenko, et al., 2014). Este proceso se esquematiza en la figura 4.12.

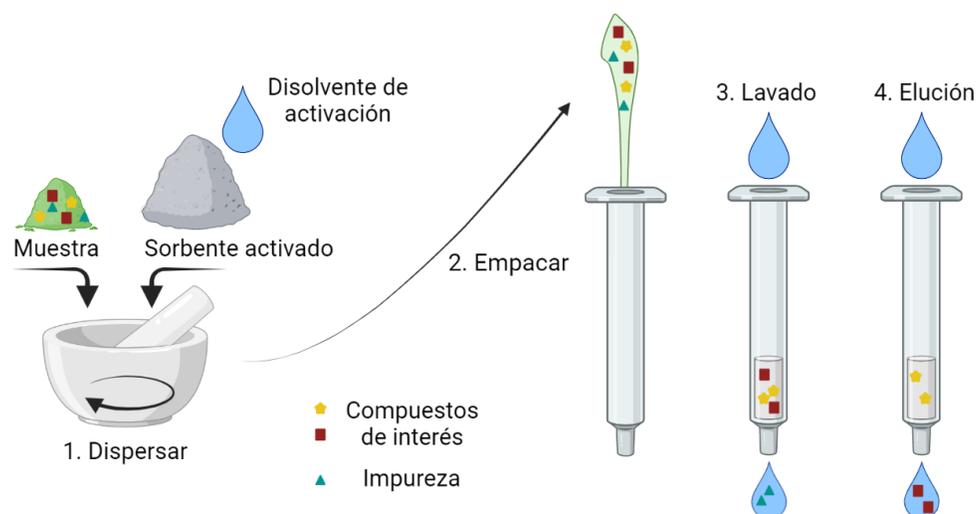


Figura 4.12. Diagrama de los 4 pasos presentes en el proceso de Dispersión de Matriz en Fase Sólida para la eliminación de impurezas y la colecta de compuestos de interés a partir de muestras sólidas.

Los soportes con un diámetro pequeño (3-10 μm) proveen tiempos de elución prolongados mientras los de un diámetro más grande (40 μm), usados con mayor frecuencia, ofrecen tiempos de elución reducidos y son menos costosos. La relación muestra: soporte, varía de 1:1 a 1:4 y el tipo de disolvente impacta directamente en el proceso de separación y elución.

La Dispersión de Matriz en Fase Sólida ofrece una separación rápida y eficiente excluyendo el riesgo de degradación por procesos de calentamiento. Fue desarrollada en 1989 por Steven Barker y asemeja aspectos de Extracción en Fase Sólida realizando la extracción y limpieza en una sola etapa, reduciendo el tiempo de análisis y el empleo de disolventes. Mientras en Extracción en Fase Sólida la ruptura de la muestra es un proceso adicional con pérdida de componentes, en Dispersión de Matriz en Fase Sólida sucede con la dispersión aumentando la superficie de extracción con interacciones fisicoquímicas diversas y más fuertes entre la muestra, el analito de interés, el soporte, y los disolventes simultáneamente. Además de involucrar las propiedades del soporte generando una superficie de absorción mayor involucrando toda la columna, mientras en Extracción en Fase Sólida solo la parte superior.

Los análisis existentes de extracción de HAP por Dispersión de Matriz en Fase Sólida ofrecen buenos resultados partiendo de matrices como suelos y plantas (Sánchez-Brunete et al., 2007) con rendimientos altos (Pena et al., 2008) hasta partes por trillón, niveles ultra traza. Esta técnica resulta útil en la

preconcentración de los metabolitos de la degradación de HAP por microalgas verdes (Olmos-Espejel et al., 2012). El aislamiento de metabolitos de HAP de alto peso molecular a través de Dispersión de Matriz en Fase Sólida con sílice C-18 como soporte (Hernández Blanco y García de Llasera 2016) permitió el seguimiento de los metabolitos tipo *di*-hidrodiol en la biomasa de la microalga verde *Selenastrum capricornutum* expuesta a HAP de alto peso molecular, entre ellos *B[a]A* y *B[a]P*, logrando la observación de los metabolitos hasta por 48 h de exposición.

4.6. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución y análisis de HAP

Las técnicas más usadas en la determinación de HAP suelen ser cromatográficas además de electroforesis capilar (Graupner et al., 2014), espectrofotometría (Dissanayake, 2010), y métodos semicuantitativos como los fluorimétricos (Greene et al., 2017). La cromatografía es un método físico de separación en el cual los componentes de una muestra son distribuidos en dos fases, una de las cuales es estacionaria y la otra móvil, moviéndose en dirección fija (IUPAC, 2017). Las condiciones de operación dependerán de las propiedades fisicoquímicas de los analitos y la matriz.

Análisis de muestras ricas en HAP (agua, sedimentos marinos, tejidos entre otras), realizados por cromatografía de gases (GC, por sus siglas en inglés) han usado diversos detectores entre ellos los de ionización de flama, trampa de iones, fluorescencia o espectrometría de masas (Banedé, et al., 2017; Cajthaml, et al, 2002; Izquierdo, 2013, Ke, et al., 2010). Por otra parte, Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución es una técnica útil en la determinación de compuestos volátiles de alto peso molecular mediante detectores selectivos permitiendo el seguimiento de HAP y sus metabolitos. La tabla 4.9. muestra un resumen de análisis de HAP realizados con base en Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución y diferentes técnicas de tratamientos de muestra.

Tabla 4.9. Análisis de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución en diversas muestras por uso de distintas técnicas de tratamiento.

Referencia	HAP	Muestra	Técnicas de tratamiento de muestra	Detección
Deka et al., 2022	14 HAP	Filtro de papel, muestreo pasivo	Ultrasonido, filtración, rotavapor, limpieza por sílice	Ultravioleta
Myint Zaw et al., 2022	<i>B[a]A</i> , <i>B[a]P</i> y <i>B[b]F</i>	Té	Extracción en fase sólida asistida por vórtice	Ultravioleta con arreglo de diodos

Referencia	HAP	Muestra	Técnicas de tratamiento de muestra	Detección
Tong et al., 2022	8 HAP	Agua	Extracción en fase sólida por barra magnética (MSPE)	Longitud de onda variable
Abril et al., 2022	14 HAP	Materia particulada suspendida obtenida de plantas de cemento	Sequedad para volatilizar materia orgánica, ultrasonido, rotavapor, filtración	Fluorescencia
Zhang et al., 2022	5 HAP	Agua de grifo	Micro extracción en fase sólida en tubo y análisis por sonda de titanio	Longitud variable
Moradi et al., 2022	7 HAP y 22 alquil-HAP	Muestras urbanas de aire	Mezcla de disolventes	Fluorescencia y Ultravioleta
Fasano et al., 2016	10 HAP	Queso	Saponificación, extracción líquido-líquido y EFS	Fluorescencia
Santonicola et al., 2017	14 HAP	Leche	Saponificación, extracción líquido-líquido y EFS	Fluorescencia
Battisti et al., 2014	13 HAP	Yogur	Saponificación y extracción líquido – líquido	Fluorescencia
Onopiuk et al., 2022	6 HAP	Cárnicos sometidos a procesos de calentamiento	Saponificación, EFS y liofilizados	Ultravioleta y fluorescencia
Gorovtsov et al., 2022	16 HAP	Comunidades microbianas de suelos contaminados	Saponificación	Fluorescencia
Houessou et al., 2007	16 HAP	Bebidas de café	Saponificación alcalina	Fluorescencia
Du et al., 2022	16 HAP	Suelos de tierras de cultivo	Extracción con soxhlet y disolventes	-
Martínez-Toledo et al., 2022	11 HAP	Bacterias	Extracción con disolventes y rotavapor	Longitud variable
Sillapawisut et al., 2022	6 HAP	Agua de: grifo, rio, desechos, salobre	EFS en jeringa	Fluorescencia

EFS: Extracción en Fase Sólida

4.7. Electroforesis

Las técnicas electroforéticas son de gran importancia para el análisis de proteína siendo un sistema conformado por un ánodo y un cátodo enlazados por un electrolito. Electroforesis es un término general para englobar la migración y separación de partículas cargadas (iones) a causa de un campo eléctrico y diferencias en su movilidad.

La movilidad es dependiente de factores como tamaño, forma y carga de la partícula; además de la temperatura de separación. Los parámetros electroforéticos son la corriente, voltaje y potencia, sin dejar de lado la fuerza iónica, pH, viscosidad, tamaño de poro entre otras características. Estos factores describen el medio en el que se realiza la separación. El proceso de electroforesis tiene la desventaja de generar un aumento de temperatura mediante la corriente eléctrica que al variar generará diferencias de migración de proteínas siendo primordial mantener una temperatura constante.

4.7.1. Electroforesis en gel

También conocida como electroforesis de zona, es un sistema continuo de: electrolito, pH y fuerza iónica, que provocan un efecto de tamizado dependiente del soporte usado. Esté en forma de gel suprime las corrientes térmicas de convección y difusión ofreciendo un formato convencional de revelación, la tinción del soporte. Sin embargo, la movilidad y resolución pueden afectarse por factores como: intercambio iónico con la matriz, osmosis y heterogeneidad del soporte. Los soportes habitualmente constituidos por poliacrilamida (PAG) o agarosa se encuentran comercialmente disponibles para trabajos de rutina. Los geles de PAG son bien definidos, mecánicamente estables, inertes y transparentes con un tamaño de poro variable. Siendo este parámetro el que limita y mejora la eficiencia de la resolución de las proteínas ($PM > 500$ kDa). En la figura 4.13. se muestra un esquema de la instrumentación.

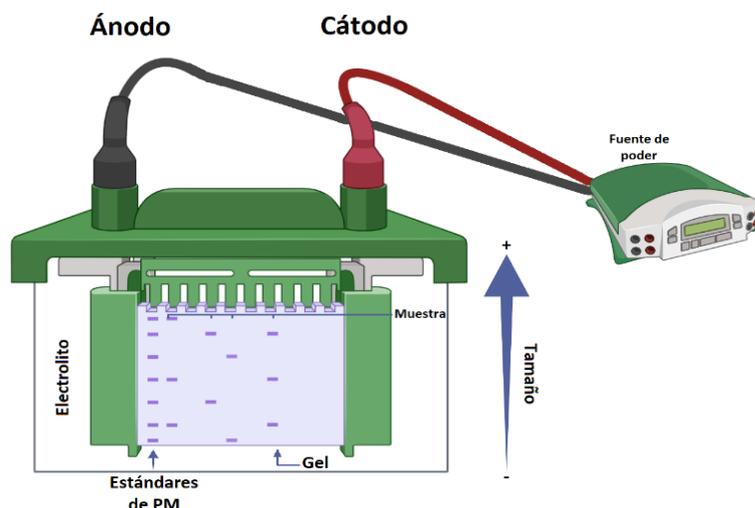


Figura 4.13. Esquema de la instrumentación utilizada en la realización de electroforesis SDS PAGE.

El gel PAG está compuesto por monómeros de acrilamida polymerizados en presencia de radicales libres del iniciador que suele ser persulfato de amonio o riboflavina. La reacción de polimerización se regula por adición de aminas terciarias y el tamaño de los poros se ajusta por la concentración de acrilamida. La relación de acrilamida y el agente de entrecruzamiento genera un tamizado molecular que modula la separación en función del tamaño de los componentes.

Para que la muestra se solubilice y no sufra agregación se adiciona urea o detergentes no iónicos como agentes de disociación. Adicionalmente para evitar la oxidación de los grupos tiol y la formación de enlaces disulfuro se emplean agentes reductores como el β -mercaptoetanol que en conjunto con los agentes de disociación separan deliberadamente las proteínas y sus agregados en las subunidades correspondientes. Estas condiciones suelen ser útiles en la electroforesis SDS-PAG.

En la electroforesis de zona la muestra se aplica sobre las ranuras del gel. Posteriormente, al aplicar el campo eléctrico los componentes migran de acuerdo con su movilidad. Las placas de gel ofrecen una separación rápida y fina además de estabilidad térmica culminando el proceso con la tinción del gel. Su versión horizontal es la más recurrente al contar con una refrigeración eficiente y flexibilidad entre otros beneficios frente a otras técnicas.

4.7.2. Electroforesis (SDS-PAGE)

Este es el método de selección para análisis de mezclas complejas de proteínas. Siendo habitual el empleo de sistemas multifásicos manejando un gel de apilamiento de poro grande no restrictivo en el cual se realizará una isoteoforesis sin efecto de tamizado molecular. Este primer gel se encuentra sobre un gel de separación que se caracteriza por un poro pequeño en el cual como su nombre dicta se realiza la separación. Cada gel contará con condiciones distintas útiles para muestras diluidas proporcionando una resolución superior a la ofrecida por un gel de concentración única. La tasa de migración de una proteína se comparará con la tasa de migración de proteínas estándar de PM definido, obteniendo estimaciones precisas del PM de los componentes proteicos presentes.

El análisis de proteínas en geles de electroforesis realizado por el proceso de tinción emplea el uso de un fijador para precipitar las proteínas y evitar la difusión fuera del gel. Los geles se tiñen uniformemente sumergiéndolos completamente en la solución de tinción. El proceso dependerá del grosor del gel siendo el azul de coomassie y el negro de amido los tintes más habituales. Al finalizar la tinción por fotografiado o escaneado por densitometría se registrará la posición e intensidad de las bandas plasmadas en el gel caracterizando el PM de los componentes proteicos de la muestra y eventualmente identificándolos.

4.7.2.1 Empleo de electroforesis en la proteómica de microorganismos degradadores de contaminantes

Esta técnica ha resultado útil en la determinación de los sistemas enzimáticos involucrados en la degradación de HAP de alto peso molecular como antraceno y *B[a]P*. Luo y colaboradores (2016) demostraron mediante la evaluación de sustratos catalíticos la presencia de una proteína (49 kDa) involucrada en la degradación de los HAP por *Rhodococcus*. Por otra parte, Subashchandrabose y colaboradores, (2019), demostraron la sobre expresión de amidohidrolasa en *Rhodococcus wratislaviensis* inducida por pireno y *B[a]P*. Este último provocó la sobre expresión de una señal asociada a un PM de 40.3 kDa.

El proceso de electroforesis se ha usado para la caracterización de consorcios microbianos degradadores HAP de bajo peso molecular como fenantreno, naftaleno y pireno. Un grupo microbiano compuesto por *Chryseobacterium BP-1*, *Pseudomonas putida BP-2*, *Stenotrophomonas BP-3* y *Achromobacter BP-4* se ha descrito en la degradación de naftaleno determinando la presencia de la enzima 2,3-di-hidroxibifenil di-oxigenasa involucrándose también en la degradación de bifenilos policlorados con una notable tolerancia

a un amplio intervalo de contaminantes orgánicos persistentes (Xu et al., 2021).

Chen y colaboradores (2015), demostraron que la bacteria *Shewanella xiamenensis BC01* sobre produce proteínas con PM entre 35-55 kDa como respuesta ante el incremento de calcio y compuestos aromáticos. Los análisis se realizaron por electroforesis (SDS-PAGE) y tuvieron seguimiento por espectrometría de masas en tándem. El incremento de Ca^{2+} permitió que el microorganismo secretara sustancias poliméricas que pueden formar una capa densa protectora para mitigar el efecto de estos contaminantes. Este comportamiento se ha observado en otros microorganismos de igual manera en presencia de bajas concentraciones de compuestos aromáticos como Hu y colaboradores (2019) lo demostraron.

El análisis electroforético (SDS-PAGE) mostró que algunas proteínas en el intervalo de 20.1 a 97.2 kDa respondieron a la exposición de HAP, siendo este efecto más intenso frente al pireno. Este análisis generó un interés en el intervalo de PM de 40 y 50 kDa, con muy pocas señales suprimidas, mostrando que los compuestos poliméricos extracelulares varían en función de la concentración de los contaminantes (Jia et al., 2022). *Sphingobium sp.*, es una bacteria involucrada en un consorcio de fitorremediación de HAP la cual ha mostrado un aumento de concentración de proteínas valuado también por electroforesis, pero en esta ocasión empleando gradiente de desnaturalización (Domínguez et al., 2020).

Hongos como *Penicillium oxalicum* involucrados en la degradación de HAP y aislados de cuerpos de agua han descrito la presencia del sistema citocromo P-450 caracterizado por variaciones proteicas a través de electroforesis que mostró una sobre producción de 10 proteínas relacionadas con una respuesta de estrés. Entre la acumulación de proteínas figuraron: epóxido hidrolasas, oxidorreductasas y enzimas transferasas encontradas en la fracción citosólica y microsomal; en esta última la proliferación fue mayor con proteínas de PM en el intervalo de 16.1 kDa a 80.1 kDa observada por electroforesis de dos dimensiones (Camacho-Morales, et al., 2018). Algunas enzimas como la lacasa que ha sido colectada de hongos lignolíticos como *Trametes sp. MA-X01* y estudiadas por electroforesis (SDS-PAGE), se han visto involucradas en la degradación de colorantes mostrando un PM aproximado de 62 kDa trabajando con temperatura y pH óptimos (60 °C, pH de 3 a 5) favorecidas ante la presencia de metales como Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} y Cu^{2+} .

4.7.3. Enzimas microbianas identificadas en el proceso de degradación de HAP

En algunos sistemas microbianos incluso se han identificado los sistemas enzimáticos degradadores de HAP de alto peso molecular, es el caso de *Mycobacterium sp. RJGII-135* capaz de degradar el $B[a]P$

formando *di*-hidrodioles en presencia de *di*-oxigenasas las cuales se encuentran bajo investigación para su identificación (Schneider et al., 1996). Adicionalmente, *Rhodococcus sp.* bacteria degradadora de *B[a]P* mostró la sobreproducción de genes ligados a la presencia de *mono*- y *di*- oxigenasas presentando una subunidad larga identificada como 2,3- catecol *di*-oxigenasa (Subashchandrabose et al., 2019).

En bacterias como *Mycobacterium vanbaalenii* *PYR-1* se han descrito sistemas multi enzimáticos involucrados en la degradación de HAP compuestos por *di*- y *mono*- oxigenasas y el sistema citocromo P-450 (Brezna et al., 2006), este último seguido por la presencia de *trans*-dihidrodioles, como ha sucedido con *Streptomyces flavovirens*, frente fenantreno (Sutherland et al., 1990). En los hongos se han encontrado a la lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa, lacasa, citocromo P-450 y epóxido hidrolasa (Srivastava y Kumar, 2019). En procesos aerobios de biodegradación de HAP se han observado *di*-oxigenasas formadoras de *cis*-dihidrodioles que posteriormente serán deshidrogenados, deshidroxilados, metabolizados por protocatecuato y catecoles para finalmente ser internalizados en el ciclo de ácidos tricarbóxicos, formando CO₂ y agua como con la proteobacteria *Beijerinckia sp.* frente *B[a]P* y *B[a]a* (Gupta et al., 2014; Harayama y Timmis 1992, Jain et al., 2005; Gibson y Subranian, 1984).

La bacteria *Amycolatopsis tucumanensis* *DSM 45259* expuesta a fenantreno analizada por SDS-PAGE demostró la síntesis de diferentes proteínas entre 6.4 a 200 kDa identificadas por espectrometría de masas (MALDI-TOF). Y por electroforesis de dos dimensiones se elucidó el proceso de degradación. Los PM más remarcables fueron de 39.72 a 71.35 kDa sugiriendo la presencia de oxigenasas multicomponentes. También estuvieron presentes amido hidrolasas y enoil-CoA hidratasas, enzimas asociadas en la degradación de diferentes bacterias Gram (-) (Navarro-Llorens et al., 2005, Vandra et al., 2015).

En *Micobacterium sp. PYR-1* se ha observado la síntesis de la aldehído-deshidrogenasa-gen *nidA* pertenecientes a una subunidad grande (50 kDa) de *di*-oxigenasas participes en la degradación de pireno, fenantreno y dibenzotiofeno (Khan et al., 2001, Lee et al., 2007, Navarro-Llorens et al., 2005). Como se observa las *di*-oxigenasas participan activamente en los primeros pasos de la degradación de HAP como sucede con *Amycolatopsis tucumanensis* *DSM 45259* frente naftaleno, fenantreno y pireno que muestra polipéptidos en un intervalo de 6.4 a 200 kDa (Bourguignon et al., 2019).

Por exposición de *Mycobacterium 6PY1* a pireno y análisis por electroforesis en dos dimensiones se determinó una secuencia péptica de dos *di*-oxigenasas nombradas *Pdo1* de 52 kDa y *Pdo2* conformada por

una subunidad α de 52 kDa y una subunidad β de 20 kDa (Krivobok et al., 2003). Un componente similar se observó en *Sphingomonas CHY-1* expuesta a HAP de alto peso molecular degradándolos y evidenciando la participación de una *di*-oxigenasa hidroxilante del anillo agrupada a hierro molecular conformando un hexámero de aproximadamente 200 kDa (Jouanneau et al., 2006).

La bacteria *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 replicada por *E. coli* mostró la capacidad de oxigenar pireno mediante dos componentes (citocromo P-450 44.8 kDa y PipA 48.7 kDa) y un sistema transportador de electrones no identificado adaptativo (Brezna et al., 2006). Kim y colaboradores (2004), empleando también *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 determinaron la acción de una catalasa-peroxidasa (85.2 kDa), una *mono*-oxigenasa (21.9 kDa), una subunidad pequeña de *di*-oxigenasa (18 kDa) y una aldehído-deshidrogenasa (52 kDa) mediante electroforesis en dos dimensiones.

Algunos HAP de alto peso molecular resistentes a *di*-oxigenasas pueden ser eliminados por *mono*-oxigenasas del sistema citocromo P-450 generando intermediarios férricos (Ortiz de Montellano, 1995). Enzimas degradadoras de HAP de bajo y alto peso molecular como la CYP108J1 se han relacionado a un grupo de genes reguladores de respuesta de nitrito, maltosa, deshidrogenasa, ferredoxina y ferredoxina reductasa empleando electrones provenientes de cofactores como NADPH y cuyo análisis por SDS-PAGE genera tres bandas predominantes con PM de 52.3, 44.3 y 15 kDa (Luo et al., 2016).

Las principales enzimas involucradas con el sistema citocromo P-450 en la degradación de componentes orgánicos son *mono* oxigenasas, deshidrogenasas, epóxido hidrolasas y enzimas lignolíticas (Masfaraud et al., 1992; Hassanshahian et al., 2015; Agrawal et al., 2018). Además de enzimas protectoras del estrés oxidativo como peroxidasa dismutasa, glutatión *s*-transferasa y catalasa (Ren et al., 2015; Shen et al., 2016). En general los organismos procariontes bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas contienen *mono*-oxigenasas y *di*-oxigenasas (Baek et al., 2011), hidroxilantes del anillo aromático (catecol 1,2 *di*-oxigenasa) y lipasas degradadoras de pireno y *B[a]P* como en el bacilo Gram (-): *Serratia marcescens* (Pandey et al., 2012; Lyu et al., 2014). Destacando que el gen de catecol 1,2-*di*-oxigenasa también se ha encontrado en otras especies como *Gordinia sputi* y *Corynebacterium* (Shen et al., 2009).

En hongos, se ha observado el empleo de lignina en la degradación de *B[a]A* en suelos contaminados generando CO₂ presentando bajas concentraciones de *B[a]A*- 7,12-diona e intermediarios oxigenados sugiriendo que la lignina induce la formación de oxidorreductasas y *di*-oxigenasas (Gu et al., 2022),

cruciales en la degradación de compuestos aromáticos y describiendo una posible transformación cometabólica en la degradación del *B[a]A* (Sun et al., 2020).

Estudios de clonación y expresión por electroforesis del hongo *Pleurotus ostreatus*, han descrito la presencia de una proteína (57 kDa) y lacasas (50 - 82kDa) involucradas en la oxidación de *B[a]P* (Mohtashami et al., 2019). Estas lacasas y subunidades (28 kDa) han sido caracterizadas por electroforesis (SDS-PAGE) y Cromatografía de Exclusión Molecular preparativa (Younes y Sayadi 2011). Además, en hongos el sistema citocromo P-450 se ha involucrado en la formación de epóxidos (Haritash y Kaushik, 2009; Syed y Yadav, 2012; Syed et al., 2013) y *trans*-dihidrodióles (Moody et al., 2005).

Algunos ensayos de exposición de microalgas a HAP han mostrado inhibición o inducción de material proteico como con *Chorella ssp. MM3* frente pireno que sobre produjo una proteína de 47.7 kDa similar a una enzima de *Volvox carteri f. nagariensis* de importancia en procesos energéticos. Esta enzima, nombrada *DLAT. gi|302837029*, se publicó como uno de los tres componentes del complejo piruvato deshidrogenasa del alga verde *Micractinium pusillum* (Li et al., 2012).

Ensayos recientes de *Chlamydomonas reinhardtii 503* frente *B[a]A* describieron la presencia de las enzimas homogentisato 1,2-*di*-oxigenasa (49.9 kDa), carboximetilenobutenolidasa (25.8 kDa), ribulosa 1,5 bifosfatasa carboxilasa (subunidad grande 55 kDa, y subunidad pequeña 13 kDa, para un tamaño en conjunto de 70 kDa) y ubiquinol oxidasa (39.9 kDa) involucradas en el proceso de biodegradación de HAP (Luo et al., 2020). El proceso de degradación de fenantreno por *Chlorella vulgaris* ha mostrado las enzimas catecol 2,3- *di*-oxigenasa y catecol 1,2 *di*-oxigenasa (31.6 kDa y 34 kDa) postulando la actividad de estas enzimas sin asociación entre metabolitos producidos y las enzimas presentes (Tomar y Jajoo 2021). La enzima glucociltransferasa (76 kDa) se ha referido en la biotransformación de pireno en diferentes especies de microalgas (Lei et al., 2003; Pathak et al., 2018).

Si bien la enzima de microalgas más caracterizada ha sido la nombrada dihidrolipoamida acetiltransferasa. (*DLAT*, 50- 69 kDa) de la microalga *Chlorella sp. MM3* (Subashchandrabose et al., 2017), los principales compuestos involucrados en la degradación de HAP por microalgas son las *di*-oxigenasas y el sistema citocromo P-450 sin lograr aislar y caracterizar estos sistemas por completo. Toda esta información muestra que los estudios de degradación de los HAP por microalgas son bastos involucrando principalmente a los de bajo peso molecular, pero con poca información acerca de los procesos

involucrados. La tabla 4.10 muestra a manera de resumen las enzimas microbianas descritas en la degradación de HAP por esta sección.

Tabla 4.10. Enzimas microbianas involucradas en la degradación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos.

Microorganismo	HAP degradado	Proteína expresada	Peso molecular (kDa)
<i>Amycolatopsis tucumanensis</i> <i>DSM 45259</i>	naftaleno, fenantreno y pireno	<i>di-</i> oxigenasas multicomponentes hidroxilantes, amido hidrolasas y enoil- CoA hidratasa	6.4 a 200
<i>Beijerinckia sp.</i> frente	B[a]P y B[a]A	<i>di-</i> oxigenasas	NP
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> 503	B[a]A	homogentisato 1,2-di-oxigenasa. carboximetilenobutenolidasa, ribulosa 1,5 bifosfatasa carboxilasa subg y subp y ubiquinol oxidasa	49.9 25.8 70, sub 55, sub 13 y 39.9
<i>Chlorella ssp.</i> <i>MM3, Volvox carteri f. nagariensis</i> <i>Micractinium pusillum</i>	Pireno	DLAT. gi 302837029	47.7 69
<i>Chlorella vulgaris</i>	Fluoranteno	catecol 2,3- <i>di</i> -oxigenasa y catecol 1,2 di- oxigenasa	31.6 y 34
<i>Corynebacterium</i> y <i>Gordinia sputi</i>	HAP de diferente PM	catecol 1,2- <i>di</i> -oxigenasa	NP
Hongos como <i>Pleurotus ostreatus</i>	B[a]P y B[a]A	lignina B[a]A- 7,12-diona <i>mono</i> -oxidasas y lacasas	NP 50 y 80 (sub 28)
<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> PYR-1	Diferentes HAP de alto peso molecular, pireno, fenantreno y dibenzotiofeno	<i>di-</i> / <i>mono</i> - oxigenasas y citocromo P-450 - citocromo P-450 y PipA Subunidad grande de <i>di</i> -oxigenasas, aldehído-deshidrogenasa catalasa-peroxidasa, <i>mono</i> -oxigenasa, subunidad pequeña de <i>di</i> -oxigenasa y aldehído-deshidrogenasa	NP 44.8 y 48.7 50 85.2, 21.9, 18 y 52
<i>Mycobacterium 6PY1</i>	Pireno	dos <i>di</i> -oxigenasas: Pdo1 y Pdo2 (dos subunidades)	52 y 52 (sub 20)
<i>Rhodococcus sp.</i>	B[a]P	<i>mono-</i> y <i>di-</i> oxigenasas	NP

Microorganismo	HAP degradado	Proteína expresada	Peso molecular (kDa)
		catecol 2,3- catecol <i>di</i> -oxigenasa y amidohidrolasas	
<i>Serratia marcescens</i>	Pireno Y B[a]P	<i>mono</i> - y <i>di</i> -oxigenasas y lipasas	NP
<i>Sphingomonas CHY-1</i>	HAP de alto peso molecular	<i>di</i> -oxigenasa hidroxilante del anillo	Hexámero ≈ 200
<i>Streptomyces flavovirens</i>	HAP de alto peso molecular	Citocromo P-450	NP
Hongos	HAP de alto peso molecular	lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa, lacasa citocromo P-450 y epóxido hidrolasa	NP

NP: no publicado, sub: tamaño subunidad.

5. METODOLOGÍA

5.1. Descripción del plan general

La experimentación se implementó con base en 7 principales ejes los cuales fueron: 1) La realización de bioensayos de exposición a B[a]P o B[a]A de los cultivos. Separación del medio líquido y biomasa de *S. acutus* y *S. capricornutum* para establecer las condiciones de activación para la producción de enzima(s) degradadora(s). 2) El Establecimiento de las condiciones cromatográficas para el análisis de HAP (B[a]A y B[a]P) y sus metabolitos. Validación del método Extracción en Fase Sólida / Dispersión de Matriz en Fase Sólida-Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución-Detección por Ultravioleta /Fluorescencia. 3) La evaluación de la configuración geométrica de los metabolitos de B[a]P. 4) La obtención de los extractos crudos enzimáticos *extra-* e *intra-* celulares. 5) La evaluación de la degradación de HAP en los extractos crudos provenientes de cultivos activados o no activados. Evidencia de la presencia del sistema de biodegradación por detección y cuantificación de metabolitos 6) El fraccionamiento grueso y fino por Cromatografía de Exclusión Molecular preparativa de los extractos crudos. 7) La valoración del perfil proteico por Cromatografía de Exclusión Molecular y electroforesis (SDS-PAGE). La figura 5.1. muestra un diagrama del proceso general el cual se resume a continuación.

1) En el desarrollo experimental se emplearon cultivos de las microalgas verdes *S. acutus* y *S. capricornutum* de 15 mL. Estos contaron con una absorbancia 1 asociada a un crecimiento exponencial (5×10^6 células mL⁻¹). Los cultivos fueron expuestos a los HAP de alto peso molecular B[a]A y B[a]P (266 mg mL⁻¹) bajo condiciones de exposición (luz amarilla, 28° o 34 °C, 50 rpm), proceso denominado en este trabajo como activación. Los bioensayos de activación se realizaron por intervalos de tiempo que dependieron de la especie de microalga y el HAP usado, los cuales se indican en la sección 5.3.4.1. Adicionalmente, se prepararon controles de 15 mL de cultivos con absorbancia 1, bajo condiciones de exposición (luz amarilla, 28° o 34 °C, 50 rpm) y en ausencia de los HAP. Los bioensayos de exposición a los HAP se efectuaron a 28 °C en el intervalo de 1.5 a 6 h para confirmar el proceso de degradación con el monitoreo de los metabolitos y los HAP en medio líquido y biomasa.

2) Se usaron disoluciones de los estándares de los HAP y metabolitos para establecer las mejores condiciones cromatográficas para su análisis y tuvieron concentraciones de 1 µg mL⁻¹ y 10 ng mL⁻¹; respectivamente.

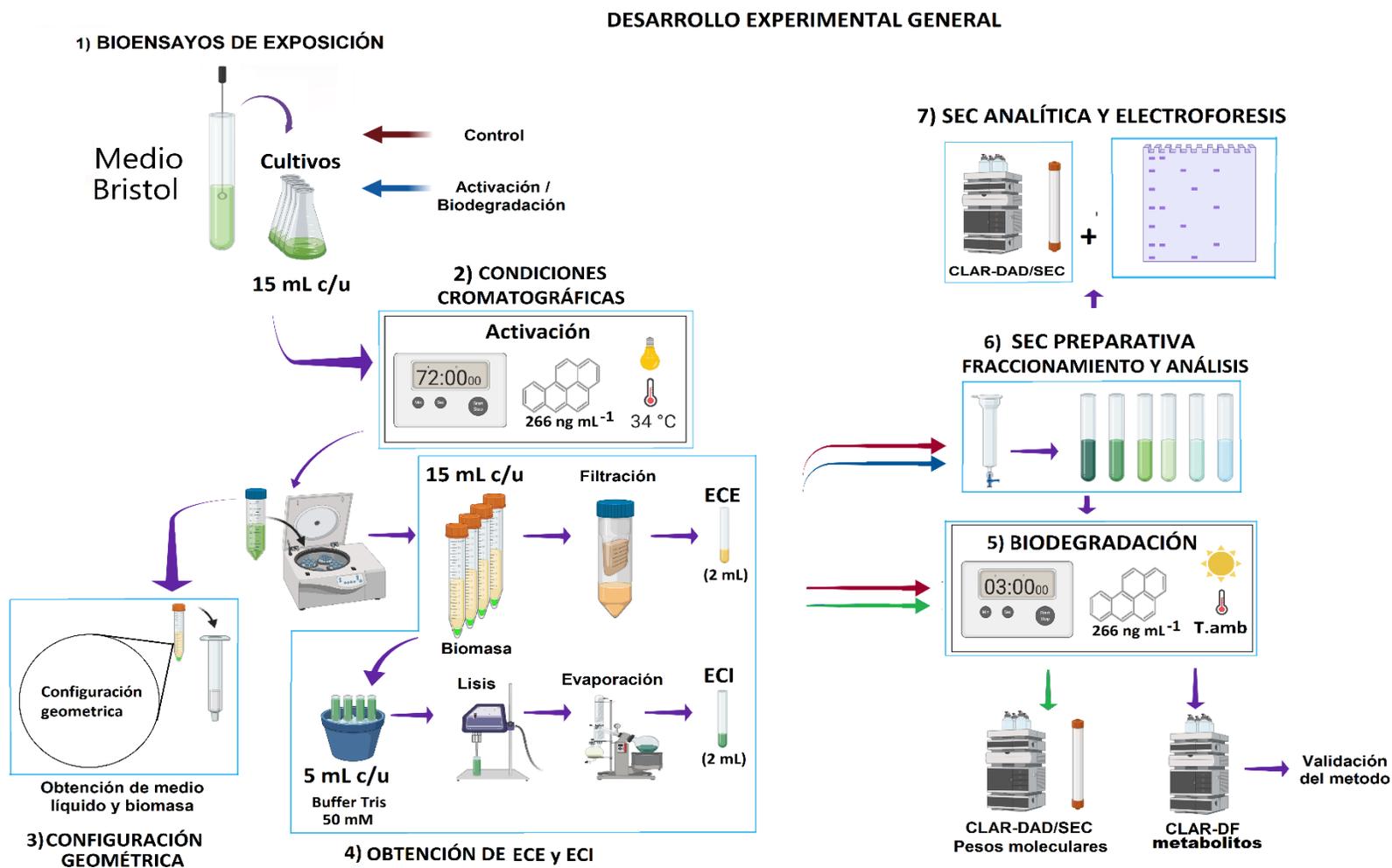


Figura 5.1. Diagrama general de los bioensayos y análisis realizados para la evaluación de la degradación de *B[a]A* y *B[a]P* en extractos crudos y fraccionados por Cromatografía de Exclusión Molecular.

3) Después, se empleó el bioensayo de 6 h para realizar la evaluación de la configuración geométrica de los metabolitos de *B[a]P* por Extracción en Fase Sólida / Dispersión de Matriz en Fase Sólida y Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución y detección por fluorescencia.

4) El medio líquido (15 mL) y la biomasa (5 mg de biomasa seca) provenientes de los cultivos fueron colectados por centrifugación (3900 rpm, 15 min) y acumulados en grupos de 4 cultivos. Cada grupo de medio líquido se filtró través de una membrana centricon (30 kDa de 2 ó 15 mL de capacidad) llevándolos a un volumen de 0.5 ó 2 mL. Por su parte, la biomasa proveniente de cada cultivo fue suspendida de manera individual en medio de lisis (5 mL) y se les realizó la lisis celular por ultrasonido. Los lisados celulares fueron colectados individualmente por centrifugación (3900 rpm, 4 °C, 15 min), y colocados en conjunto en un solo matraz donde se redujeron por empleo de un rotavapor bajo condiciones suaves a un volumen final de 2 mL.

5) Los volúmenes reducidos fueron identificados como extractos crudos (extracto crudo *intracelular* y extracto crudo *extracelular*) provenientes de biomasa y medio líquido; respectivamente. Posteriormente, los extractos crudos fueron fraccionados por Cromatografía de Exclusión Molecular preparativa empleando los empaques: Sephadex G-50 y Sephadex G-100. Las fracciones obtenidas fueron sometidas a los ensayos de evaluación de la biodegradación, y posterior análisis por Cromatografía de Exclusión Molecular analítica, en búsqueda de diferencias proteicas en los cromatogramas obtenidos de las fracciones de extractos crudos expuestas a HAP de alto peso molecular comparadas con los cromatogramas de las fracciones de extractos crudos control sin exposición al HAP.

6) Para evidenciar la presencia del sistema enzimático responsable de la biodegradación, los extractos crudos se expusieron a los HAP para determinar la cantidad de metabolitos producidos bajo condiciones de luz y temperatura ambiente (a 50 rpm) a diferentes intervalos de tiempo indicados en la sección 5.3.4.1., ensayos identificados como “ensayos de evaluación de la biodegradación”. La evaluación de la biodegradación se realizó cuantificando la producción de metabolitos en los extractos crudos y diferenciándolas de su producción en los bioensayos de activación los cuales fueron considerados como controles de residuos. Estos últimos correspondieron a extractos crudos provenientes de cultivos activados, expuestos a las condiciones de evaluación de la biodegradación en

ausencia de HAP.

7) Finalmente, las fracciones gruesas obtenidas con la fase Sephadex G-100 (8 mL) fueron llevadas a un fraccionamiento fino empleando esta misma fase en volúmenes de 2 y 1 mL. En dichas fracciones colectadas de este proceso se realizaron ensayos de evaluación de la biodegradación monitoreando la aparición de metabolitos por Extracción en Fase Sólida-Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución y obteniendo el perfil proteico presente por Cromatografía de Exclusión Molecular analítica. El perfil proteico de las fracciones que presentaron formación de metabolito fue confirmado por electroforesis de una dimensión (SDS-PAGE) y comparado con fracciones obtenidas por Cromatografía de Exclusión Molecular de los controles provenientes de cultivos incubados en ausencia de HAP de alto peso molecular. Las diferencias observadas en el perfil proteico de los componentes *intra-* y *extra-* celulares de los cultivos de las microalgas verdes se asociaron a la degradación del *B[a]P*.

5.1.1. Instrumentación y material

En la tabla 5.1. se muestran las diferentes condiciones, materiales y actividades desarrolladas en la investigación.

Tabla 5.1. Resumen de condiciones, materiales y actividades desarrolladas en esta investigación.

Métodos	Instrumentación y material
1. Estándares HAP	- <i>B[a]P</i> pureza $\geq 99\%$ <i>B[a]A</i> pureza $\geq 96\%$ de Chem service (West Chester, PA, EUA). Almacén a 4 °C y oscuridad.
- Análisis cromatográfico de HAP	- Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) con equipo Varian 9065 Polychrom con bomba ProStar 210. Fase móvil CH ₃ OH:H ₂ O 85:15% Flujo 1 mL min ⁻¹ . Software Workstation 6.0 1989-2003. Detector Ultravioleta con arreglo de fotodiodos λ 263 nm (<i>B[a]P</i>), 287 nm (<i>B[a]A</i>). Rizo de inyección 20 μ L / temperatura ambiente. Columna Hypersil ODS Thermo Scientific (150 mm x 4.6 mm x 5 μ m). Pre-columna Nucleosil C18 (20 mm x 2.0 mm x 5 μ m).
- Extracción: Extracción en Fase Sólida (EFS)/ Dispersión de Matriz en Fase Sólida	- Cartuchos de 6 mL / 1 mL. Empaque Supelco Supelclean LC-18 (45 μ m) de Sigma Aldrich. Filtros de polietileno de 20 μ m y diámetro de 12.7mm / 6.4 mm. Jeringas de plástico de 20 mL con adaptadores mariposa. Viales de vidrio transparente y ámbar de 4 mL / 1.5 mL. Matraces Kitasato con tapones horadados y cánula de acero inoxidable acoplados al sistema de vacío. Mortero de ágata con pistilo. Extracto con HAP 4 / 1 mL en la mezcla de CH ₃ CN: H ₂ O al 100% / 90% en EFS y DMFS; respectivamente.

Métodos	Instrumentación y material
(DMFS) de HAP	
<p data-bbox="196 304 365 336">2. Metabolitos</p> <p data-bbox="196 598 365 693">- Análisis cromatográfico de metabolitos</p> <p data-bbox="196 829 365 924">- Extracción: EFS / DMFS de metabolitos</p>	<p data-bbox="472 304 1422 535">- 4,5-<i>cis</i>-dihidrodiol benzo[<i>a</i>]pireno (4,5-<i>cis</i>-dB[<i>a</i>]P) / 4,5-<i>trans</i>-dihidrodiol benzo[<i>a</i>]pireno (4,5-<i>trans</i>-dB[<i>a</i>]P) / 7,8-<i>cis</i>-dihidrodiol benzo[<i>a</i>]pireno (7,8-<i>cis</i>-dB[<i>a</i>]P) / 7,8-<i>trans</i>-dihidrodiol benzo[<i>a</i>]pireno (7,8-<i>trans</i>-dB[<i>a</i>]P) / 5,6-<i>cis</i>-dihidrodiol benzo[<i>a</i>]antraceno (5,6-<i>cis</i>-dB[<i>a</i>]A) pureza ≥ 99 % de NCI Chemical Carcinogen Reference Standards Repository (Kansas, Missouri, EE. UU.). Almacén a 4 °C y oscuridad.</p> <p data-bbox="472 577 1422 766">- CLAR Varían ProStar con bomba Varian 9012. Fase móvil CH₃OH:H₂O 62: 38% Flujo 1 mL min⁻¹. Rizo de inyección 20 µL / temperatura ambiente. Columna Microsorb- MV 100-5 C18 (250 x 4.6 mm). Pre-columna Nucleosil C18 (20 mm x 2.0 mm x 5 µm). Detector Varían ProStar 363 λ excitación de 264 nm, λ emisión de 390 nm. Software Workstation 6.0 1989-2003.</p> <p data-bbox="472 808 1422 924">- Material listado en sección 1. Extracto con metabolitos 3 / 1.5 mL en la mezcla de CH₃CN: H₂O al 55% / 40% en EFS y DMFS; respectivamente.</p>
<p data-bbox="196 934 365 997">3. Cultivos de microalgas</p> <p data-bbox="196 1186 365 1281">- Ensayos de activación de cultivos</p> <p data-bbox="196 1323 365 1480">- Ensayo de evaluación de degradación en extractos crudos</p> <p data-bbox="196 1522 365 1648">- Obtención de extractos por ultrasonido. Lisis celular</p> <p data-bbox="196 1753 365 1816">- Concentración de extractos</p>	<p data-bbox="472 934 1422 1239">- <i>Scenedesmus acutus</i> y <i>Selenastrum capricornutum</i> de la colección de cultivos de algas de la Universidad de Austin, Texas (EE. UU.). Medio líquido y medio sólido Bristol con componentes grado reactivo [NaNO₃ (2.94 mM), CaCl₂·2H₂O (0.17 mM), MgSO₄·7H₂O (0.30 mM), K₂HPO₄ (1.29 mM), KH₂PO₄ (1.29 mM), NaCl (0.43 mM) y peptona proteosa al 0.1% m/v]. Agar bacteriológico (MCD LAB, Edo Mex, Mex) para medios sólidos. Tubos fluorescentes de 14 W, temporizador Steren Temp 08E. Agitador orbital Hinotek HZ 300. Exposición a luz blanca, en medio con pH 7.</p> <p data-bbox="472 1281 1422 1312">- Incubadora Jeio Tech SI-600R acoplada a lámpara de luz amarilla de 40 W.</p> <p data-bbox="472 1354 1422 1386">- Agitador orbital Thermo Scientific Compact Digital Mini Rotator.</p> <p data-bbox="472 1428 1422 1711">- Procesador ultrasónico digital 450 Branson (400 watts, 20 kHz) con micropunta de 1/8 de pulgada. Procesador ultrasónico Cole Palmer CP 505 (400 watts, 50/60 kHz) con micropunta de 1/8 de pulgada. Viales de vidrio transparente de 12 mL, tubos de centrifuga de 15 mL y baño de hielo. Microscopio óptico modelo National Optica acoplado a cámara digital Hinotek modelo HD Lite. Amplitud al 20% pulsos de 10 segundos y pausas de 5 segundos para 5 minutos totales de exposición al ultrasonido</p> <p data-bbox="472 1753 1422 1827">- Rotavapor Büchi R-205 con baño calefactor B-490, bomba recicladora B740/8, bomba de vacío V-500, controlador V-805. Membranas de filtración</p>

Métodos	Instrumentación y material
	YM-30 centricon de 2 y 15 mL. Centrífuga Sigma 2-5. Centrífuga de alta velocidad Beckman-Coulter Allegra 64R.
4. Proteínas totales (Lowry)	- Tubos de centrifuga de 1.5 mL. Agitador Vortex-Ginie SI-P236, Scientific Industries. Espectrofotómetro Genesys 10S Thermo Scientific. Celdas de metacrilato de 2 mL. Na ₂ CO ₃ , CuSO ₄ y NaOH (J.T. Baker). KNaC ₄ H ₄ O ₆ ·4H ₂ O, reactivo Folin y albúmina de suero bovino de Sigma-Aldrich. SDS de Kodak de (Rochester, Nueva York, EE. UU.). <i>Selenastrum capricornutum</i> y <i>Scenedesmus acutus</i> (5 x10 ⁶ células mL ⁻¹).
5. Cromatografía de Exclusión Molecular	- Estándares: Tiroglobulina (669 kDa), amilasa (200 kDa), albumina (66 kDa), anhidrasa (29 kDa), aprotinina (6.51 kDa) y uracilo (0.12 kDa) de Sigma-Aldrich. Almacén a -20 °C y oscuridad.
- Cromatografía de Exclusión Molecular analítica	- CLAR Waters 1525 con bomba binaria Waters 1525. Fase móvil amortiguador de fosfatos 0.015 M pH 7 flujo de 1 mL min ⁻¹ . Rizo de inyección 20 µL / temperatura ambiente. Columnas SRT SEC 300, 5-1250 kDa, (5 µm 300 Å 7.8 x 300 mm) y Agilent Bio SEC-5, 0.5-150 kDa, (5 µm 150 Å 7.8 x 300 mm). Pre-columnas de la fase estacionaria correspondiente (5 µm, 7.8 X 50 mm). Detector Ultravioleta con arreglo de fotodiodos Waters 2998 con λ variable de 205 a 280 nm. Software Empower 3.
- Cromatografía de Exclusión Molecular preparativa	- Columnas de vidrio chemglass de 20 cm ³ / 30 cm ³ . Empaque Sephadex G-50 (1.18 g), 1.5 a 30 kDa / G-100 de Sigma (0.71g), 4 a 150 kDa. Amortiguador Tris 0.05 M pH 7.6 de Bio-Rad pureza 99,8% (Hércules, California, EE. UU.). Azul dextran (2000 kDa) y azul de bromofenol (0.67 kDa) de Thermo Scientific).
6. Electroforesis	- Nano-Drop One (280 nm), Electroforesis de una sola dimensión (1-DE) SDS-PAGE. Configuración electroforética: gel concentrador SDS-PAGE (4%) y gel de resolución (12%). Amortiguador Urea (6M) – amortiguador tris-HCl (0.1M), pH 8.5 y Amortiguador de carga. Lisozima (1 µg µL ⁻¹), Fuente de poder a 135 V, solución de tinción constituida por: amonio (8% m/v), ácido fosfórico (2%), metanol (20%) y azul Coomassie G-250 (0.1%) y agua destilada. Densitómetro GS-900 y biomarcadores Bio-Rad. Estándares de PM correspondiente a 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20 y 15 kDa
7. Otros equipos y materiales	- Agua (18.2 MΩ.cm ⁻¹ a 25 °C) de Simplicity UV Millipore (Bedford, MA, EE. UU.). Acetonitrilo, isopropanol, metanol grado HPLC y NaCl de J. T. Baker (Phillipsburg, Nueva Jersey, EE. UU.). - Balanza analítica Ohaus Adventurer Pro AV114C. Autoclave Tuttnauer 2540EL. Sonda potenciométrica Corning 220. Micropipetas Eppendorf de volumen variable. Material de cristalería de volumen variable.

5.2. Metodología analítica

5.2.1. Análisis cromatográfico de HAP

Para seleccionar las condiciones de la determinación en medio líquido y biomasa de *B[a]A* y *B[a]P* se probaron diferentes columnas y composición de la fase móvil, con las cuales se realizaron pruebas para seleccionar el mejor sistema cromatográfico. Los diversos sistemas cromatográficos usados están descritos en la tabla 5.2.

Tabla 5.2. Sistemas cromatográficos usados en el análisis de *B[a]A* y *B[a]P* y sus metabolitos.

Compuesto	Sistema	Columna	Fase Móvil	Detector
Hidrocarburo	1	ODS Hypersil 5 μ m, 150 mm x 4.6 mm	CH ₃ OH 100	Ultravioleta λ 263 nm - <i>B[a]P</i> 287 nm - <i>B[a]A</i>
	2	ODS Hypersil 5 μ m, 150 mm x 4.6 mm	CH ₃ OH: H ₂ O 85:15	
Metabolitos	3	Chiralpak IC 5 μ m, 4.6 mm x 250 mm	CH ₃ CN: H ₂ O 90:10	
	4	Eclipse XDB-C18 3.5 μ m, 4.6 mm x 150 mm	CH ₃ OH: H ₂ O 65:35	Fluorescencia λ excitación 264 nm, emisión 390 nm
	5	Hypercarb 5 μ m, 3 mm x 150 mm	CH ₃ CN 100	
	6	Envirosep PP 5 μ m, 4.6 mm x 125 mm	CH ₃ OH: H ₂ O 65:35	
	7	Microsorb-MV 100-5 C-18 5 μ m, 4.6 mm x 250 mm	CH ₃ OH: H ₂ O 62:38	

Todos los sistemas contaron con un flujo de 1 mL min⁻¹ y temperatura ambiente

5.2.2. Análisis cromatográfico de metabolitos

Para la separación de los metabolitos se optimizaron y evaluaron parámetros cromatográficos como la resolución, factor de capacidad, eficiencia y selectividad. Los sistemas cromatográficos usados se enlistan en la tabla 5.2. La separación se optimizó con los estándares de los compuestos *cis*- y *trans*- del 4,5 *dB[a]P* y 7,8 *dB[a]P*, ya que su presencia ha sido vinculada como productos de degradación del *B[a]P*. Los estándares fueron usados a una concentración de 10 ng mL⁻¹. Adicionalmente, se analizó al 5,6-*cis*-*dB[a]A* como producto de degradación de *B[a]A*.

5.2.3. Extracción en fase sólida

La extracción de los analitos provenientes de muestras líquidas se realizó por Extracción en Fase Sólida (Olmos-Espejel et al., 2012). El material usado está enlistado en la tabla 5.1., sección 2. La fase estacionaria, 300 mg de sílice C-18, se empacó en cartuchos de polipropileno de 6 mL y se contuvo por filtros en la base y la parte superior de la fase. En el acondicionamiento se emplearon 2 mL de metanol, 1 mL de Acetonitrilo (ACN) y 10 mL de H₂O desionizada. El volumen de las muestras dependió de su origen, trabajando con 15 mL del medio líquido y volúmenes menores al trabajar con fracciones de los extractos crudos. La muestra se aplicó con un flujo continuo a gravedad; la eliminación de los interferentes de la muestra (lavados), se realizó con agua desionizada (10 mL) y mezclas de ACN: H₂O al 10% (10 mL), 20% (3 mL), y 30 % (1 mL) con flujo asistido por vacío. Por último, la elución de los metabolitos se realizó con mezclas de ACN: H₂O al 55% (3 mL) seguida de la elución del HAP con ACN al 100% (4 mL); los extractos que contenían a los metabolitos y HAP se eluyeron continuamente a gravedad colectándolos en viales de vidrio ámbar y transparente; respectivamente, para posteriormente analizarlas por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

5.2.4. Dispersión de matriz en fase sólida

La extracción de los analitos provenientes de la biomasa microalgal se realizó por Dispersión de Matriz en Fase Sólida (Hernández Blanco y García de Llasera, 2016). El material usado está enlistado en la tabla 5.1., sección 2. En la Dispersión de Matriz en Fase Sólida se emplearon aproximadamente 5 mg de biomasa seca homogeneizada con sílice C-18 (100 mg) previamente activada con metanol (1 mL / 100 mg de fase) y secada para su uso, por vacío. La mezcla se empacó en cartuchos de polipropileno de 1 mL y se contuvo con filtros en la base y la parte superior de la mezcla. La eliminación de los interferentes de la muestra (lavados), se realizó con agua desionizada (10 mL), y mezclas de Acetonitrilo (ACN):H₂O al 10% (10 mL) y 20% (5 mL). Por último, la elución de los metabolitos se realizó con mezclas de ACN: H₂O al 40% (1.5 mL) seguida de la elución del HAP con ACN: H₂O al 90% (1 mL); los diferentes disolventes fluyeron continuamente asistidos por vacío exceptuando las mezclas de los disolventes para extraer los metabolitos y los HAP, de las cuales su colecta se realizó a gravedad colectando los analitos en viales de vidrio ámbar y transparente; respectivamente. Los extractos obtenidos se analizaron por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

5.2.5. Validación de la metodología cromatográfica y del tratamiento de muestra

La validación del método empleó medio líquido obtenido por centrifugación y biomasa de cultivos de la

microalga *Selenastrum capricornutum* de un volumen de 15 mL. Las muestras fueron colectadas por centrifugación. El procedimiento de fortificación para la evaluación de los recobros y la validación del método de determinación de los HAP y metabolitos de seguimiento se describe a continuación.

5.2.5.1. Análisis de *B[a]A* y *B[a]P* por Extracción en Fase Sólida / Dispersión de Matriz en Fase Sólida-Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución

La validación del método para el análisis de los HAP se realizó mediante la fortificación de medio líquido y muestras de biomasa de *Selenastrum capricornutum* por triplicado. El HAP, el componente del cultivo y las concentraciones de fortificación se encuentran listadas en la tabla 5.3. Posteriormente, se realizó el análisis estadístico al completar el análisis cromatográfico de los componentes del cultivo fortificado.

Tabla 5.3. Condiciones utilizadas en la validación del método usado en la determinación y cuantificación de *B[a]P* y *B[a]A* en medio líquido o biomasa.

Analito	Concentración en medio líquido $\mu\text{g mL}^{-1}$	Concentración en biomasa ng mg^{-1}
<i>B[a]P</i>	0.1, 0.3, 0.5, 0.8, 1.1, 1.4, 1.7, 2	0.1, 0.3, 0.5, 0.8, 1.1, 1.4, 1.7, 2
<i>B[a]A</i>	0.2, 0.5, 0.7, 1, 1.3, 1.6, 2	0.2, 0.5, 0.7, 1, 1.3, 1.6, 2

Las muestras fortificadas con *B[a]P* (0.5, 0.8 y 1.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) obtenidas del medio líquido y la biomasa seca fueron usadas para evaluar la reproducibilidad en el recobro en las metodologías del tratamiento de Extracción en Fase Sólida y Dispersión de Matriz en Fase Sólida. Por otra parte, las muestras fortificadas con *B[a]A* (0.5, 1.0 y 1.6 $\mu\text{g mL}^{-1}$) obtenidas del medio líquido y biomasa, también se emplearon para evaluar la reproducibilidad en el recobro por Extracción en Fase Sólida y Dispersión de Matriz en Fase Sólida para este analito. La reproducibilidad se evaluó intradía por la desviación estándar relativa. El límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC) se calcularon a través del método estadístico de los mínimos cuadrados. De este análisis se obtuvo la pendiente (m) del intervalo lineal, la ordenada y la desviación estándar (DS). (Björck 1990; Allegrini y Oliveri 2014). Este proceso relacionó la pendiente del intervalo lineal y la desviación estándar de la ordenada, esta relación multiplicada 3.3 veces y 10 veces sirvieron para determinar el LD y LC; respectivamente.

5.2.5.2. Análisis de metabolitos de interés de *B[a]A* y *B[a]P* por Extracción en Fase Sólida / Dispersión de Matriz en Fase Sólida-Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución

Las concentraciones de las fortificaciones realizadas en medio líquido y biomasa seca variaron con el metabolito (*4,5-cis-dB[a]P*, *7,8-cis-dB[a]P* y *5,6-cis-dB[a]P*) y la muestra ocupada; éstas se enlistan en la tabla 5.4. La experimentación contó con tres réplicas en la evaluación realizada intradía. El LD y el LC se calcularon usando la *m* del intervalo lineal, la ordenada y su DS, valores obtenidos por el método estadístico de los mínimos cuadrados (Björck 1990; Allegrini y Oliveri 2014). El medio líquido y la biomasa fortificadas por alícuotas de los metabolitos fueron usadas en la evaluación de la reproducibilidad (recobro, DS) del tratamiento de muestra (Extracción en Fase Sólida y Dispersión de Matriz en Fase Sólida).

Tabla 5.4. Condiciones utilizadas en la validación del método usado en la determinación y cuantificación de *4,5-cis-dB[a]P*, *7,8-cis-dB[a]P* y *5,6-cis-dB[a]A* en medio líquido y biomasa.

Analito	Concentración en medio líquido ng mL ⁻¹	Concentración en Biomasa ng mg ⁻¹
<i>4,5-cis-dB[a]P</i>	2, 5, 10, 15, 20, 25, 30	2, 5, 10, 15, 20, 25, 30
<i>7,8-cis-dB[a]P</i>	2.5, 5, 10, 20, 25, 30, 50	2.5, 5, 10, 20, 25, 30, 50
<i>5,6-cis-dB[a]A</i>	0.125, 0.25, 0.5, 1.25, 2.5, 5	0.125, 0.25, 0.5, 1.25, 2.5, 5

5.2.6. Evaluación de configuración geométrica

Este análisis uso biomasa y medio líquido tratados por Dispersión de Matriz en Fase Sólida y Extracción en Fase Sólida; respectivamente, provenientes de cultivos expuestos por 6 h con *B[a]P*. La instrumentación de la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución se encuentra enlistada en la tabla 5.1., sección 2. La configuración de los sistemas cromatográficos 2 y 6 enlistadas en la tabla 5.2 fueron las usadas al considerar su idoneidad para la determinación de la configuración geométrica de los metabolitos. La identificación de los metabolitos se realizó por comparación con los tiempos de retención de los estándares *cis*- y *trans*- de *4,5-dB[a]P* y *7,8-dB[a]P* y esta se corroboró por el método de adición estándar de los metabolitos de interés en la biomasa y el medio líquido.

5.2.7. Obtención de extractos enzimáticos

5.2.7.1. Lisis celular

Para realizar la lisis celular se tomó la biomasa húmeda obtenida por centrifugación (3900 rpm, 15 min) de cultivos activados por exposición al HAP. El sobrenadante se separó de la biomasa y se le agregó amortiguador Tris 0.05 M pH 7.6, constituyendo así al extracto crudo *extracelular*. El botón de la biomasa se suspendió y se enjuagó con 3 mL de amortiguador Tris 0.05 M pH 7.6 desechando nuevamente por centrifugación los residuos de HAP y metabolitos posiblemente presentes en el amortiguador de enjuague. La biomasa colectada se suspendió en 5 mL de medio de lisis, amortiguador Tris 0.05 mM pH 7.6, y se contuvo en un vial de 12 mL para después colocarla en un baño de hielo por 15 min (4 °C). Dentro del baño de hielo, la biomasa en el vial se sometió al proceso de ultrasonido. Las condiciones de aplicación del ultrasonido por pulsos automatizados probadas están enlistadas en la tabla 5.5.

Tabla 5.5. Evaluación del proceso de lisis. Condiciones usadas en la optimización del proceso automatizado de ultrasonido.

Potencia (amplitud) %	Composición medio de lisis (5 mL)	Pulso (seg) / pausa (seg)- Total (min)
40	amortiguador Tris 0.05 M pH 7.6	10 / 5-5
40		20 / 10-5
40		10 / 5-10

Al término de la aplicación del ultrasonido, y por centrifugación (3900 rpm, 15 min) se colectó el lisado o extracto crudo *intracelular* descartando los restos celulares. El extracto crudo intracelular se llevó a un volumen final de 15 mL para conservar el mismo volumen usado en Extracción en Fase Sólida para la extracción de los analitos del medio líquido, agregando el amortiguador Tris a 0.05 M pH 7.6 para favorecer la estabilidad enzimática. Posteriormente, se realizó la cuantificación de proteínas totales por el método de Lowry incubando las muestras a 24°C (temperatura ambiente), por un intervalo de 30 minutos (a 785 nm) en el extracto crudo extracelular y en el extracto crudo intracelular proveniente de *S. capricornutum*, esta metodología se describe en el material anexo de esta tesis (A.1.).

Con el objeto de aumentar la cantidad de proteína total en el lisado, se usaron cultivos de la microalga *Scenedesmus acutus*, la cual tiene un rápido crecimiento. Esta especie fue seleccionada para trabajar con 1, 2 y 4 cultivos de 15 mL expuestos a *B[a]P*. La evaluación del proceso de lisis celular se realizó inicialmente

con el equipo Branson Digital Sonifier 450, avanzada la investigación este fue remplazado por el equipo Cole Palmer modelo CP 505. El remplazo fue efectuado en función de la amplitud debido a frecuencias diferentes en los equipos, siendo mayor en el equipo nuevo. La selección de la amplitud buscó no perjudicar la biodegradación en el extracto crudo intracelular ya que se observó que la aplicación de una amplitud mayor a una frecuencia elevada afecta el nivel de biodegradación, disminuyendo la presencia de los metabolitos de seguimiento. Los resultados se encuentran en el material anexo de esta tesis (A.2.).

Adicionalmente, se cuantificó la proteína total existente en los extractos crudos (intra- y extra- celular) mediante el empleo de cultivos expuestos a *B[a]P* (266 ng mL⁻¹) de 48 y 72 h (34 °C) de *Scenedesmus acutus* y *Selenastrum capricornutum*. La cantidad de proteína obtenida se comparó contra la observada en extractos crudos controles, obtenidos de cultivos no expuestos al *B[a]P*, para observar si la activación estuvo relacionada a un aumento de la producción del material proteico.

5.2.7.2. Concentración de extractos crudos por evaporación y filtración

Las condiciones óptimas para la obtención de extractos crudos se lograron usando cultivos activados por exposición al HAP durante 72 h (en presencia de luz amarilla, 50 rpm y 34 °C), los cuáles posteriormente fueron centrifugados para recuperar la biomasa y el medio líquido. La lisis celular de la biomasa se realizó en 5 mL del amortiguador Tris (50 mM pH 7.6) con pulsos de 10 segundos automatizados y pausas intermedias de 5 segundos para suministrar 5 minutos de exposición al ultrasonido. El medio líquido se adicionó con amortiguador Tris para obtener la concentración 50 mM pH 7.6. En el proceso de concentración de los extractos crudos se empleó un “acumulado” de estos, constituido por un mayor número de cultivos activados (15 mL c/u) por exposición con el HAP para favorecer la presencia de una mayor cantidad del sistema enzimático involucrado. De esta manera, en el procedimiento se utilizaron 4 cultivos de *Selenastrum capricornutum* activados por 72 h con *B[a]P*. Por centrifugación (3900 rpm, 15 min) se colectó la biomasa y el medio líquido de los cultivos (15 x 4 = 60 mL en total); el medio líquido adicionado con el amortiguador Tris constituyó así el extracto crudo extracelular. Posteriormente, se obtuvo individualmente la biomasa de cada cultivo proveniente del bioensayo de activación, y empleando las condiciones óptimas de ultrasonido mencionadas, se obtuvieron los extractos crudos intracelulares (5 mL c/u); después el extracto crudo intracelular acumulado (5 x 4 = 20 mL en total). Los extractos crudos extracelular e intracelulares acumulados fueron evaporados por separado hasta 2 mL usando el rotavapor y condiciones suaves de evaporación (85 rpm / 37 °C / 10 mbar). Posteriormente, los dos extractos crudos obtenidos fueron filtrados empleando el dispositivo centricon de 2 mL (membrana de 30 kDa), hasta un

volumen final de 0.5 mL por medio de centrifugación (4100 rpm / 20 min aproximados). Finalmente, los extractos crudos concentrados fueron separados de restos sólidos por centrifugación a temperatura controlada (3900 / 15 min / 4 °C) para después evaluar en ellos la biodegradación exponiéndolos al *B[a]P*. Igualmente, en el proceso de concentración se emplearon cultivos acumulados, en este caso de 12 cultivos de *Selenastrum capricornutum* para el fraccionamiento preparativo de los extractos crudos, sección 5.2.9.

5.2.8. Análisis de extractos crudos por Cromatografía de Exclusión Molecular

Los extractos crudos concentrados (x 4) y libres de restos celulares fueron analizados por Cromatografía de Exclusión Molecular a nivel analítico usando el equipo Waters 1525 (instrumentación en tabla 5.1., sección 5) y las dos columnas de exclusión molecular, construyendo una curva de calibración por cada columna. Los extractos crudos sometidos al bioensayo de evaluación de degradación por exposición al *B[a]P* se analizaron por comparación con extractos crudos controles provenientes de cultivos que no fueron activados con *B[a]P* en búsqueda de diferencias en sus componentes proteicos. El mismo proceso fue usado para el análisis de fracciones y subfracciones de los extractos crudos concentrados (x 12) obtenidos por Cromatografía de Exclusión Molecular a nivel preparativo, cuyo procedimiento se describe a continuación.

5.2.9. Fraccionamiento de extractos crudos concentrados en fases SEPHADEX por cromatografía de exclusión molecular preparativa

Posterior a la examinación analítica de extractos crudos (x 4) por Cromatografía de Exclusión Molecular se realizó la limpieza y fraccionamiento de los extractos crudos concentrados (x 12) por Cromatografía de Exclusión Molecular a nivel preparativo. Se usaron las columnas de cristal de 20 cm³ y 30 cm³ empacadas con 1.18 g de Sephadex G-50 (1.5 a 30 kDa) y 0.71 g de Sephadex G-100 (4 a 150 kDa); respectivamente. El amortiguador Tris 0.05 M pH 7.6 (100 mL) se usó para dejar hinchar las fases estacionarias por una noche entera. El mismo amortiguador Tris fue usado como fase móvil a gravedad (0.24 mL min⁻¹). El volumen de exclusión de los empaques se determinó con la elución del azul de dextran (2000 kDa), mientras que la determinación del volumen de permeación total se realizó con el azul de bromofenol (0.069 kDa), ambos colorantes a una concentración de 2 mg mL⁻¹. Estos volúmenes y el intervalo de trabajo, determinado por el volumen colectado después de la elución del azul dextran hasta recién comenzada la elución del azul de bromofenol, se presentan en la tabla 5.6. para ambas fases.

Tabla 5.6. Determinación del volumen de exclusión e intervalo de trabajo de Sephadex G-50 y Sephadex G-100, empaques usados al realizar la cromatografía de exclusión molecular.

Empaque preparativo	Volumen de exclusión (mL)	Intervalo de trabajo (mL)	Volumen de permeación total (mL)
Sephadex G-50	8.2 ± 0.06	10 ± 0.32	25.5 ± 0.2
Sephadex G-100	12.4 ± 0.53	16.05 ± 0.46	45.3 ± 1.7

Después de determinar estos parámetros con la fase G-50, se obtuvieron dos fracciones de cada extracto crudos concentrado por Cromatografía de Exclusión Molecular a nivel preparativo. La primera fracción estuvo compuesta por componentes > 30 kDa y se colectó a través de la elución de los primeros 8.2 mL de la fase móvil, volumen de exclusión. La segunda fracción contó con componentes entre 30 kDa - 1.5 kDa y se colectó con los siguientes 10 mL de la fase móvil, intervalo de trabajo. Por consiguiente, se colectaron 4 fracciones diferentes, teniendo el extracto crudo extracelular y el extracto crudo intracelular > 30 kDa y extracto crudo extracelular y extracto crudo intracelular de 30 kDa - 1.5 kDa a partir de 12 cultivos acumulados y reducidos. Estas fracciones se llevaron a un volumen final de 15 mL, en los cuales fue evaluada la biodegradación con 3 h de exposición a *B[a]P* a temperatura ambiente.

Como se ha mencionado, la fase Sephadex G-100 (0.71 g) se empacó en la columna de vidrio de 30 cm³. Al emplear esta configuración y eluir el extracto crudo intracelular y extracto crudo extracelular reducidos, se descartó el volumen de exclusión de 12.4 mL. El volumen de permeación total fue 45.3 ± 1.7 mL. En el intervalo de trabajo de 16.05 mL se colectaron dos fracciones, de cada extracto crudo reducido, identificadas como A y B, de 8 mL cada una, las cuales fueron utilizadas para la exploración del perfil proteico de la microalga *Selenastrum capricornutum* y la evaluación de la biodegradación de *B[a]P*. Posteriormente estas dos fracciones obtenidas por Cromatografía de Exclusión Molecular fueron fraccionadas cada una en 4 partes de 2 mL identificándolas como A1, A2, A3, A4 y B1, B2, B3, y B4; destacando que la biodegradación solo pudo seguirse con fracciones del extracto crudo intracelular descartando el empleo del extracto crudo extracelular. Finalmente, las fracciones obtenidas por Cromatografía de Exclusión Molecular del extracto crudo intracelular A1 y A2 fueron subfraccionadas en dos cada una, colectando así 4 fracciones de 1 mL cada una e identificadas como las fracciones A1a, A1b, A2a y A2b. Finalmente, todas las subfracciones fueron llevadas a Cromatografía de Exclusión Molecular analítica para la búsqueda de los PM de los componentes inducidos o inhibidos por la degradación,

identificados por comparación con las fracciones provenientes de cultivos control.

5.2.10. Análisis de subfracciones del extracto crudo intracelular por electroforesis

Las 4 subfracciones de A1a a A2b de extracto crudo intracelular concentrado y libre de restos celulares se analizaron por electroforesis con la instrumentación y material descrito en la tabla 5.1., sección 6. La lisozima ($1 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) se usó como referencia de cuantificación en $2 \mu\text{L}$ de la subfracción. La carga realizada en los pozos del gel concentrador empleó la mezcla de los estándares de PM y la mezcla individual de las subfracciones constituida por: $6 \mu\text{L}$ de la subfracción más $4 \mu\text{L}$ de la mezcla de amortiguador urea 6 M - amortiguador Tris 0.1 M pH 8.5 y $5 \mu\text{L}$ del amortiguador de carga. La migración de los componentes celulares se realizó por 2 horas a 135 V . Las proteínas se revelaron con la solución de tinción por 16 h. El proceso de lavado empleó agua destilada por 24 horas para posteriormente ser escaneado.

5.3. Bioensayos

5.3.1. Crecimiento de cultivos de *Scenedesmus acutus* y *Selenastrum capricornutum*

La siembra de las microalgas, *S. acutus* y *S. capricornutum* se realizó en medio Bristol sólido y líquido. El medio Bristol sólido (15 mL) fue contenido en tubos y sembrado en condiciones de esterilidad y asepsia renovándolos cada tres semanas para el crecimiento y mantenimiento de las microalgas. El medio Bristol líquido (200 mL) fortificado con peptona proteosa al $0.1\% \text{ m/v}$ se utilizó para cultivar ambas especies por separado dentro de matraces de vidrio (300 mL) para su crecimiento y uso en los bioensayos de activación por exposición a los HAP. Adicionalmente, se preparó medio líquido Bristol adicionado con peptona-proteosa al 0.01% para crecimiento de *S. capricornutum*. Ambas presentaciones de cultivos líquidos fueron sembrados por transferencia de biomasa por asada de cultivos sólidos. Los cultivos se agitaron orbitalmente a 80 rpm frente a lámparas fluorescentes que suministraron ciclos de luz y oscuridad (16 y 8 h ; respectivamente) hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial, 5×10^6 células mL^{-1} . El monitoreo del crecimiento se realizó bajo condiciones de esterilidad por medio de mediciones espectrofotométricas (685 nm) (Olmos-Espejel et al., 2012). De los cultivos en crecimiento exponencial (absorbancia 1 , 5×10^6 células mL^{-1}) se tomaron volúmenes de 15 mL , que se expusieron a HAP de alto peso molecular y de esta manera fueron obtenidos en todos los bioensayos.

5.3.2. Bioensayos con cultivos de *Selenastrum capricornutum* a diferentes tiempos.

La biodegradación a través del tiempo en los cultivos de las microalgas ya se ha estudiado previamente (Olmos-Espejel et al., 2012; Hernández Blanco y García de Llasera, 2016), por lo que en este trabajo se

realizó la corroboración de su desempeño utilizando solamente la microalga *Selenastrum capricornutum* mediante bioensayos de exposición a *B[a]P* por 1.5, 3, 4, 6, 48 y 72 h. Se monitoreó la desaparición del *B[a]P* y la aparición de su metabolito el 4,5 d-*B[a]P* por separado en los componentes del medio líquido y biomasa por Extracción en Fase Sólida-Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución y Dispersión de Matriz en Fase Sólida-Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución; respectivamente.

5.3.3. Bioensayos preliminares en extractos crudos

La evaluación de la biodegradación en el extracto crudo se realizó por la cuantificación de la aparición del 4,5-*cis*-d*B[a]P* y 7,8-*cis*-d*B[a]P*. En este proceso el extracto crudo intracelular y extracto crudo extracelular se expuso a *B[a]P* (266 ng mL⁻¹) en un intervalo de 3 h. El análisis y cuantificación de los metabolitos se realizó por Extracción en Fase Sólida-Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución / Detección por Fluorescencia.

En paralelo, se comparó la capacidad de la biodegradación de las células completas en un intervalo de 3h y los extractos crudos intracelulares provenientes de cultivos activados por *B[a]P* (266 ng mL⁻¹, 72 h). Al término de la activación de las células, se colectó la biomasa por centrifugación (3900 rpm, 15 min) para realizar una segunda exposición de las mismas células durante 3 h; también los extractos crudos intracelulares se expusieron con *B[a]P* (266 ng mL⁻¹) bajo las condiciones de biodegradación por 3 h. La biodegradación obtenida en ambas muestras fue comparada en función del metabolito 4,5-*cis*-d*B[a]P* presente.

5.3.4. Selección de condiciones de activación para los bioensayos con extractos crudos

Una vez determinadas las condiciones para la activación de las células se procedió a la evaluación de la biodegradación con los extractos crudos. Es decir, se realizó la exposición de cultivos con *B[a]A* y *B[a]P* (34 °C, agitación constante (50 rpm), luz amarilla y ambiente de esterilidad) durante diferentes tiempos a 266 ng mL⁻¹ del HAP, para lograr así la activación en la producción de enzima degradadora. Posteriormente, se obtuvieron los extractos crudos, en los que también se efectuó la evaluación de biodegradación con exposición al HAP. Para realizar este proceso se emplearon acumulados tres cultivos provenientes de bioensayos de activación. Los tiempos de incubación para la activación fueron de 48 y 72 h con *B[a]A* y *B[a]P* (por separado) para *S. capricornutum*, mientras que los cultivos de *S. acutus* se incubaron con *B[a]P* durante 48, 72, 144 horas y 2 semanas y con *B[a]A* durante 48 y 72 h. La instrumentación usada se encuentra en la tabla 5.1., sección 3. Al término del bioensayo de activación se colectó la biomasa y el

medio líquido por centrifugación (3900 rpm / 15 min). Las cantidades de los metabolitos en los extractos crudos arrastrados del bioensayo de activación se determinaron y se asumieron como cantidades residuales presentes en la evaluación de la degradación con los extractos enzimáticos, extracto crudo extracelular y extracto crudo intracelular.

5.3.4.1. Bioensayos de evaluación de biodegradación con extractos crudos no concentrados

Después de realizado el bioensayo de activación con cultivos de 15 mL, el medio líquido obtenido por centrifugación fue adicionado con 1.7 mL de amortiguador Tris 50 mM pH 7.6 para la preservación de sus componentes proteicos constituyendo el extracto crudo *extracelular*. La biomasa se trató por ultrasonido empleando las condiciones óptimas de este proceso y el lisado constituyó el extracto crudo *intracelular*. Destacando que estos extractos crudos se analizaron por Extracción en Fase Sólida- Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución-Detección por Fluorescencia empleando el sistema cromatográfico No. 7 de la tabla 5.2. para determinar la cantidad residual de metabolito. La evaluación de la biodegradación de los extractos crudos (extra- e intra- celular) se realizó exponiéndolos al HAP usado en los bioensayos de activación (266 ng mL^{-1}) a temperatura y luz ambiente, así como agitación constante (50 rpm) a diferentes periodos de tiempo. La selección del periodo de activación se basó en que se tuvieran las menores cantidades residuales posibles de los analitos y así, poder diferenciar la biodegradación observada en los extractos crudos a los diferentes intervalos de tiempo de incubación evaluados por la presencia del sistema enzimático activo. Las condiciones usadas de activación de las células y la evaluación de la biodegradación en los extractos crudos se muestran en la tabla 5.7.

Tabla 5.7. Condiciones evaluadas en los bioensayos de activación y la evaluación de degradación realizados con *S. capricornutum* y *S. acutus*.

Especie	HAP	Activación (h)	Evaluación de biodegradación (h) en extractos crudos	Metabolito monitoreado
<i>S. capricornutum</i>	<i>B[a]P</i>	48 / 72	1.5, 3 y 6	4,5- <i>cis</i> -dB[a]P
	<i>B[a]A</i>		3, 6, 9, 14 y 17	5,6- <i>cis</i> -dB[a]A
<i>S. acutus</i>	<i>B[a]P</i>	48 / 72 / 144 / 336	3	4,5 -/ 7,8- <i>cis</i> -dB[a]P
	<i>B[a]A</i>		3	5,6- <i>cis</i> -dB[a]A

5.3.5. Evaluación de biodegradación en extractos crudos concentrados

Los extractos crudos provenientes de cuatro cultivos de microalgas activados (15 x 4 = 60 mL de extracto crudo extracelular 5 x 4 mL = 20 mL de extracto crudo intracelular), después de ser concentrados se llevaron a un volumen de 15 mL conservando la concentración del amortiguador Tris 50 mM pH 7.6 y se realizó una exposición de 3 h frente al *B[a]P* (266 ng mL⁻¹). Al finalizar el proceso, los extractos fueron analizados por Extracción en Fase Sólida-Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución mediante el sistema cromatográfico 7 y la instrumentación ya descrita (tabla 5.2). Las cantidades de los HAP y metabolitos determinados en los bioensayos con extractos enzimáticos, extracto crudo intracelular y extracto crudo extracelular, expuestos al *B[a]P* fueron comparados con sus respectivos controles residuales, los cuales fueron extractos crudos concentrados obtenidos de cultivos activados con *B[a]P* pero que no fueron sometidos al bioensayo de evaluación de biodegradación.

También se trabajó con un “acumulado” de extracto crudo intracelular y extracto crudo extracelular provenientes de un mayor número de cultivos (12 en lugar de 4) con activación por exposición al *B[a]P*, que fueron usados posteriormente en la metodología de la Cromatografía de Exclusión Molecular preparativa (que se describirá más adelante). Para obtener el acumulado de extracto crudo intracelular y extracto crudo extracelular se necesitaba aumentar el tiempo de tratamiento de muestra para reducir el volumen total del extracto crudo extracelular (15 x 12 = 180 mL) por empleo del rotavapor, lo cual no fue realizado, por ser muy tardado. En este caso, mejor se usó el dispositivo centricon de 15 mL (30 kDa, 4750 rpm) para la obtención del extracto crudo extracelular concentrado. Como otra opción para realizar la concentración de los extractos también se probó el proceso de diálisis con una membrana de celulosa, pero los extractos crudos no mostraron disminución en la pigmentación, viscosidad o componentes sólidos suspendidos al término de 5 días de empleo; cambios que resultarían favorables para un posterior análisis cromatográfico, por lo que este método de concentración se descartó.

5.3.6. Evaluación de biodegradación en fracciones obtenidas por Cromatografía de Exclusión Molecular de extractos crudos con Sephadex G-50

Para conservar las condiciones de operación de Extracción en Fase Sólida, cada fracción (8.2 mL, > 30 kDa y 10 mL, 30 kDa - 1.5 kDa) se diluyó llevándola a un volumen final de 15 mL preservando la concentración del amortiguador Tris 50 mM pH 7.6 y así realizar la evaluación de la biodegradación por exposición a *B[a]P* (266 ng mL⁻¹) en un intervalo de 3 h. Después, las fracciones se analizaron por Extracción en Fase Sólida-Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución en búsqueda de los metabolitos comparándolas con

fracciones control que no fueron expuestas a *B[a]P* pero que proceden de un bioensayo de activación de 72 h.

5.3.7. Evaluación de biodegradación en fracciones obtenidas por Cromatografía de Exclusión Molecular de extractos crudos con Sephadex G-100

Las fracciones A y B de 8 mL cada una y sus subfracciones A1, A2, A3, A4, B1, B2, B3 y B4 de 2 mL cada una y A1a, A1b, A2a y A2b de 1 mL cada una, obtenidas por empleo del empaque G-100 se evaluaron por Cromatografía de Exclusión Molecular analítica. Además, estas fracciones sin diluir se emplearon para la evaluación de la biodegradación por exposición de 3 h a *B[a]P* (4 µg). Al término, las fracciones se analizaron por Extracción en Fase Sólida- Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución y se comparó la cantidad del metabolito presente en las fracciones y subfracciones con la cantidad presente en los controles, los cuales fueron fracciones obtenidas de bioensayos de activación sometidas a las condiciones de evaluación de biodegradación y que no se expusieron a *B[a]P*.

Se evaluó si el proceso de filtración (concentración) del extracto crudo extracelular proveniente de 12 cultivos de *S. capricornutum* activados con *B[a]P* por 72 h tenía algún efecto en la biodegradación. Para ello los extractos crudos extracelulares de los 12 cultivos se redujeron hasta tener 7.5 mL de la fracción >30 kDa. Por otra parte, se colectaron 7.5 mL de la fracción acumulada con componentes de 30 kDa – 1.5 kDa. De manera separada estas fracciones (7.5 mL cada una) y en conjunto (15 mL) se expusieron al *B[a]P* (266 mg mL⁻¹) por un intervalo de 3 h para realizar 3 ensayos independientes y comparar la biodegradación en las fracciones >30 kDa, 30 kDa -1.5 kDa por separado, y reunidas ambas fracciones. Al término de la evaluación de biodegradación se analizaron y cuantificaron los metabolitos de seguimiento por Extracción en Fase Sólida- Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución -Detección por Fluorescencia.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Metodología Analítica

6.1.1 Análisis cromatográfico de HAP

El análisis de las disoluciones estándar de *B[a]A* y *B[a]P* con el sistema 1 registrado en la tabla 5.2, proporcionó cromatogramas con señales en los tiempos de retención (t_r) de 4.2 y 9.29 min; respectivamente, para los HAP con una resolución (R_s) = 12.8 y un valor de α = 3.1. Con intención de contar con condiciones que permitieran el análisis de una mezcla de *B[a]A* y *B[a]P* con una mejor resolución se usaron las condiciones del sistema 2, también mostrado en la tabla 5.2. Este proporcionó los tiempos de retención de 9.21 (*B[a]A*) y 14.74 (*B[a]P*) con una R_s = 8.1 y una α = 1.6 El sistema 2 proporcionó una eficiencia de N = 34048 y 32313 y un factor de capacidad de k' = 4.12 y 7.19 para el *B[a]A* y el *B[a]P*; respectivamente. La figura 6.1. presenta un cromatograma que muestra la separación con el sistema 2.

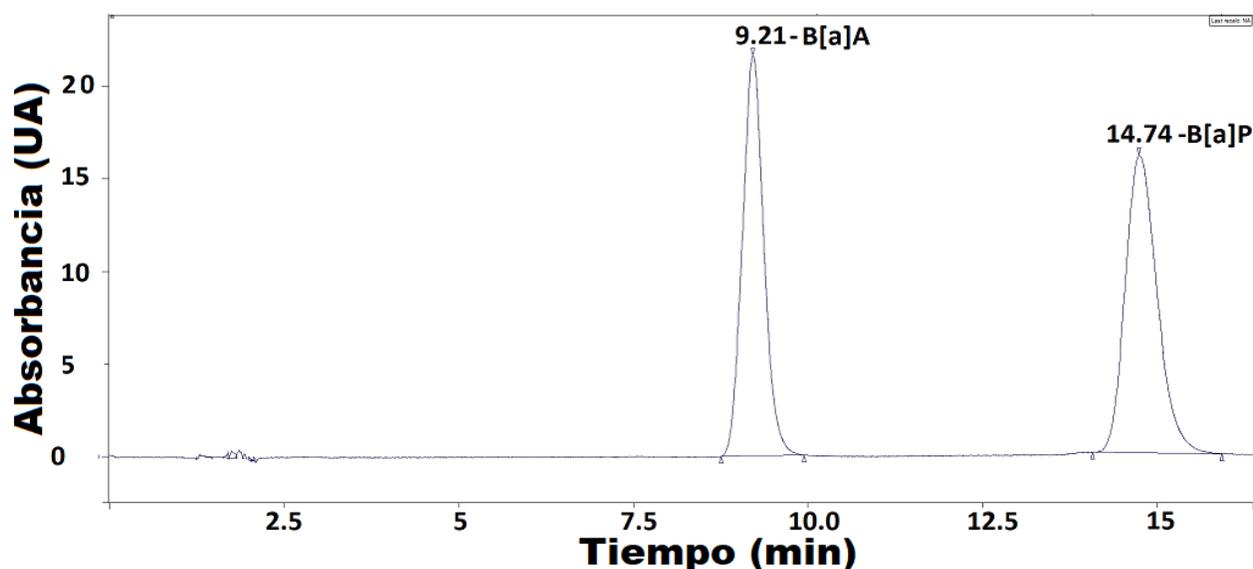


Figura 6.1. Cromatograma obtenido de la separación de *B[a]A* ($\lambda = 263$ nm) y *B[a]P* ($\lambda = 287$ nm) por cromatografía de líquidos de alta resolución. Disolución a $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ analizada en el equipo Varian 9065, con columna Hypersil ODS y detector ultravioleta.

6.1.2. Análisis cromatográfico de metabolitos

En la degradación de HAP por microalgas verdes en etapas tempranas se producen diferentes metabolitos tipo dihidrodiol. Así, de la degradación del *B[a]P* se obtiene, entre otros metabolitos, el 4,5- y 7,8- *dB[a]P* mientras que de *B[a]A* se produce 5,6-*dB[a]A*. Los estándares *cis*- y *trans*- de estos metabolitos del *B[a]P*

se usaron para comparar sus tiempos de retención con aquellos formados por las microalgas en cultivos expuestos al *B[a]P*. Después de determinar las condiciones óptimas de elución de los metabolitos del *B[a]P*, se evaluó la elución del metabolito 5,6-*cis*-*dB[a]A* usando estas mismas condiciones, metabolito que es producido en la degradación de *B[a]A* por las microalgas.

De las 5 columnas cromatográficas evaluadas para maximizar la *Rs* entre los metabolitos *cis*- y *trans*- del 4,5- y 7,8- *dB[a]P*, las cuales son las condiciones numeradas del 3 al 7 en tabla 5.2., se obtuvieron distintos resultados. El sistema 3 proporcionó los *tr* de 4.80, 4.58, 5.53 y 5.08 min para los metabolitos *cis* y *trans* del 4,5- y 7,8- *dB[a]P*; respectivamente. La *Rs* entre las parejas de los isómeros fue baja con valores de 0.62 y 0.83 para los metabolitos 4,5-*dB[a]P* y 7,8-*dB[a]P*; respectivamente, dificultando su resolución. El sistema 4 mostró los *tr* de 12.9, 12.6, 13.2 y 15.2 min para los metabolitos *cis* y *trans* del 4,5- y 7,8- *dB[a]P*; respectivamente. Este sistema no separó a los isómeros del 4,5 *dB[a]P*, pero sí resolvió los metabolitos *cis*- y *trans*- del 7,8- *dB[a]P*. El sistema 5 dio un *tr* promedio de 1.04 min para todos los metabolitos, siendo la menos conveniente. El sistema 6 presentó la mayor *Rs* entre el 4,5-*cis*-*dB[a]P* y el 7,8-*cis*-*dB[a]P*; los *tr* obtenidos bajo este sistema se muestran en la tabla 6.1 al igual que muestra los parámetros cromatográficos obtenidos con el sistema 6. En la figura 6.2. se muestran los cromatogramas obtenidos del análisis de los HAP con las diferentes condiciones cromatográficas de los sistemas: 3 (Fig. 6.2A), 4 (Fig. 6.2B), 5 (Fig 6.2C) y 6 (Fig 6.2D). Consecuentemente, el sistema 6 se aplicó en el análisis de bioensayos de exposición de *S. capricornutum*, con los cuales se corroboró la isomería de los metabolitos formados en la degradación de los HAP por la microalga.

Tabla 6.1. Parámetros cromatográficos determinados en el análisis de los metabolitos *cis*- y *trans*- 4,5- y 7,8- *dB[a]P* con el equipo Varían ProStar, la columna Envirosep PP y detector de fluorescencia con λ de excitación de 264 nm y λ de emisión de 390 nm.

Metabolito	tr	k'	N	Interacción	Rs	α
4,5 <i>cis</i>-<i>dB[a]P</i>	7.43	1.12	18365.0	4,5- <i>cis</i> - 4,5- <i>trans</i> - <i>dB[a]P</i>	0.45	1.09
4,5 <i>trans</i>-<i>dB[a]P</i>	7.79	1.23	23965.4	7,8- <i>cis</i> - 7,8- <i>trans</i> - <i>dB[a]P</i>	3.16	1.63
7,8 <i>cis</i>-<i>dB[a]P</i>	8.60	1.46	19499.8	4,5- <i>cis</i> - 7,8- <i>cis</i> - <i>dB[a]P</i>	1.38	1.30
7,8 <i>trans</i>-<i>dB[a]P</i>	11.80	2.37	30028.1	4,5- <i>trans</i> - 7,8- <i>trans</i> - <i>dB[a]P</i>	4.18	1.93

tr: tiempo de retención, k': factor de capacidad, N: eficiencia, Rs: Resolución, α : factor de selectividad

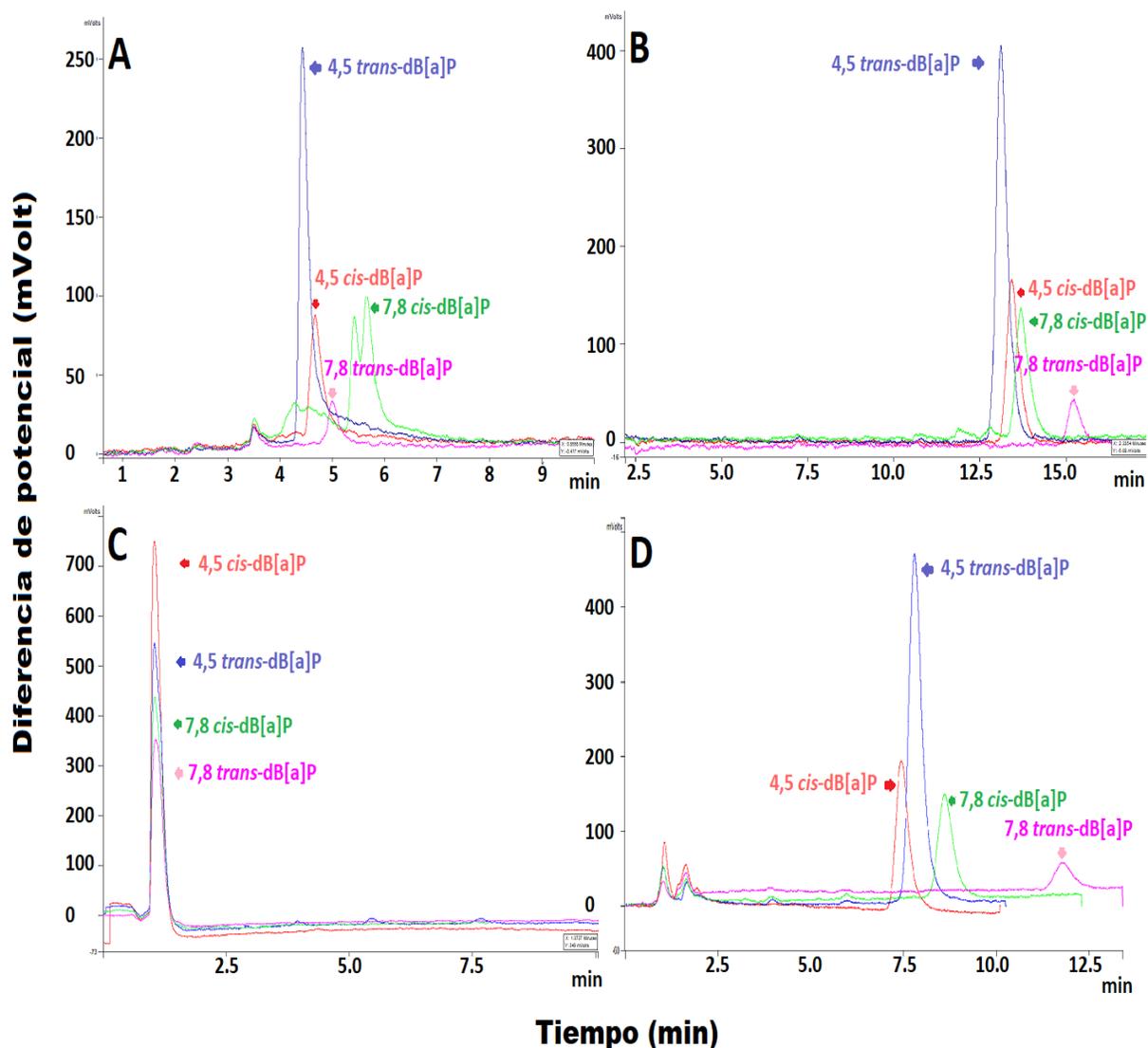


Figura 6.2. Cromatogramas obtenidos en la optimización de la separación de metabolitos *cis-* / *trans-* 4,5- y 7,8- dB[a]P a una concentración de 10 ng mL^{-1} usando el equipo Varían ProStar y los sistemas cromatográficos 3(A), 4(B), 5(C) y 6(D) con una λ de excitación de 264 nm y λ de emisión de 390 nm.

Por otra parte, debido a que en un principio los bioensayos de activación se pretendían realizar con la exposición simultánea a *B[a]A* y *B[a]P* y posterior evaluación de biodegradación en los extractos crudos, se evaluó el sistema 7 (Tabla 5.2), para mejorar la resolución de los metabolitos y posibles metabolitos desconocidos bajo este sistema, la longitud de la columna cromatográfica fue mayor y la polaridad de la fase móvil se varió, cambios realizados con respecto al sistema 6 los cuales generaron resolución idónea (> 1.5) de los principales metabolitos de interés (*4,5-cis-dB[a]P*, *7,8-cis-dB[a]P* y *5,6-cis-dB[a]P*), permitiendo su análisis simultáneo. La figura 6.3. muestra el cromatograma obtenido. Los tr fueron 16.16,

24.99 y 26.94 min, mientras la eficiencia de $N= 32038.68, 33127.54$ y 23345.80 para el 5,6-*cis*-dB[a]P, 4,5-*cis*-dB[a]P y 7,8-*cis*-dB[a]P; respectivamente. Finalmente, estas condiciones fueron utilizadas en diversas secciones del trabajo, aunque exponiendo individualmente las microalgas a cada HAP.

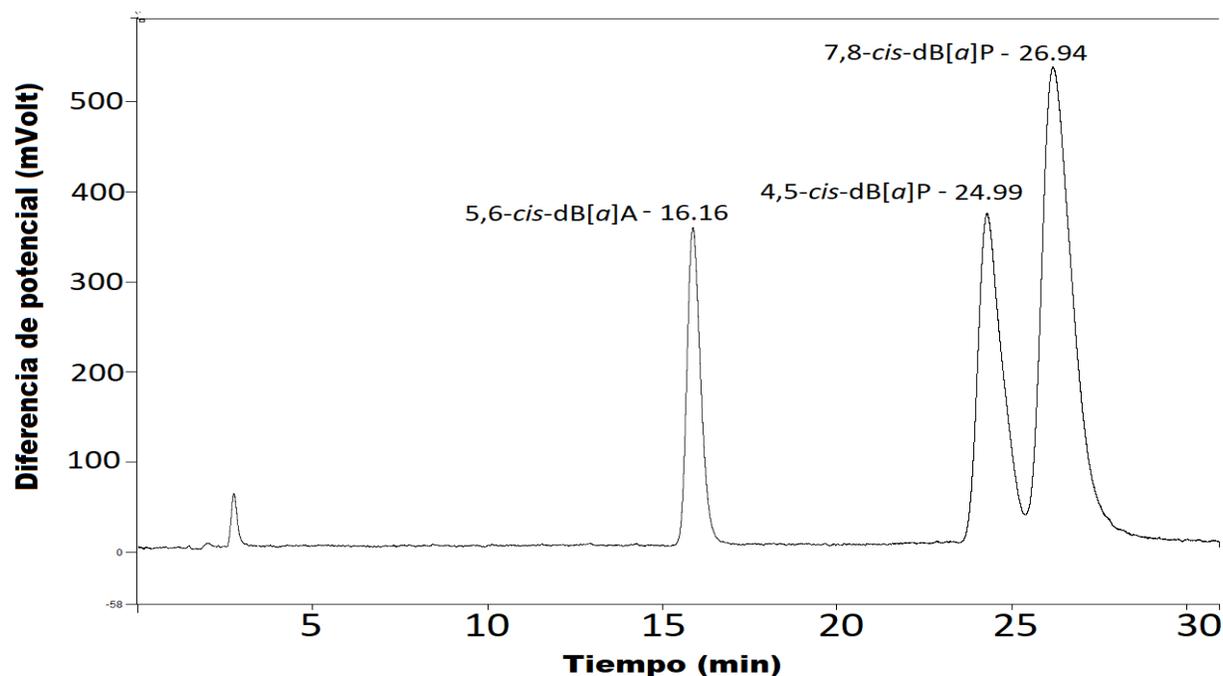


Figura 6.3. Optimización de la separación de los metabolitos de interés 5,6-*cis*-dB[a]P, 4,5-*cis*-dB[a]P y 7,8-*cis*-dB[a]P con el cromatógrafo Varían ProStar y la columna Microsorb-MV con una λ de excitación de 264 nm y λ de emisión de 390 nm.

6.1.3. Validación del método

Se observó un comportamiento lineal en el intervalo de trabajo de B[a]A en el método Extracción en Fase Sólida-Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución para el medio líquido y en el método Dispersión de Matriz en Fase Sólida-Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución para la biomasa, obteniendo el valor de $R^2 = 0.998$ en cada una de las matrices. La figura 6.4 en sus secciones A y B muestran las curvas de calibración construidas para el análisis del medio líquido y la biomasa; respectivamente. El LD y el LC para el B[a]A, presentados en la tabla 6.2, fueron apropiados para realizar el seguimiento de la biodegradación por medio de la cuantificación de los HAP, tanto en medio líquido como biomasa. Los resultados obtenidos se consideran precisos al contar con una desviación estándar relativa menor al 15%. Los porcentajes de recuperación para el B[a]A oscilaron del 93 al 96%.

El análisis del *B[a]P* mostró un intervalo lineal con un valor de R^2 cercano a la unidad para los métodos con ambas matrices. La Figura 6.4. en sus secciones A y B muestra las curvas de calibración construidas con los datos promedio ($n=3$) del medio líquido y biomasa; respectivamente.

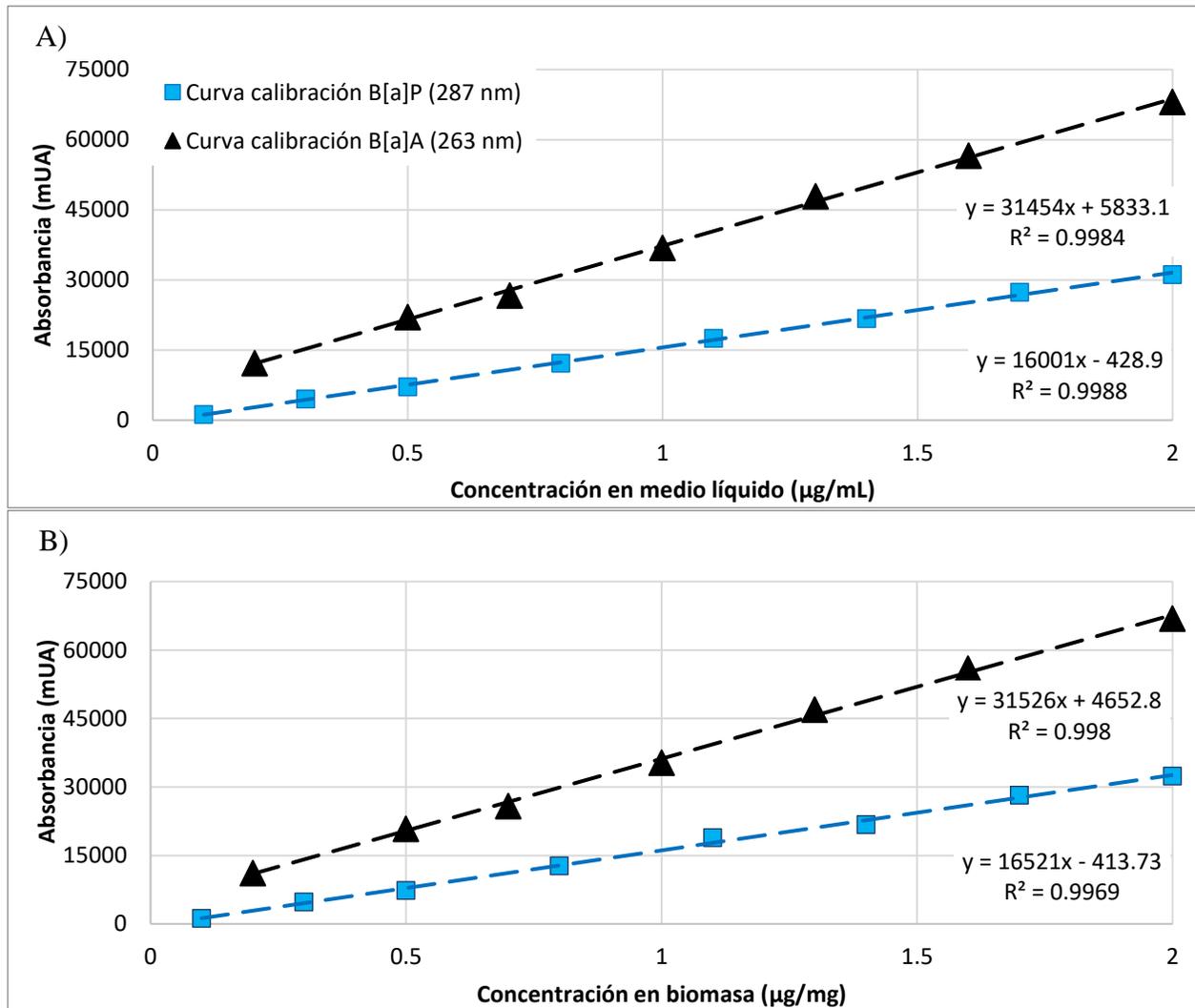


Figura 6.4. Curvas de calibración construidas con el cromatógrafo Varian 9065 Polychrom y la columna Hypersil ODS para la determinación y cuantificación de *B[a]A* (\blacktriangle , $\lambda = 263$ nm) y *B[a]P* (\blacksquare , $\lambda = 287$ nm) en A) medio líquido y B) biomasa usando extracción en fase sólida y dispersión de matriz en fase sólida como tratamiento de muestra; respectivamente.

Tabla 6.2. Resultados de la validación de los métodos (n=3) de cuantificación de B[a]A, B[a]P (detección por ultravioleta), 5,6-cis-dB[a]P, 4,5-cis-dB[a]P y 7,8-cis-dB[a]P (detección por fluorescencia), obtenidos por extracción en fase sólida (muestras líquidas) y dispersión de matriz en fase sólida (muestras sólidas) y analizados por cromatografía de líquidos de alta resolución.

Analito	% de recuperación*		RSD**		Linealidad (R^2)		LD		LC		Intervalo de trabajo	
	medio líquido	biomasa	medio líquido	biomasa	medio líquido	biomasa	medio líquido (ng mL ⁻¹)	biomasa (ng mg ⁻¹)	medio líquido (ng mL ⁻¹)	biomasa (ng mg ⁻¹)	medio líquido (ng mL ⁻¹)	biomasa (ng mg ⁻¹)
B[a]A	96	93	3.04	4.51	0.998	0.998	24.85*	20.59*	75.3*	64.4*	200-2000	200-200
B[a]P	81	103	2.8	1.1	0.998	0.996	21.3*	27.2*	67.8*	82.3*	100-2000	100-2000
5,6-cis-dB[a]P	90	92	3.82	2.12	0.997	0.997	0.36	0.49	1.11	1.49	0.125-5	0.125-5
4,5-cis-dB[a]P	90	86	0.7	0.7	0.999	0.999	0.6	0.6	1.7	1.9	2-30.	2-30
7,8-cis-dB[a]P	87	96	0.3	0.2	0.999	0.999	0.7	0.7	2	2.1	2.5-50	2.5-50

RSD: desviación estándar relativa, intervalo de confianza. LD: Límite de detección. LC: Límite de cuantificación. *Concentraciones de los extractos usados sometidos a mediciones individuales para calcular el % de recuperación: B[a]A= 0.5, 1.0 y 1.6 $\mu\text{g mL}^{-1}$, B[a]P= 0.5, 0.8 y 1.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 5,6-cis -dB[a]A= 0.25. 1.25 y 5 ng mL^{-1} , 4,5-cis-dB[a]P= 3, 5 ,10 y 15 ng mL^{-1} , 7,8-cis-dB[a]P= 2.5, 5, 10 y 20 ng mL^{-1} , **estas concentraciones fueron usadas para la determinación de RSD. *Determinación de LD y LC realizados con detección Ultravioleta

El LD y el LC para el análisis del B[a]P presentados en la tabla 6.2 fueron idóneos para realizar el seguimiento de su degradación tanto para muestras provenientes de medio líquido y de la biomasa. Los resultados del análisis del B[a]P fueron precisos al contar con una desviación estándar relativa < 15%. El porcentaje de recuperación para del B[a]P en medio líquido fue el menor en toda la validación (81 %), encontrándose dentro de los valores previamente publicados (Hernández Blanco y García de Llasera, 2016). El recobro para el B[a]P en biomasa fue cercano al 100%. (103 %). Estos resultados evidencian que los recobros son reproducibles, siendo útil este método en el seguimiento del B[a]P y así poder precisar su biodegradación y la presencia activa del sistema enzimático en los extractos.

6.1.3.1. Análisis de metabolitos de seguimiento

La validación del método para el análisis del metabolito 5,6-*cis*-dB[a]A mostró que el intervalo de trabajo por Extracción en Fase Sólida/ Dispersión de Matriz en Fase Sólida- Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución-Detección por Fluorescencia fue lineal con una $R^2=0.997$ para el medio líquido y la biomasa. La figura 6.5 en sus secciones A y B muestra la curva de calibración construida con los datos promedio ($n=3$) para el medio líquido y biomasa; respectivamente. El LD y el LC obtenidos para el 5,6-*cis*-dB[a]P, tabla 6.2, revelaron la mejor detección para del metabolito de seguimiento usado y junto con el porcentaje de recuperación se mostró que el método es adecuado para la evaluación de la biodegradación en los extractos analizados. Además, los resultados son precisos al proveer una desviación estándar relativa < 15%.

La validación del método para el análisis de 4,5-*cis*-dB[a]P presentó una linealidad muy buena, con un valor de $R^2 = 0.999$ para las muestras, independiente a su origen sólido o líquido. La figura 6.5 en sus secciones A) y B) muestra la curva de calibración construida con los datos promedio ($n=3$) para el medio líquido y biomasa; respectivamente. El análisis del LD y del LC, tabla 6.2, mostró un valor idóneo para realizar el seguimiento del 4,5-*cis*-dB[a]P durante la biodegradación del B[a]P en muestras obtenidas de los cultivos activados. La determinación del metabolito fue precisa contando con una desviación estándar relativa < 15%. El porcentaje de recuperación variando del 86% al 90% se encuentra dentro de los valores previamente publicados (Olmos-Espejel et al., 2012). Estos permitieron la determinación de la presencia del metabolito a causa del sistema enzimático presente en los extractos.

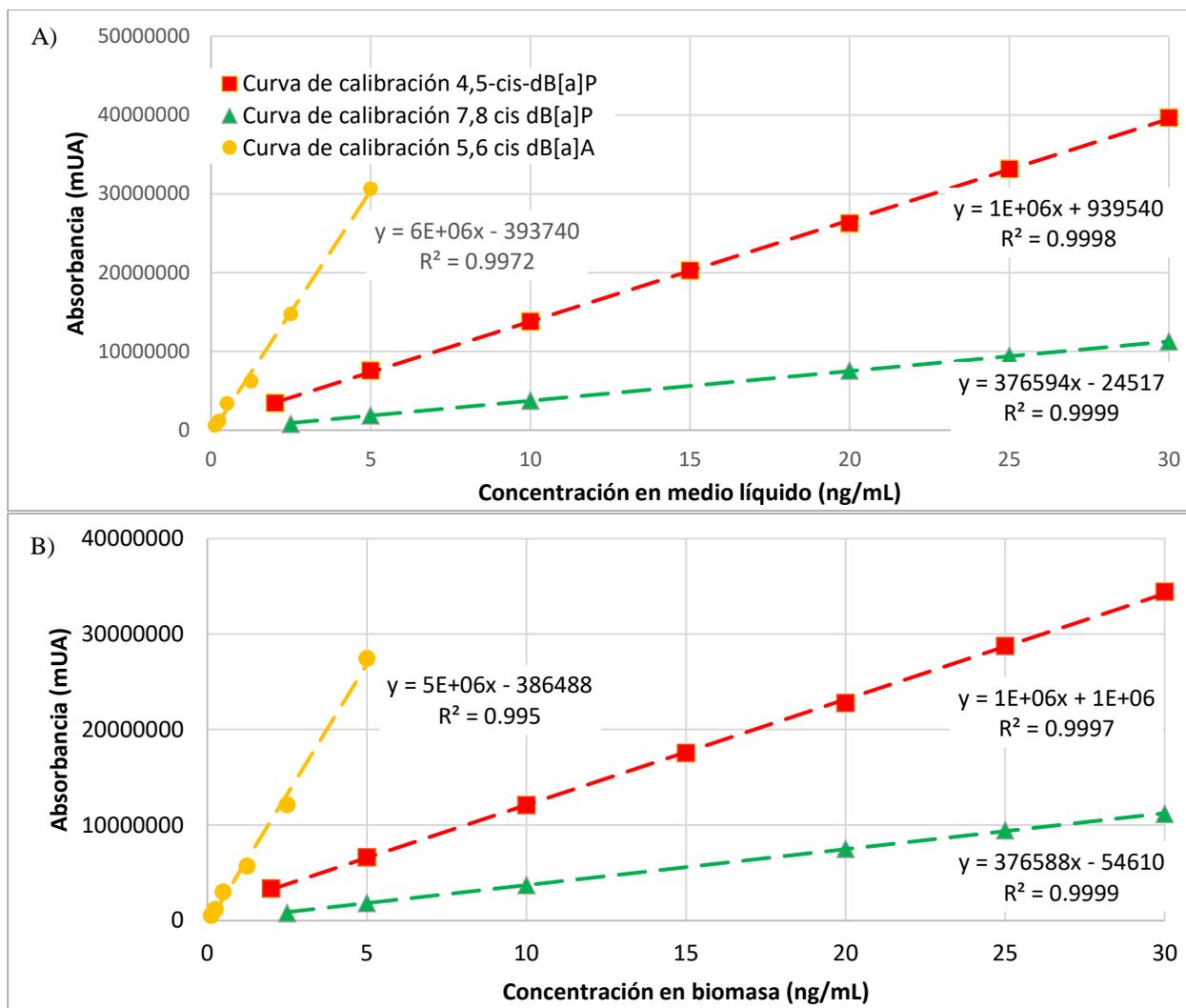


Figura 6.5. Curvas de calibración construidas con el cromatógrafo Varian ProStar y la columna Microsorb-MV (λ de excitación = 264 nm y λ de emisión = 390 nm) para la determinación y cuantificación de 5,6-cis-DB[a]A (●), 4,5-cis-DB[a]P (■) y 7,8-cis-DB[a]P (▲) en A) medio líquido y B) biomasa usando extracción en fase sólida y dispersión de matriz en fase sólida; respectivamente, como tratamiento de muestra.

El análisis del 7,8-cis-DB[a]P mostró que el intervalo usado es lineal con un valor de $R^2=0.999$ en ambos tipos de muestra, de origen líquido y sólido. La figura 6.5 en sus secciones A y B ilustra la curva de calibración construida con los datos promedio ($n=3$) para el medio líquido y biomasa. El LD y el LC para el 7,8-cis-DB[a]P fueron idóneos y junto con los porcentajes de recuperación mostrados en la tabla 6.2, permitieron el seguimiento del metabolito en los bioensayos de exposición realizados con las células microalgales. Los valores fueron precisos al tener una desviación estándar relativa $< 15\%$. En la evaluación de la biodegradación en los extractos enzimáticos, la baja estabilidad de este metabolito no permitió su análisis.

6.1.4. Evaluación de configuración geométrica

El sistema cromatográfico 6 se usó en la identificación de los metabolitos *cis*- y *trans*- 4,5- y 7,8- dB[a]P en biomasa y medio líquido provenientes de cultivos expuestos al B[a]P (266 ng mL⁻¹) durante 6 h de incubación. Se observó que los metabolitos formados por las microalgas contaron con una mejor coincidencia de tr y un aumento uniforme de los picos cromatográficos con las adiciones de los estándares *cis*. La figura 6.6 presenta los cromatogramas de los extractos de medio líquido y biomasa con y sin adición de la disolución estándar de metabolito. Las secciones “A” a “D” muestran las fortificaciones a la biomasa, mientras que las secciones “E” a “H” las fortificaciones realizadas al medio líquido con los estándares *cis*- y *trans*- del 4,5- y 7,8- dB[a]P. Esta prueba descartó contundentemente la presencia del 7,8-*trans*-dB[a]P. Los cromatogramas mostrados evidencian la presencia de un hombro o deformación (señalado con un asterisco) seguida al pico identificado como 4,5-*cis*-dB[a]P. Este pico no se identificó como alguno de los metabolitos de seguimiento, de acuerdo con lo publicado en la literatura se asumió como la señal del 11,12-*cis*-dB[a]P (Lindquist et al., 1985; García de Llasera et al., 2016).

La sección 6.6.A y 6.6.E de la figura 6.6 muestran los cromatogramas con la adición del estándar 4,5-*cis*-dB[a]P en el extracto de metabolitos obtenido de biomasa y medio líquido por Extracción en Fase Sólida y Dispersión de Matriz en Fase Sólida; respectivamente. Esta adición mostró un crecimiento homogéneo en el pico asociado al metabolito 4,5-*cis*-dB[a]P. De nueva cuenta este resultado demuestra la presencia de dicho metabolito en etapas tempranas del proceso de degradación, lo que también supone la presencia de sistemas enzimáticos mediados por *di*-oxigenasas, los cuales se han observado en bacterias y son responsables de la formación de este tipo de metabolitos *cis* (Warshawsky, 1985). Posteriormente la adición del estándar 4,5-*trans*-dB[a]P evaluada en las secciones B y F mostró un crecimiento asimétrico del pico adyacente al previamente identificado en el extracto de metabolitos del medio líquido, lo que no descartó la presencia de este metabolito, pero tampoco lo identificó contundentemente, probablemente eluyendo en conjunto con el 11,12-*cis*-dB[a]P. El metabolito 7,8-*cis*-dB[a]P también fue identificado por la adición estándar en las secciones C y G. Esta evaluación generó un incremento homogéneo en el pico cromatográfico de interés en el extracto de biomasa y en el medio líquido determinando la presencia de este metabolito en la etapa temprana de la biodegradación. La presencia del 7,8-*cis*-dB[a]P de nuevo indicó la presencia de *di*-oxigenasas en la biodegradación de HAP de alto peso molecular. Finalmente, la adición estándar 7,8-*trans*-dB[a]P evaluada en las secciones D y H generó un pico cromatográfico adicional en el cromatograma del extracto expuesto, descartando la presencia del metabolito *trans* en el cultivo.

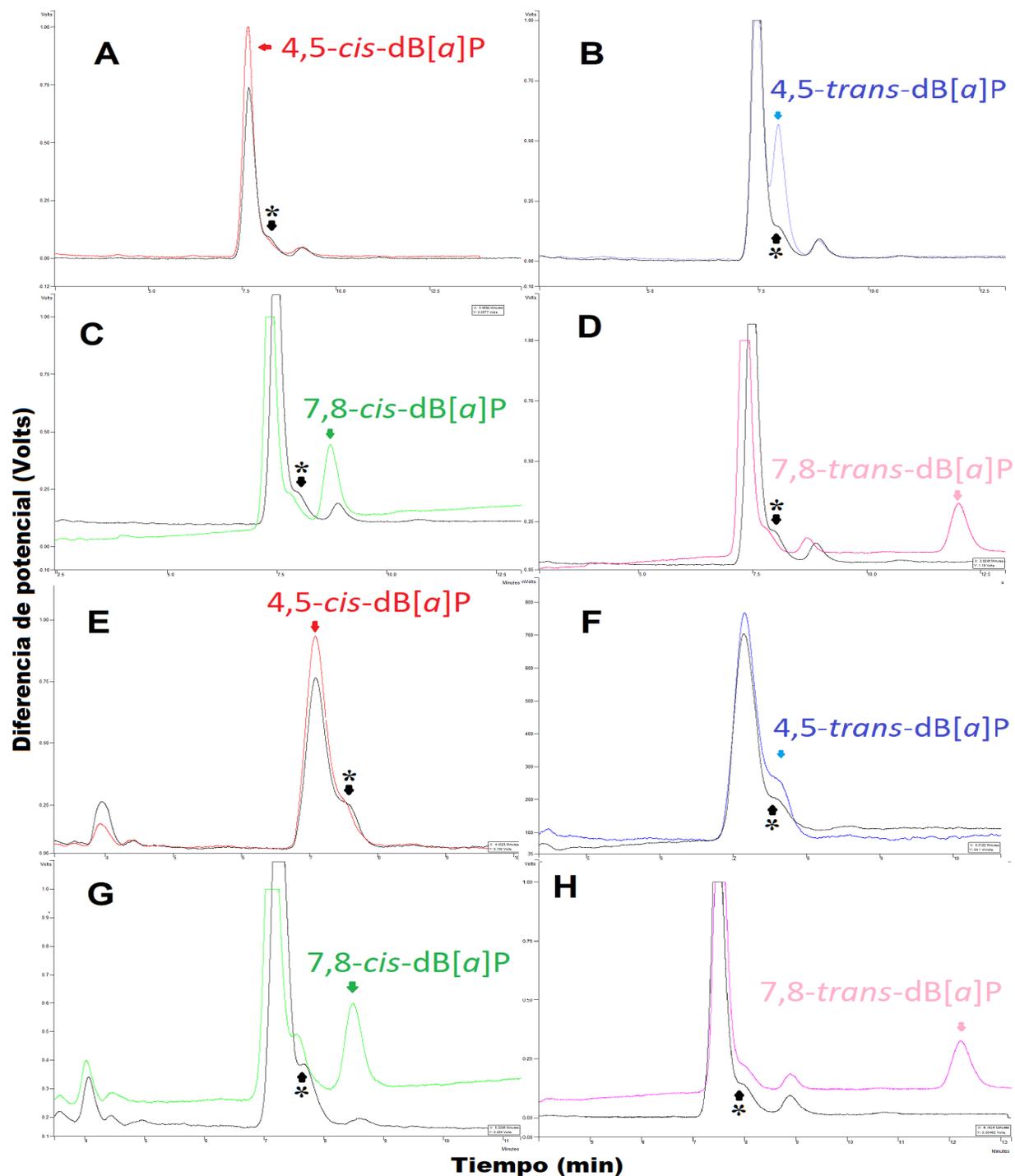


Figura 6.6. Evaluación de la configuración geométrica de los metabolitos de seguimiento con equipo Varian ProStar en extractos diluidos (1:1) de: biomasa obtenidos por dispersión de matriz en fase sólida (secciones “A” a “D”) y de medio líquido obtenidos por extracción en fase sólida (secciones “E” a “H”). Los extractos se adicionaron con 25 μg de 4,5-*cis*-dB[a]P (A y E), 10 μg de 4,5-*trans*-dB[a]P (B y F), 20 μg de 7,8-*cis*-dB[a]P (C y G), y 20 μg de 7,8-*trans*-dB[a]P (D y H). * 11,12-*cis*-dB[a]P de acuerdo con lo publicado por García de Llasera et al. (2016).

6.1.5. Lisis celular

Con el fin de obtener un extracto crudo intracelular con la enzima degradadora de los HAP activa, se aplicó ultrasonido de manera localizada sobre la biomasa proveniente de cultivos expuestos a los HAP. Las ondas ultrasónicas proporcionaron un extracto de coloración verde translúcido. Posteriormente, se cuantificó la clorofila en el extracto crudo intracelular por mediciones espectrofotométricas que se asociaron al grado de la ruptura celular en la optimización de la extracción asistida por ultrasonido. El material liberado también contuvo material proteico de interés cuantificable por el método de Lowry. Las condiciones de operación fueron previamente optimizadas con el empleo de amortiguador Tris 50 mM pH 7.6 como medio de lisis (Fuentes-Pérez, 2019).

Por otra parte, se evaluó la obtención de mayor cantidad de proteína en el extracto crudo intracelular usando biomasa proveniente de mayor número de cultivos activados solo por exposición al *B[a]P* (1, 2 y 4 cultivos de 15 mL c/u) sometidos a ultrasonido por pulsos automatizados de 10 seg y pausas de 5 seg para por ciclos exponerlos por un total de 5 min a 40% de amplitud (20 MHz). En la optimización de este proceso se emplearon cultivos de *Scenedesmus acutus*, favorecido por la tasa de crecimiento de la microalga. Los resultados de esta evaluación se encuentran en la figura 6.7.

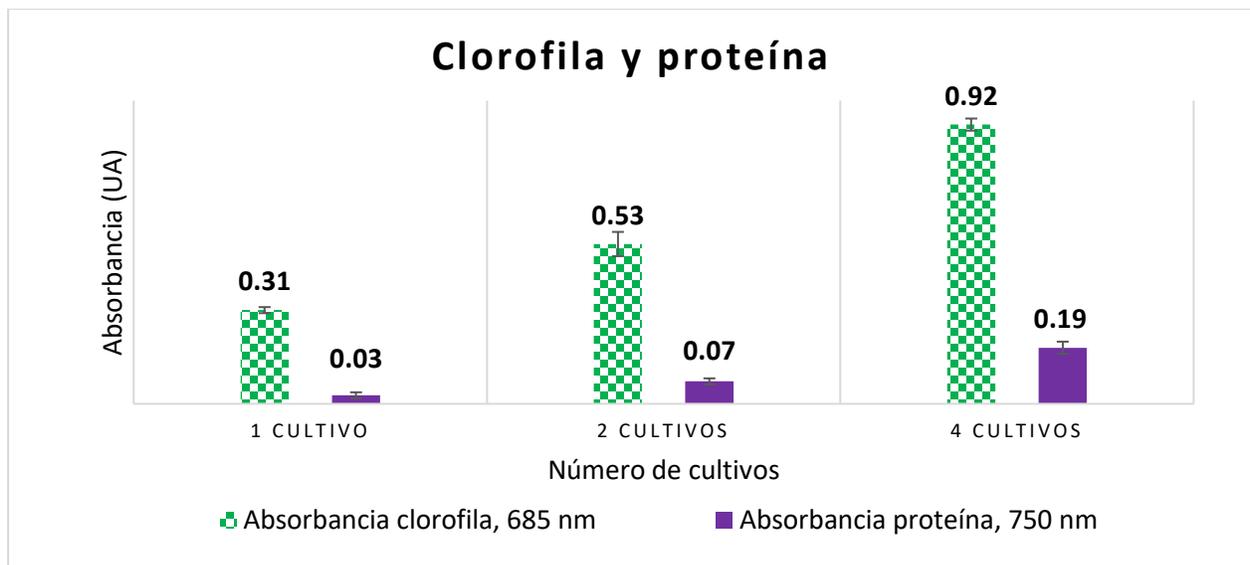


Figura 6.7. Absorbancia en lisados obtenidos con 1, 2 y 4 cultivos de activación asociada a la presencia de clorofila y proteína. Como medio de lisis se usó amortiguador Tris 50 mM pH 7.6 y se expuso a pulsos automatizados de ultrasonido de 10 seg seguidos de 5 seg de pausa para una exposición total de 5 min.

El proceso de lisis con mayor número de cultivos confirmó que el medio compuesto únicamente por amortiguador Tris permite la liberación de clorofila proporcional a la observada por Fuentes-Pérez (2019), por lo que además de mantener la eficiencia del proceso el empleo del amortiguador Tris sin aditivos simplificó el proceso de obtención del extracto crudo intracelular al evitar procesos adicionales. Además, al usar muestra de 4 cultivos se observó el mayor valor de absorbancia (0.19 UA) que se asoció a 1.12 ± 0.09 mg de proteína total.

La cantidad del material proteico total en el extracto crudo intracelular y en el extracto crudo extracelular provenientes de los cultivos activados por exposición al *B[a]P* de las dos especies de microalgas por un periodo de 48 y 72 horas a 34 °C se muestra en la figura 6.8. junto con la proteína determinada en los controles provenientes de cultivos no activados.

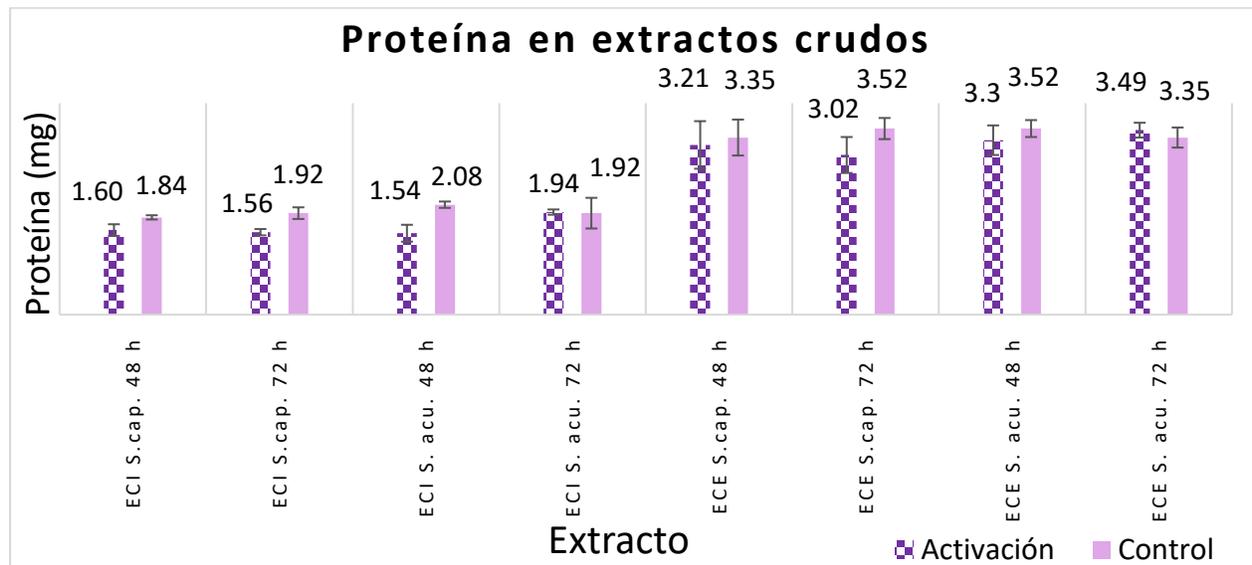


Figura 6.8. Proteína total cuantificada en los extractos crudos obtenidos de *S. capricornutum* (*S. cap.*), y *S. acutus* (*S. acu.*), expuestas y no a *B[a]P* por 48 y 72 h a 34°C. ECl: Extracto crudo intracelular, ECE: Extracto crudo extracelular.

Los resultados mostraron que en el extracto crudo extracelular se obtuvo una mayor cantidad de proteína, aproximadamente el doble en comparación con el extracto crudo intracelular, esto debido en mayor parte por la presencia del nutriente remanente proteosa-peptona de los cultivos. Esta observación fue independiente al proceso de activación, pues en extracto crudo extracelular provenientes de los cultivos que no fueron expuestos a HAP también se observó una mayor cantidad de proteína total cuantificada. De

la misma manera, en la mayoría de los casos se observó mayor cantidad de proteína promedio en los controles que, en este caso puede asociarse a la exposición al HAP, donde el material proteico presente disminuye por muerte celular. La prueba de hipótesis con un intervalo de confianza de 95% y un nivel de significancia de 0.05 con la que se comparó la cantidad de proteína obtenida de los extractos crudos de los cultivos de activación frente a sus respectivos cultivos control demostró que no existe diferencia significativa entre la cantidad de proteína de cada muestra y su control independientemente de la microalga que se empleó en los intervalos de 48 y 72 h, ejemplo de los datos obtenidos al realizar estas pruebas estadísticas se encuentran en el material anexo de esta tesis (A.3.). Sin embargo, al considerar la cantidad de proteína total de los extractos crudos intracelulares y extractos crudos extracelulares por intervalo y especie se observó que los cultivos de *Scenedesmus acutus* a las 72 h de exposición a *B[a]P* produjeron una cantidad de proteína significativamente diferente.

Esta técnica cumplió su objetivo de evidenciar la presencia de material proteico para posteriormente contener los componentes enzimáticos en un extracto y evaluar la biodegradación de HAP en estos además de determinar las condiciones de obtención de estos. Adicionalmente, en el análisis microscópico de las microalgas realizado después del proceso de lisis se observó la conservación de la forma celular con espacios vacíos dentro de ellas posiblemente formados por burbujas de aire ocupando el espacio intracelular del material expulsado. La figura 6.9. muestra los efectos del ultrasonido en la microalga *Scenedesmus acutus* evidenciando células completas y otras más vacías empleando un 30 % de amplitud y pulsos de 10 segundos en presencia de baño de hielo para evitar el sobrecalentamiento de la muestra.

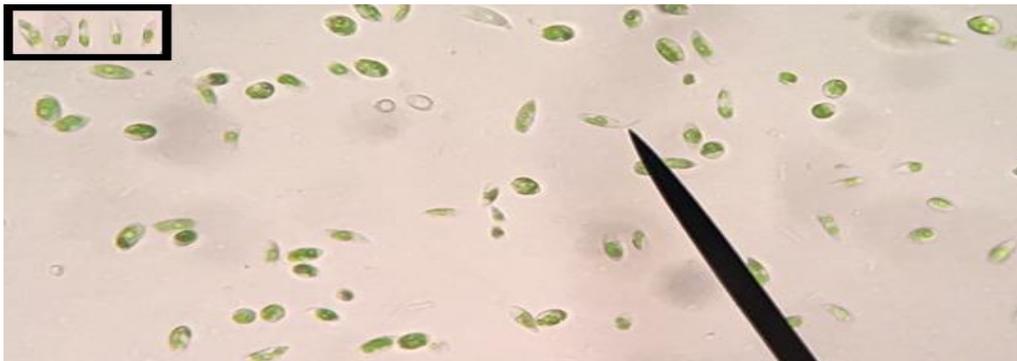


Figura 6.9. *Scenedesmus acutus* expuesta a ultrasonido por pulsos automatizados de 10 seg y pausas de 5 seg para una exposición total de 5 min (30 % de amplitud). El señalador marca una célula conservando su estructura con burbujas de aire dentro de ella. El recuadro muestra más ejemplos de esta observación.

6.1.6. Análisis de extractos crudos por cromatografía de exclusión molecular, calibración.

El análisis de los extractos crudos, las fracciones y subfracciones provenientes cultivos de *S. capricornutum* activados por exposición a *B[a]P* empleando la instrumentación en tabla 5.1., sección 5 y las columnas cromatográficas Sephax SRT SEC-300 (5 a 1250 kDa) y Agilent Bio SEC-5 (0.5 a 150 kDa), se realizó con una curva de calibración con los compuestos estándares de PM conocido que se presentan en la tabla 6.3, junto con los cromatogramas correspondientes en la Figura 6.10. La construcción de la curva de calibración para la columna Sephax SRT SEC-300 prescindió del uracilo, mientras que la columna Agilent Bio SEC-5 del uracilo y tiroglobulina. Esta discriminación se debió a que los tamaños de estos estándares quedan fuera del intervalo de trabajo de las columnas. Ejemplo del cromatograma de elución de los estándares y las curvas de calibración se presentan en la figura 6.10. A estas curvas obtenidas al inicio de la experimentación se les identificará como primarias y se emplearon en la determinación de diferencias en el perfil molecular de los extractos crudos concentrados por comparación con cultivos sin activación.

Tabla 6.3. Calibración primaria usada en cromatografía de exclusión molecular analítica utilizando estándares de peso molecular conocido y las columnas SRT SEC 300 y Agilent Bio SEC-5.

COLUMNA	SRT SEC 300					Agilent Bio SEC-5				
	Proteína	X (tr)	σ	C. V.	kDa	log kDa	X (tr)	σ	C. V.	kDa
Tiroglobulina	7.18	0.01	0.18	669.00	2.83	6.06	0.00	0.07	669.00	2.83
Amilasa	8.84	0.01	0.09	200.00	2.30	6.60	0.02	0.28	200.00	2.30
Albumina	9.95	0.01	0.09	66.00	1.82	7.54	0.01	0.07	66.00	1.82
Anhidrasa	11.10	0.02	0.16	29.00	1.46	8.79	0.01	0.07	29.00	1.46
Aprotinina	11.75	0.01	0.10	6.51	0.81	9.79	0.10	1.05	6.51	0.81
Uracilo	13.76	0.02	0.18	0.12	-0.92	13.38	0.27	1.99	0.12	-0.92

X(tr): promedio de tiempos de retención (n=3), σ : desviación estándar, C.V.: Coeficiente de variación, kDa: tamaño molecular en Dalton

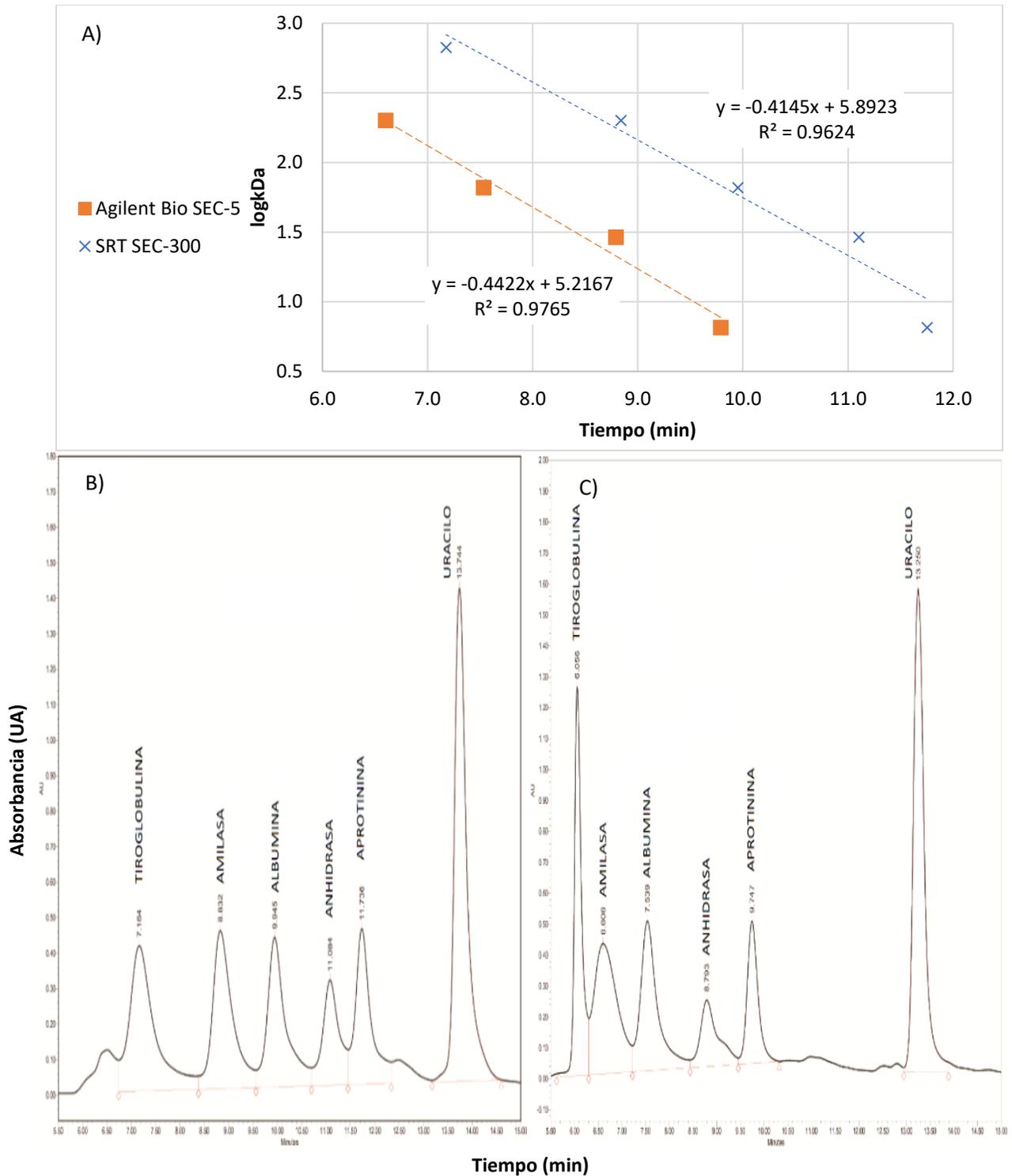


Figura 6.10. A) Curvas de calibración primaria usadas en cromatografía de exclusión molecular y los cromatogramas obtenidos con B) la columna Sephax SRT SEC-300 y C) la columna Agilent Bio SEC-5 (B) y el uso del equipo Waters 1525 con λ variable de 205 a 280 nm.

Posteriormente, avanzada la experimentación para corroborar los tiempos de retención se obtuvieron

otras curvas y ecuaciones que se identificaron como secundarias (Sephax SRT SEC-300: $y = -0.4457x + 5.8994$; Agilent Bio SEC-5: $y = -0.406x + 4.9261$), con las cuáles se extrapolaron los PM de las fracciones y fueron construidas previamente a la realización del estudio, la figura 6.11 muestra estas curvas de calibración.

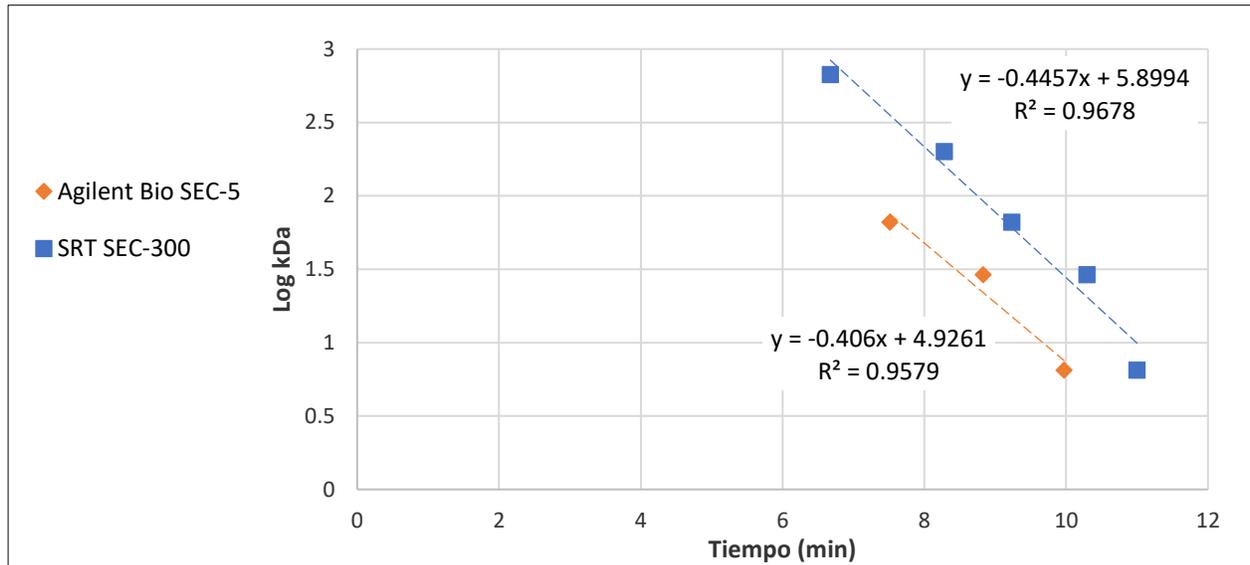


Figura 6.11. Curvas de calibración secundarias usadas en el análisis de las subfracciones con el cromatógrafo Waters 1525 (λ variable de 205 a 280 nm) y las columnas Sepax SRT SEC-300 y Agilent Bio SEC-5.

6.2. Bioensayos

6.2.1. Crecimiento de cultivos de *Scenedesmus acutus* y *Selenastrum capricornutum*

La velocidad de crecimiento y de deterioro de los cultivos sólidos usados conllevaron a su renovación por resiembra cada tres semanas. El seguimiento del crecimiento de las microalgas en los cultivos líquidos de 200 mL de medio Bristol permitió establecer los días necesarios para contar con el número de células de 5×10^6 células mL^{-1} , con medida de absorbancia = 1. Con las mediciones espectrofotométricas en diferentes días se construyeron las curvas de crecimiento de las dos especies de microalgas, teniendo el medio de *S. capricornutum* dos diferentes porcentajes de proteosa-peptona, las cuales son mostradas en la figura 6.12.

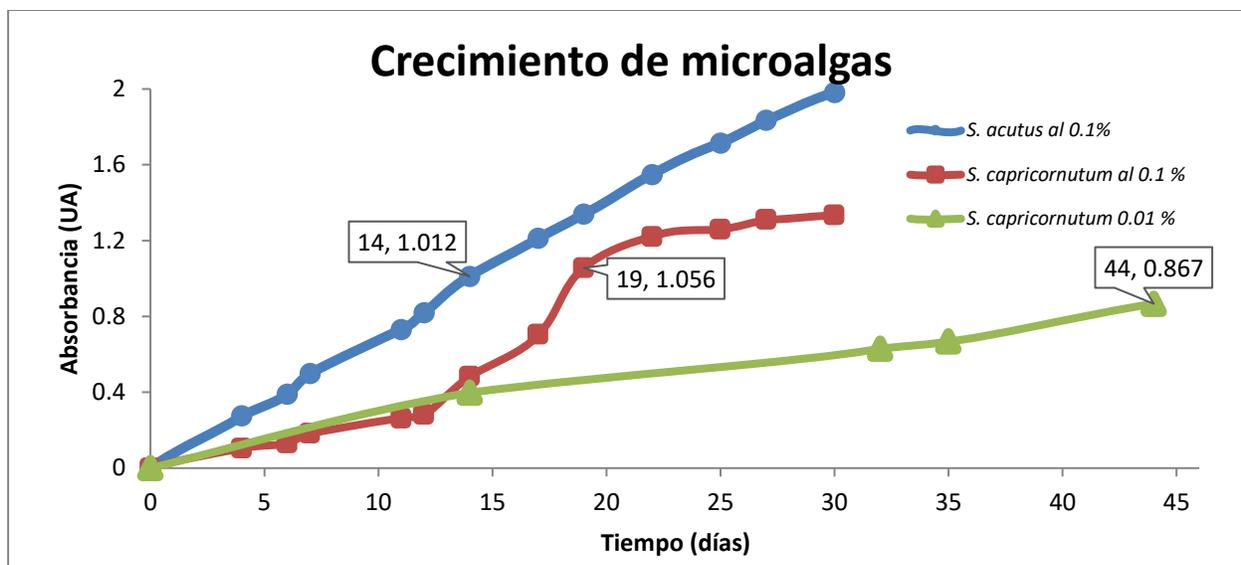


Figura 6.12. Curvas de crecimiento de *Scenedesmus acutus* y de *Selenastrum capricornutum* en 200 mL de medio Bristol más peptona proteosa al 0.1% m/v y *S. capricornutum* más peptona proteosa al 0.01% m/v. En los recuadros se muestran los días necesarios para rondar una Absorbancia = 1 medida a 685 nm.

El seguimiento del crecimiento de las microalgas en los cultivos se realizó durante 30 días en los medios adicionados con peptona-proteosa al 0.1%. La absorbancia para obtener el número de células usado en los bioensayos de exposición ($A=1$) se alcanzó a los 15 y 20 días de realizada la inoculación con *S. acutus* y *S. capricornutum*; respectivamente. *S. acutus* mostró una curva de crecimiento lineal, mientras *S. capricornutum* presentó el crecimiento exponencial a partir del día 12, estabilizándose a partir del día 21. En los cultivos usados se buscó contar con células jóvenes, las cuales tienen un metabolismo acelerado y así potenciar el proceso de degradación de los HAP. Por esta razón se manejaron cultivos en pleno crecimiento con $A=1$. El crecimiento de *S. capricornutum* en presencia reducida de peptona proteosa (0.01%) se descartó al requerir más de 44 días para alcanzar el crecimiento adecuado. La intención de realizar el crecimiento bajo estas condiciones era la de contar con extractos crudos con menor remanente del nutriente proteosa-peptona al evaluar el perfil proteico y así evitar interferencias en su análisis.

6.2.2. Bioensayos con cultivos de células

Como se ha mencionado, la corroboración del comportamiento de degradación de B[a]P por *S. capricornutum* se realizó por bioensayos con el seguimiento en el tiempo de las cantidades de B[a]P y sus metabolitos para la corroboración de la degradación de B[a]P. Los análisis de B[a]P y metabolito se realizaron en los componentes del cultivo por separado, tanto en medio líquido como en biomasa. Los resultados se muestran en la tabla 6.4.

Tabla 6.4. Corroboración de biodegradación en medio líquido y biomasa de *Selenastrum capricornutum* por bioensayos de exposición de tiempo variable y cuantificación de B[a]P (μg) y sus metabolitos (ng).

Tiempo (h)	4,5 cis dB[a]P (ng)		7,8 cis dB[a]P (ng)		B[a]P (μg)		B[a]P total (μg)	% B[a]P Removido	% Degradación
	medio líquido	biomasa	medio líquido	biomasa	medio líquido	biomasa			
1.5	39 \pm	44 \pm	NC	28 \pm	1.26 \pm	1.98 \pm	3.24 \pm	69	19
	1.77	1.53		1.23	0.05	0.031	0.059		
3	57 \pm	57 \pm	24 \pm	39 \pm	0.57	1.35 \pm	1.92 \pm	86	52
	2.04	1.26	0.93	1.44	\pm 0.021	0.096	0.098		
6	159 \pm	75 \pm 2.4	45 \pm	30 \pm	0.54 \pm	0.30 \pm	0.84 \pm	87	79
	4		1.83	1.14	0.004	0.006	0.007		
48	60 \pm	13 \pm	NC	NC	0.29 \pm	0.11 \pm	0.39 \pm	93	90
	1.92	0.35			0.004	0.002	0.004		
72	11 \pm	ND	ND	ND	0.12 \pm	ND	0.12 \pm	97	97
	0.37				0.003		0.003		

NC: no cuantificado. ND: no detectado. B[a]P: 266 ng mL⁻¹. 28 °C temperatura de incubación.

La degradación del B[a]P por *S. capricornutum* alcanzó su máximo nivel a las 72 h de incubación, siendo evidente desde las primeras horas la disminución en su concentración. A las 6 h se encontró el mayor nivel de producción de los metabolitos 4,5-cis-dB[a]P y 7,8-cis-dB[a]P, excepto por este último en la biomasa con una máxima producción a las 3 h de comenzada la exposición. Los bioensayos de exposición con células de 48 y 72 h a 34 °C se usaron para el proceso de activación celular y posteriores ensayos de exposición con los extractos enzimáticos. Estos resultados se tomaron en cuenta para los intervalos de tiempo de exposición usados en la evaluación de la degradación de B[a]A y B[a]P por extractos enzimáticos de *S. capricornutum* y *S. acutus* (descritos en las secciones 6.2.4 a 6.2.6.). En estos tiempos de exposición de los ensayos de activación las cantidades B[a]P y sus metabolitos se redujeron alcanzando niveles por debajo del LC e inclusive por debajo del LD, lo que se aprovechó para distinguir la producción de metabolito de este control y de los extractos crudos. El porcentaje de B[a]P removido y el porcentaje de degradación

se calculó con las ecuaciones 5 y 6; respectivamente (Fuentes-Pérez, 2019).

$$\text{Ecuación 5. \% Removido} = \frac{B[a]P \text{ adicionado} - B[a]P \text{ en ML}}{B[a]P \text{ adicionado}} \times 100\%$$

$$\text{Ecuación 6. \% Degradación} = \frac{B[a]P \text{ adicionado} - (B[a]P \text{ en ML} + B[a]P \text{ en Bm})}{B[a]P \text{ adicionado}} \times 100\%$$

6.2.3. Ensayos preliminares de evaluación de la biodegradación con extractos crudos

Los ensayos preliminares de evaluación de degradación con extractos crudos de *S. capricornutum* se realizaron a temperatura ambiente durante 3 h con adición de B[a]P, 266 µg L⁻¹. Con los extractos crudos extracelulares y los extractos crudos intracelulares de *S. capricornutum* y de los controles usados en la evaluación de la degradación. Se cuantificaron el 4,5-*cis*-dB[a]P y 7,8-*cis*-dB[a]P, estos resultados se muestran en la figura 6.13.

En los ensayos de exposición con los extractos enzimáticos se cuantificó metabolito en cantidades mayores al control, por lo que se pudo corroborar que, en el extracto crudo intracelular y el extracto crudo extracelular, sí se efectúa biodegradación, y por consiguiente el sistema enzimático responsable está presente y activo. Además, se observó que en el extracto crudo extracelular la biodegradación se efectuó formando una mayor cantidad de metabolito que en el extracto crudo intracelular. Estos resultados se compararon con los de un control abiótico, medio Bristol sin microalgas incubado con B[a]P durante 72 h, en el cual se observó el 98.5% del B[a]P adicionado, demostrando que la degradación abiótica es menos efectiva que la degradación biótica. Finalmente, el control no activado, es decir extractos crudos obtenidos de cultivos no expuestos a B[a]P, corroboró la necesidad de la activación de las células frente al contaminante para estimular el proceso de biodegradación ya que no se detectaron metabolitos y permanecieron 3.63 µg de los 4 µg del B[a]P adicionado. La cantidad remanente cuantificada del B[a]P y sus metabolitos en la biomasa y el medio líquido procedente de los cultivos activados que fungieron como controles, fue mínima permitiendo corroborar y diferenciar la producción de metabolitos de degradación generada en los extractos crudos.

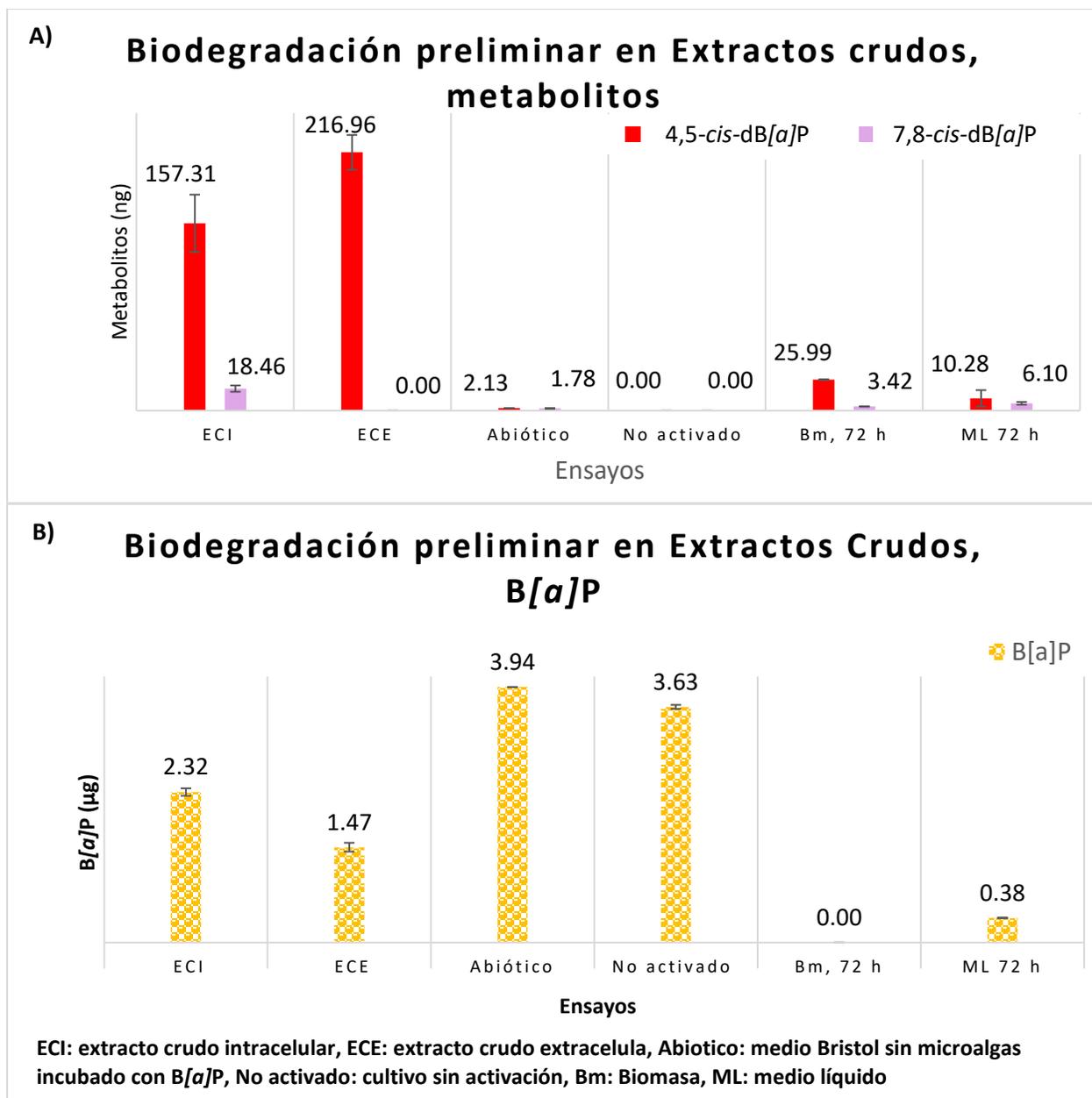


Figura 6.13. Evaluación preliminar de la biodegradación presente en extractos crudos (3 h frente B[a]P). Cuantificación de la producción y remanente de A) 4,5-cis-dB[a]P y 7,8-cis-dB[a]P y B) B[a]P. Extractos obtenidos por activación de 72 h con B[a]P (266 ng mL⁻¹).

6.2.3.1 Comparación de la evaluación de la degradación en extractos crudos y en cultivos con células

En el siguiente paso de la investigación se compararon las cantidades de 4,5-cis-dB[a]P formados en los bioensayos de exposición con células y de evaluación de la degradación en extractos crudos de *S. capricornutum*. Para ello, se tomó en cuenta la exposición al B[a]P realizada en los cultivos con células

microalgales durante 3 h a 34 °C frente a la realizada por 3 h a 34°C en los extractos crudos enzimáticos *intracelulares*, los cuales provinieron de cultivos activados con *B[a]P* a 72 h y 34 °C. Las cantidades determinadas del metabolito 4,5-*cis*-dB[a]P revelaron una producción semejante por las células completas ante una segunda exposición al *B[a]P* en medio Bristol (186.36 ± 37.86 ng) como por el extracto crudo intracelular (201.10 ± 10.68 ng). En esta evaluación el medio líquido solo y el medio líquido más extracto crudo intracelular, ambas muestras procedentes de cultivos activados por *B[a]P* (72 h), mostraron mayor presencia del 4,5-*cis*-dB[a]P al realizar un bioensayo de exposición al *B[a]P* (3 h) en comparación a un proceso de activación de 3 h. El resultado de este ensayo se explica al contener en el medio líquido y en el extracto crudo intracelular el sistema enzimático activado y disponible para continuar el proceso de degradación ante la nueva adición de *B[a]P* además del remanente del 4,5-*cis*-dB[a]P a causa del proceso de activación. El resultado de esta evaluación se observa en la figura 6.14.

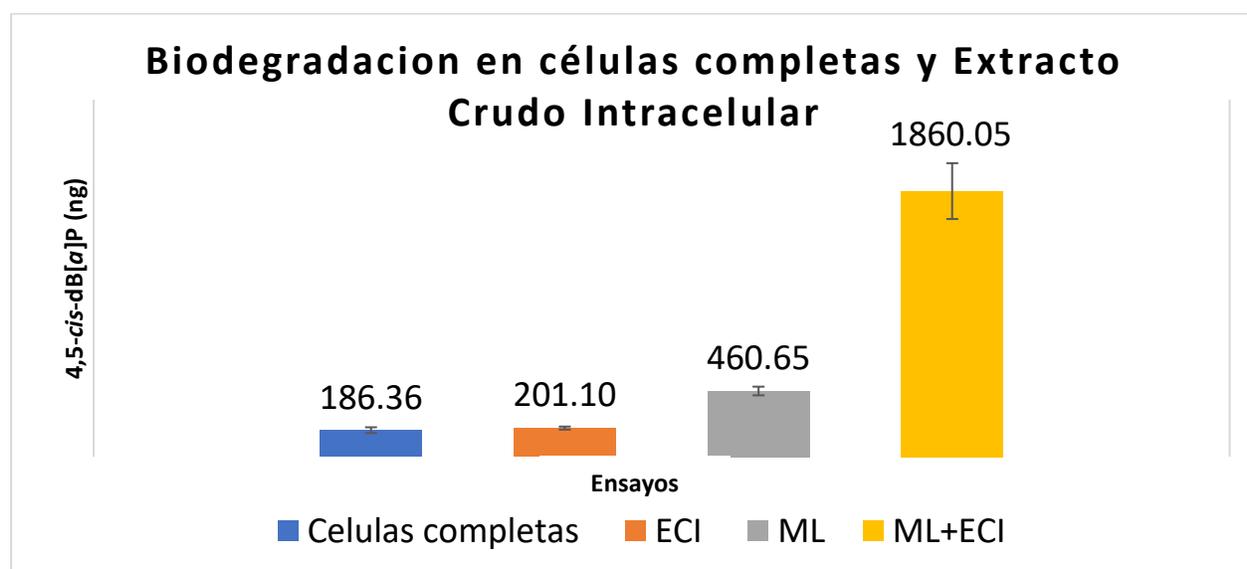


Figura 6.14. Evaluación de la biodegradación de *B[a]P* (4 µg, 3 h, 34 °C, luz amarilla y 50 rpm) en células completas, extracto crudo intracelular (ECI), medio líquido (ML) y la mezcla de los dos últimos (ML + ECI). Cuantificación del 4,5-*cis*-dB[a]P, con el equipo Varian ProStar y columna Microsorb MV.

6.2.4. Evaluación de la degradación en extractos crudos de *S. capricornutum*

6.2.4.1. Activación de *S. capricornutum* frente *B[a]P* por periodos de 48 y 72 h

El proceso de activación por exposición al *B[a]P*, sensibilizó las microalgas, induciendo la producción del sistema enzimático involucrado en la biodegradación de los HAP. Por lo tanto, se realizó la evaluación de la degradación a T ambiente durante 3 h en el extracto crudo extracelular y extracto crudo intracelular

provenientes de cultivos activados con una exposición de 48 y 72 h frente el *B[a]P* (266 ng mL^{-1}). Los extractos crudos se expusieron al *B[a]P* a 266 ng mL^{-1} . Los bioensayos de activación se realizaron a $34 \text{ }^\circ\text{C}$ para fomentar la producción del sistema degradador; el control residual se usó para cuantificar la cantidad de metabolito residual existente en los extractos enzimáticos, arrastrado de los bioensayos de activación. Los resultados de la evaluación de la degradación de *S. capricornutum* frente a los HAP se ilustran en la figura 6.15.A.

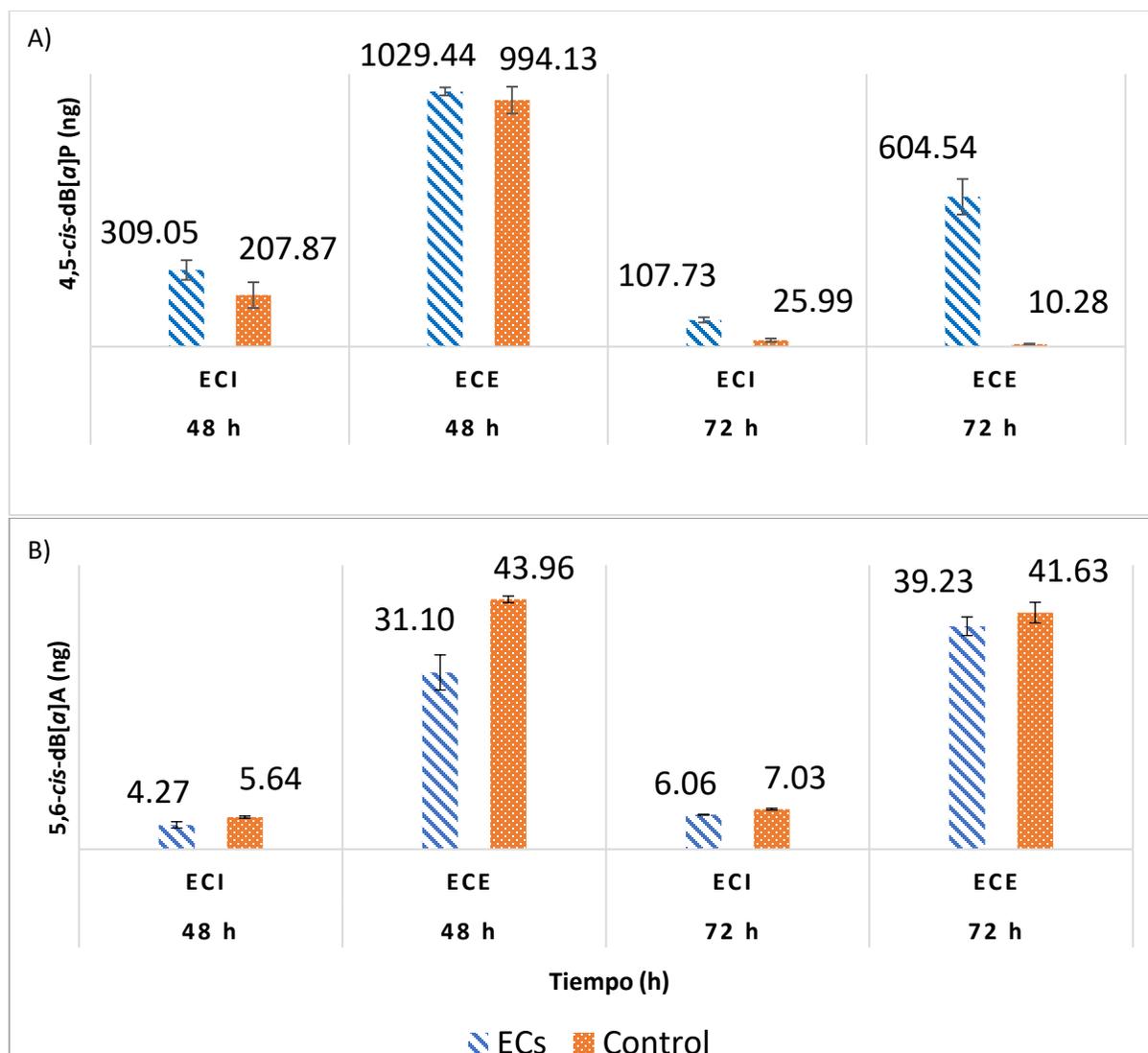


Figura 6.15. Evaluación de la degradación en Extractos Crudos (ECs) de *Selenastrum capricornutum* por incubación de 3h con *B[a]P* (A) o *B[a]A* (B) de acuerdo con el Hidrocarburo Aromático Policíclico usado en el proceso de activación (48 y 72 h). Cuantificación del 4,5-cis-dB[a]P con el equipo Varian ProStar y columna Microsorb MV.

Con ayuda de estos se determinó 72 h como mejor tiempo de activación para *S. capricornutum* frente al $B[a]P$, tiempo que permitió obtener la menor cantidad del 4,5-*cis*- $dB[a]P$ residual para poder distinguir mejor la cantidad de metabolito producida por la biodegradación presente en los extractos crudos con 3 h de exposición a temperatura y luz ambiente al exponerlos frente a $B[a]P$. El bioensayo de activación de 48 h no fue idóneo por que el 4,5-*cis*- $dB[a]P$ remanente perjudicó la subsecuente evaluación de la biodegradación de *S. capricornutum* frente al $B[a]P$ ya que se arrastró gran cantidad del metabolito producido. Los extractos crudos de 72 h de activación tuvieron una producción neta de 594.26 ± 29.45 ng (extracto crudo extracelular) y 81.74 ± 7.49 ng (extracto crudo intracelular) del 4,5-*cis*- $dB[a]P$. Estas cantidades se obtuvieron al restar la cantidad residual encontrada en los controles usados para cada extracto crudo. El 7,8-*cis*- $dB[a]P$ no pudo ser cuantificado. La mayor presencia del 4,5-*cis*- $dB[a]P$ en el extracto crudo extracelular sobre el extracto crudo intracelular reveló que su producción se puede realizar dentro de la célula y posteriormente ser liberado o que el propio sistema enzimático involucrado atraviesa la pared celular por un proceso similar.

6.2.4.2. Activación de *S. capricornutum* frente $B[a]A$ por periodos de 48 y 72 h

La biodegradación de $B[a]A$ por los extractos crudos de *S. capricornutum*, extracto crudo extracelular y extracto crudo intracelular, no se determinó porque el metabolito de seguimiento el 5,6-*cis*- $dB[a]A$ no se diferenció en la evaluación de la biodegradación del control. Por el contrario, la cantidad de metabolito se mantuvo por debajo de la del control residual proveniente del ensayo de activación. Estos resultados se muestran en la figura 6.15.B. Lo anterior, no significa que la biodegradación esté ausente, pues la velocidad de formación y la de desaparición del metabolito de seguimiento podrían ser similares debido a inestabilidad. Cabe destacar que la cuantificación del 5,6-*cis*- $dB[a]P$ fue superior en el extracto crudo extracelular, tal como se observó con el seguimiento del 4,5-*cis*- $dB[a]P$. Previamente se ha mostrado que la degradación de $B[a]A$ por *S. capricornutum* se realiza de manera lenta y con la aparición del 5,6-*cis*- $dB[a]A$ (García de Llasera y García Cicourel, 2017). Finalmente se escogió 48 h como tiempo de activación para evaluar la biodegradación en los extractos crudos de *S. capricornutum* frente al $B[a]A$ a través del tiempo, ya que extender el intervalo de activación resulta innecesario al haber logrado determinar la degradación en los extractos crudos de *S. capricornutum* expuestos a $B[a]P$ previamente (sección 6.2.4.1.).

6.2.4.3. Evaluación de biodegradación en extractos crudos de *S. capricornutum* a diferentes tiempos de incubación con $B[a]P$

Los ensayos de la evaluación de biodegradación con los extractos crudos descritos en sección 5.3.4.1.

fueron efectuados en los tiempos de 1.5, 3 y 6 horas. Estos resultados se juntaron con los de 72 h de activación y se muestran en la figura 6.16.

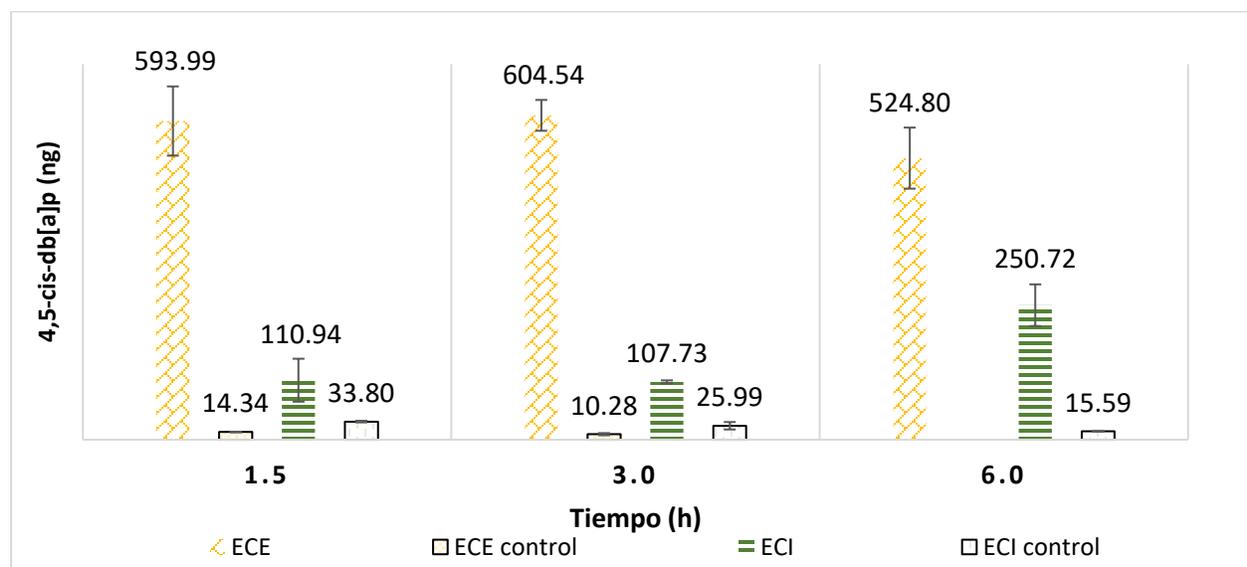


Figura 6.16. Evaluación de la biodegradación en Extractos Crudos de *Selenastrum capricornutum* por incubación de 1.5, 3 y 6 h con B[a]P, mismo que también fue usado para el proceso de activación (72 h). Cuantificación del 4,5-cis-dB[a]P con el equipo Varian ProStar y columna Microsorb MV.

La evaluación de la biodegradación en el extracto crudo intracelular entre 1.5, 3 y 6 h de incubación permitió observar un incremento en la cantidad del 4,5-cis-dB[a]P de las 3h a las 6 h. Al no disminuir en el intervalo de tiempo estudiado se puede asumir que la biodegradación continuará más allá del tiempo máximo evaluado. La máxima concentración total en el extracto crudo intracelular se obtuvo a las 6 h y se estimó al sustraer la cantidad del metabolito 4,5-cis-dB[a]P cuantificada del control ($15.59 \text{ ng} \pm 0.65$), a la cantidad del metabolito observada en la biodegradación del extracto crudo intracelular (250.72 ± 6.92), mostrando un total de $235.13 \pm 6.95 \text{ ng}$. El extracto crudo extracelular manifestó una baja variación en la concentración del 4,5-cis-dB[a]P entre tiempos, sin diferencia estadísticamente significativa. Después de considerar la sustracción de la cantidad del metabolito en el control, la máxima cantidad del metabolito asociado a la biodegradación en el extracto crudo extracelular se obtuvo a las 3 h (594.26 ± 10.72), disminuyendo levemente a las 6 h de evaluación. La disminución del metabolito en el extracto crudo extracelular apunta al descenso de la biodegradación más allá del tiempo evaluado. Al observar la producción del 4,5-cis-dB[a]P en los extractos crudos de *S. capricornutum*, se establece en ellos la presencia del sistema enzimático responsable de la degradación del B[a]P. La mayor presencia del metabolito en el extracto crudo extracelular sugirió la mayor concentración del sistema responsable en

este extracto como se ha observado en trabajos donde la respuesta extracelular enzimática de *S. capricornutum* es notablemente más alta que la intracelular (García de Llasera et al, 2022). Este comportamiento se ha observado en condiciones ambientales donde es necesaria una detoxificación del medio por las comunidades de microorganismos a través de componentes extracelulares. Ciertos trabajos han mostrado la presencia de sistemas enzimáticos microalgales extracelulares (Gao y Chi, 2015) como fosfatasas alcalinas de *Phaeodactylum tricornutum* bajo deficiencias de fósforo (Lin et al, 2013) y anhidrasas carbónicas que cuentan con actividades variadas en función de la presencia de bicarbonato en medios que contengan el alga *Dunaliella salina* HTBS (Hou et al., 2016). Recién se han descrito sistemas enzimáticos algales que pudieran estar relacionados con lo observado en este trabajo, estos liberan enzimas extracelulares como: pectinasas (Paz et al., 2021), lipasas (Yong et al., 2016) y lacasas en microalgas verdes que juegan un papel importante en la degradación de contaminantes fenólicos (Otto et al., 2015).

6.2.4.4. Evaluación de biodegradación en extractos crudos de *S. capricornutum* a diferentes tiempos de incubación con *B[a]A*

La evaluación de la biodegradación a través del tiempo en extractos crudos de *S. capricornutum* con 48 h de activación permitió diferenciar la cantidad de metabolito en el extracto crudo extracelular y en su control a las 17 h de comenzada la exposición a *B[a]A*, cuantificando la producción del 5,6-*cis*-dB[a]P en 10.8 ± 1.02 ng después de no detectar el metabolito en el control de este extracto. Por el contrario, este mismo procedimiento se aplicó en la evaluación de degradación con 3, 6, 9 y 14 h de incubación, pero no se evidenció degradación por el sistema enzimático en el extracto crudo extracelular. Por otra parte, en el extracto crudo intracelular de *S. capricornutum* frente *B[a]A* se determinó la presencia del sistema enzimático a las 14 h de comenzada la evaluación, cuantificando al 5,6-*cis*-dB[a]A en 2.76 ± 0.65 ng, sin poder determinar el metabolito a las 17 h de comenzada la exposición en el extracto crudo intracelular. Este ensayo determinó que la biodegradación puede estar presente hasta por 17 h después de la obtención de los extractos crudos. Más allá de este intervalo la biodegradación podría evaluarse, pero su prolongación para los fines de este trabajo resulta impráctica porque los ensayos con *S. capricornutum* frente *B[a]P* sí permitieron diferenciar la biodegradación en un menor tiempo. El seguimiento del 7,8-*cis*-dB[a]P en la degradación de *B[a]P* por *S. capricornutum* se imposibilitó debido a su baja producción y estabilidad publicada (García Cicourel, 2015), continuando probablemente su proceso de degradación.

6.2.5. Evaluación de la degradación en extractos crudos de *Scenedesmus acutus*

6.2.5.1. Activación de *S. acutus* frente B[a]P a diferentes tiempos

La evaluación de la biodegradación en extractos crudos de *S. acutus* frente B[a]P se realizó durante 3 h a T ambiente y con extractos provenientes de cultivos cuya activación se extendió hasta 336 h (2 semanas) al no contar en todos los tiempos aplicados con una cantidad de 4,5-*cis*-dB[a]P que permitiera evidenciar la presencia del sistema enzimático. Por lo tanto, la cantidad del metabolito en el control y en los extractos crudos se mantuvo similar en todo el intervalo de tiempo evaluado. Lo anterior podría explicarse porque García de Llasera y colaboradores (2016), describieron que la degradación de B[a]P por *S. acutus* sucede de manera más lenta que *S. capricornutum*, aunque formando los mismos metabolitos. Con la exposición de *S. acutus* frente B[a]P se cuantificaron las cantidades del 4,5-*cis*-dB[a]P y el 7,8-*cis*-dB[a]P producidas que se muestran en la figura 6.17.

Cabe destacar que, en estos bioensayos en el control residual se determinó una cantidad similar o mayor que la encontrada en los bioensayos de la evaluación de biodegradación con los extractos crudos. Esta similitud no permitió la diferenciación de cantidades de metabolito entre bioensayo de exposición y control. Por lo tanto, no se pudo cuantificar la producción del 4,5-*cis*-dB[a]P y 7,8-*cis*-dB[a]P por el proceso de biodegradación generado en los extractos crudos en presencia del sistema enzimático responsable. La mayor cantidad de metabolito promedio determinada en los bioensayos comparada con los controles a través del tiempo probado se observó solamente a las 72 h (extracto crudo extracelular) y 336 h o 2 semanas (extracto crudo intracelular) de incubación. Sin embargo, no se logró evidenciar el proceso de biodegradación activo en los extractos crudos a causa de la variación obtenida en las mediciones realizadas en la cuantificación de los metabolitos. García Cicourel, 2015 observó que la degradación de B[a]P por células de *S. acutus* a las 72 h llega a un estado estacionario, razón por la cual se emplearon 336 h para establecer su comportamiento en periodos de tiempo más largos. Una explicación de observar cantidades similares entre bioensayos y controles recae en que las velocidades de degradación de B[a]P y en consecuencia la de producción de metabolitos parecen mantenerse estables y similares en el intervalo de tiempo evaluado entre extractos crudos y controles.

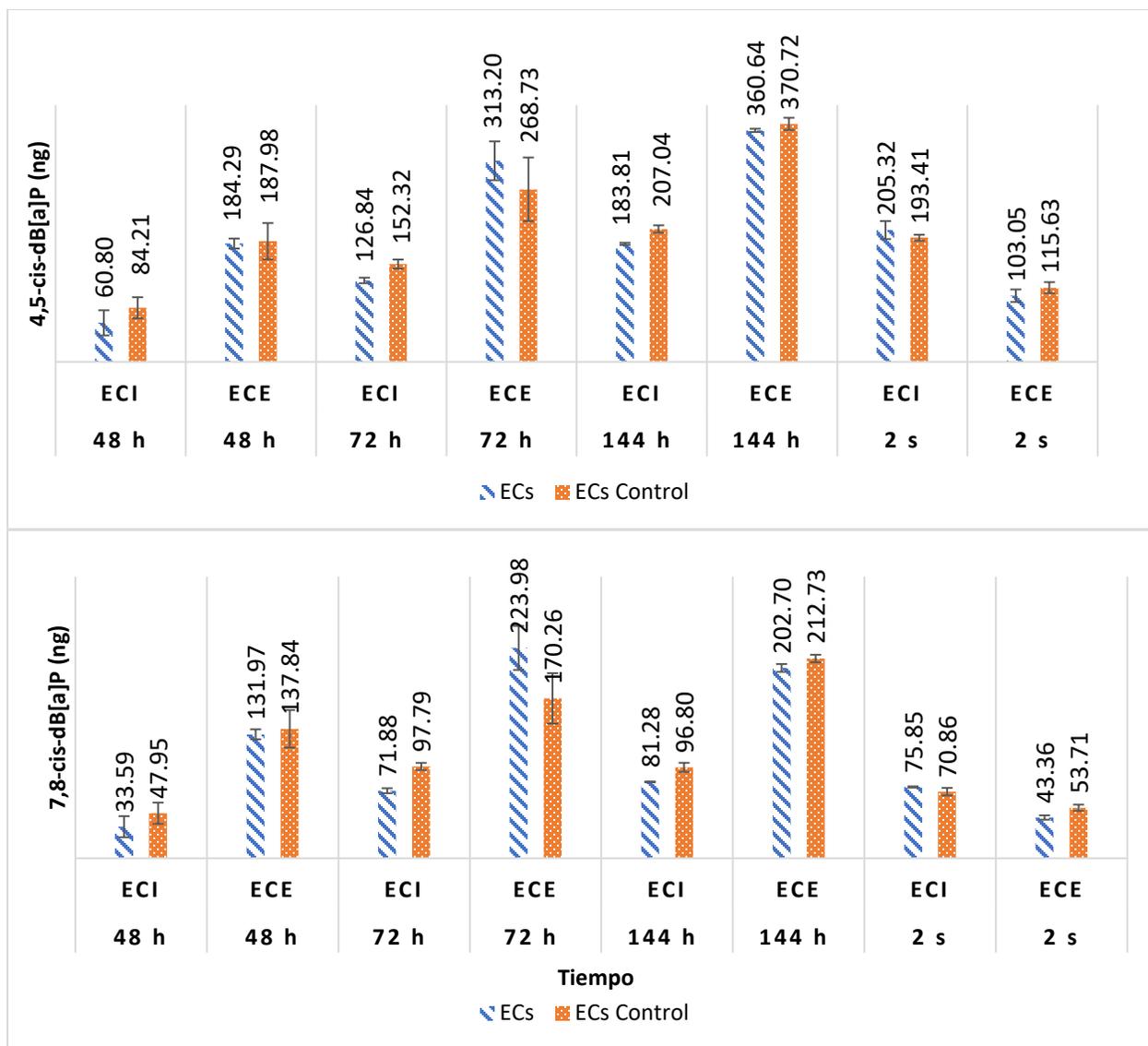


Figura 6.17. Evaluación de la biodegradación en Extractos Crudos de *Scenedesmus acutus* por incubación de 3 h con B[a]P, mismo que también fue usado en el proceso de activación (48, 72, 144, h y 2 semanas). Cuantificación del 4,5- y 7,8 - cis-dB[a]P con el equipo Varian ProStar y columna Microsorb MV.

6.2.5.2. Activación de *S. acutus* frente B[a]A a diferentes tiempos

La evaluación de biodegradación en extractos crudos de *S. acutus* por exposición a B[a]A durante 3 h, a T ambiente, con extractos proveniente de cultivos activados por periodos de 48 y 72 h, evidenció la presencia del 5,6-cis-dB[a]A formado por el sistema enzimático presente en los extractos crudos.

Los resultados se muestran en la figura 6.18. y se observa claramente que las cantidades del 5,6-cis-dB[a]A

determinadas en el control fueron menores que las cuantificadas en el bioensayo de evaluación de biodegradación de extractos crudos, característica más evidente en los extractos crudos extracelulares. En este bioensayo las cantidades determinadas del 5,6-*cis*-dB[a]P en el extracto crudo extracelular también fueron mayores en comparación con las cantidades determinadas en el extracto crudo intracelular. La diferencia de cantidades de metabolito encontradas entre los extractos crudos extracelulares y los extractos crudos intracelulares con los controles de 48 h permitieron diferenciar la producción del metabolito 5,6-*cis*-dB[a]P. Así, al tomar en cuenta la producción de metabolito en el bioensayo control del extracto crudo intracelular (sustracción de la cantidad observada en el control), se cuantificó un total del metabolito de seguimiento de 0.44 ± 0.0014 ng en el extracto crudo intracelular y $4.57 \pm 0.049 \times 10^{-2}$ ng en el extracto crudo extracelular. Este mismo procedimiento con 72 h de activación no permitió la determinación de la biodegradación en el extracto crudo intracelular por no haber diferencia de las cantidades de metabolito entre control y bioensayo. Por el contrario, en el extracto crudo extracelular proveniente de cultivos de 72 h, se logró determinar 3.44 ± 0.21 ng del 5,6-*cis*-dB[a]P diferenciados del extracto crudo extracelular control. Estos resultados evidencian la presencia del sistema enzimático en los extractos crudos de *S. acutus* y presumiblemente en mayor presencia en el extracto crudo extracelular.

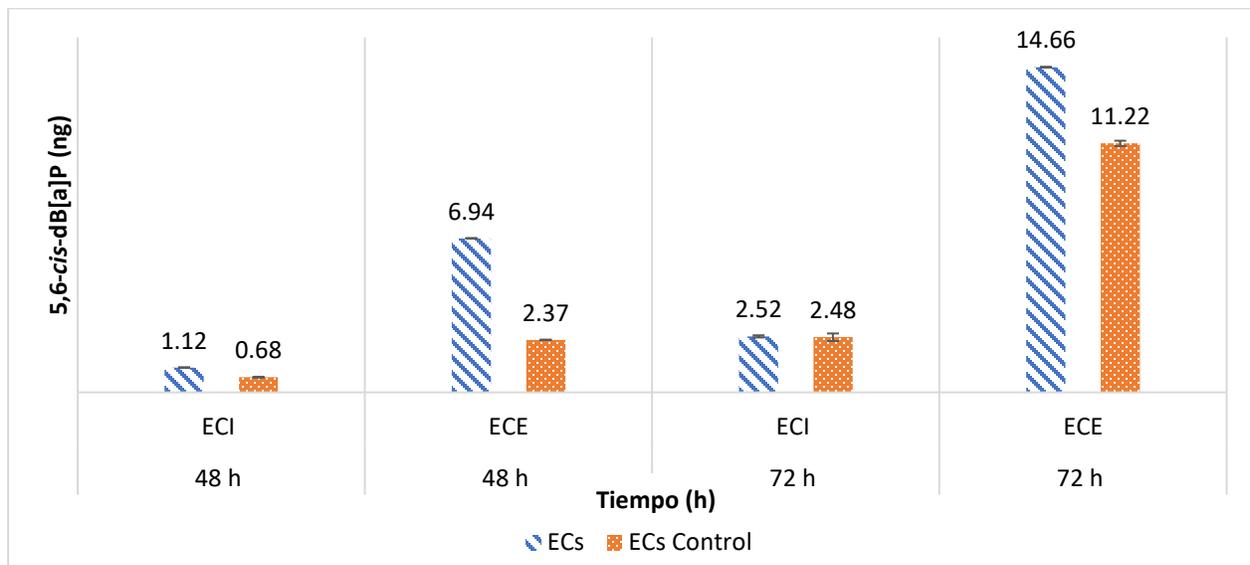


Figura 6.18. Evaluación de degradación en Extractos Crudos de *Scenedesmus acutus* por incubación de 3 h con B[a]A, mismo que también fue usado en el proceso de activación (48 y 72 h). Cuantificación del 5,6-*cis*-dB[a]P con el equipo Varian ProStar y columna Microsorb MV.

6.2.6. Selección de tiempos de activación para los ensayos de evaluación de degradación en extractos crudos de *S. capricornutum* y *S. acutus*

Como se muestra las secciones 6.2.4.1 y 6.2.4.2 el intervalo de tiempo que permitió la diferenciación de producción de los metabolitos en los extractos crudos de *S. capricornutum* se encontró en el intervalo de 48 a 72 h; de tal manera que el tiempo de activación de 72 h fue seleccionado como el óptimo para la exposición con B[a]P y de 48 h para la de B[a]A. En los bioensayos de exposición de *S. acutus* al B[a]P se observó que el tiempo usado no fue suficiente para determinar la biodegradación en los extractos crudos, probablemente manteniéndose el comportamiento en intervalos de tiempo mayores a los evaluados. En el caso de los extractos crudos de *S. acutus* y de acuerdo con la evaluación de biodegradación realizada con B[a]A el tiempo de activación seleccionado fue de 48 h, tiempo que permitió la determinación del 5,6-*cis*-dB[a]P a las 3 h de evaluación de biodegradación. Destacando que como se ha mencionado, extractos crudos de *S. capricornutum* con activación de 48 h frente B[a]A permitió la determinación del 5,6-*cis*-dB[a]A en la evaluación de degradación por 14 h y 17 h de incubación en extracto crudo intracelular y extracto crudo extracelular; respectivamente.

6.2.7. Evaluación de biodegradación en extractos crudos de *S. capricornutum* concentrados por evaporación o filtración

Después de la concentración de los extractos crudos provenientes de 4 cultivos activados, se realizó la evaluación de la biodegradación con exposición al B[a]P. El extracto crudo intracelular evaporado mostró la biodegradación al lograrse la cuantificación diferenciada del metabolito de seguimiento 4,5-*cis*-dB[a]P (0.55 ± 0.02 ng) de los controles usados, valor por debajo de lo observado en el extracto crudo extracelular. En el extracto crudo extracelular también se diferenció la biodegradación de B[a]P por la cuantificación de los metabolitos 4,5-*cis*-dB[a]P y el 7,8-*cis*-dB[a]P (17.89 ± 2.44 ng y $40.74 \pm$ ng; respectivamente). Se observaron picos desconocidos en el cromatograma mostrados en la figura 6.19 en las secciones remarcadas i y ii para el extracto crudo intracelular y extracto crudo extracelular; respectivamente. Estos indicios posteriormente podrán ser retomados y evaluados al considerar que son productos resultantes de la biodegradación del B[a]P en etapas avanzadas, ya que estos picos no se han observado en intervalos de tiempo cortos usados para estudiar la degradación de B[a]P por *S. capricornutum*. Estos compuestos se muestran en mayor proporción en el extracto crudo extracelular concordando con la mayor actividad extracelular del sistema enzimático descrita en la sección 6.2.4.3. De esta manera, se demostró que los extractos crudos evaporados por rotavapor (extracto crudo intracelular) o filtrados por membrana centricon (extracto crudo extracelular) conservaron la biodegradación activa. Igualmente, si la cantidad de

los metabolitos de seguimiento se encuentra directamente relacionada con la presencia del sistema enzimático, como resultado de su actividad, entonces por asociación el extracto crudo extracelular mostraría una mayor presencia de este sistema.

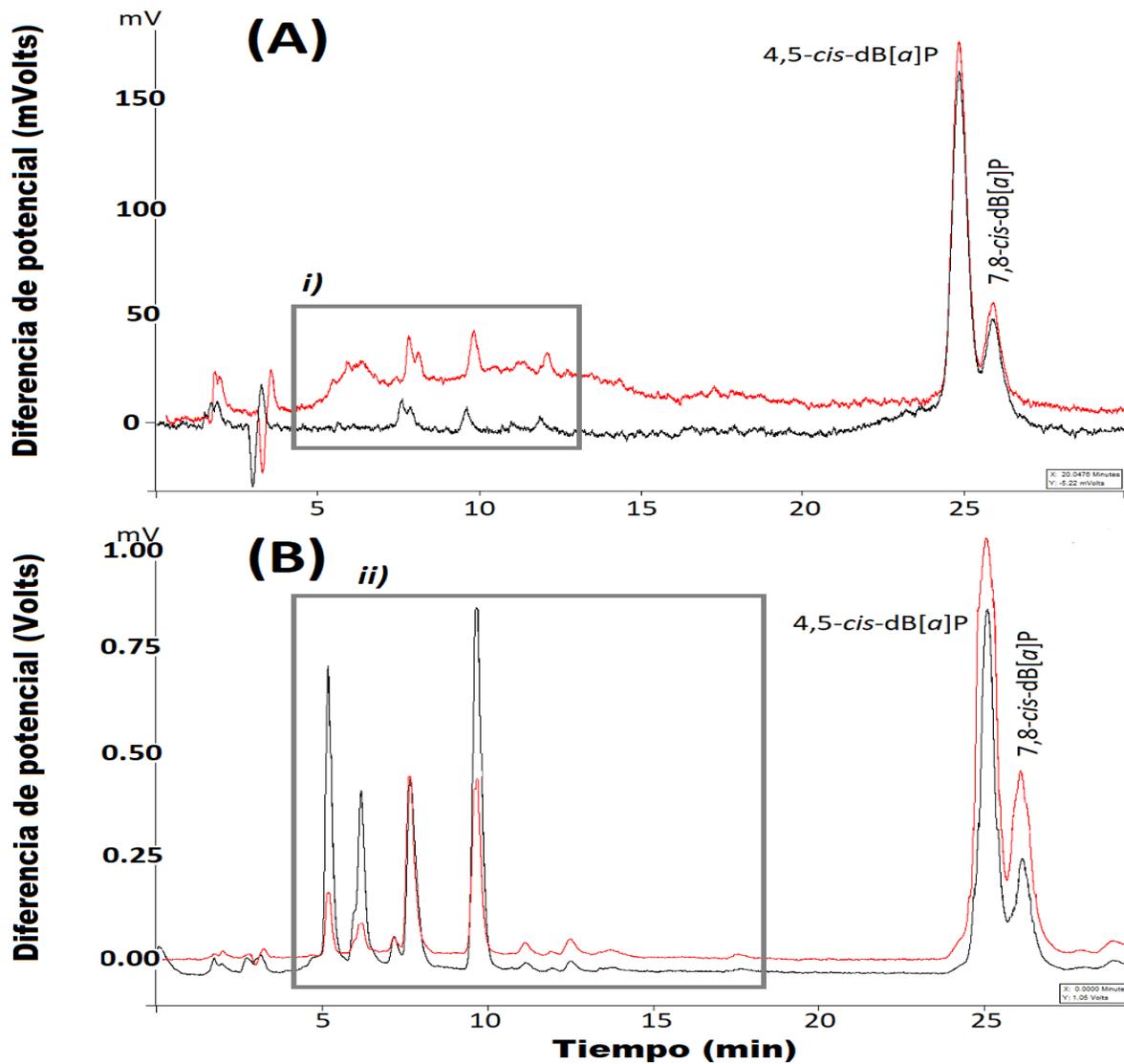


Figura 6.19. Cromatogramas de la evaluación de biodegradación del B[a]P (rojo) en (A) Extracto Crudo Intracelular concentrado (x4) y (B) Extracto Crudo Extracelular concentrado (x4) de *Selenastrum capricornutum*, frente sus controles (negro). Fueron obtenidos con el cromatógrafo Varian ProStar y la columna Microsorb-MV. En el recuadro gris muestra picos de productos de degradación desconocidos.

Dadas las bajas cantidades cuantificadas de los metabolitos de seguimiento, 4,5-cis-dB[a]P y 7,8-cis-dB[a]P, asociados a la biodegradación se decidió acumular los extractos crudos provenientes de 12 cultivos

activados por exposición a *B[a]P*, en lugar de emplear 4 cultivos activados. Lo anterior para colectar una mayor cantidad de enzima degradante y así realizar su posterior fraccionamiento por Cromatografía de Exclusión Molecular. Por ello, los extractos crudos colectados pasaron de un volumen total de 60 (x 4) a 180 mL (x 12) y de 20 (x 4) a 60 mL (x 12) para los extractos crudos extracelulares y extractos crudos intracelulares; respectivamente. Los extractos crudos intracelulares se evaporaron usando las condiciones suaves del rotavapor (85 rpm / 37 °C / 10 mbar) hasta 2 mL, mientras que los extractos crudos extracelulares se filtraron y concentraron uno a uno con el dispositivo centricon de 15 mL (tamaño de poro de 30 kDa) a temperatura controlada (7700 rpm / 4 °C / 15 min c/u / 180 total min) hasta el volumen final de 2 mL. Finalmente, al tratar una mayor cantidad de cultivos provenientes de bioensayos de activación, fue necesario tener más cuidado en que los extractos crudos no contuvieran restos sólidos por lo que ya filtrados se centrifugaron nuevamente a temperatura controlada (3900 / 15 min / 4 °C). Los extractos crudos concentrados (x 12) resultantes se fraccionaron y analizaron por Cromatografía de Exclusión Molecular.

6.2.8. Análisis de extractos crudos de *Selenastrum capricornutum* por cromatografía de exclusión molecular

Con las calibraciones primarias en las columnas Sephax SRT SEC-300 y Agilent Bio SEC-5 se realizó la búsqueda de diferencias en la composición del perfil molecular en los extractos crudos concentrados (x4) por comparación con los controles provenientes de cultivos sin activación. En el cromatograma del extracto crudo intracelular obtenido en la columna Sephax SRT SEC 300 se observó un pico cromatográfico en 10.4 min y otro en 9.3 min. Estos picos cromatográficos se distinguieron del cromatograma del control proveniente de cultivo no activado por *B[a]P*. En la curva de calibración a estos picos se les asoció a un PM de 38.15 ± 1.8 kDa y 109 ± 5.15 kDa; respectivamente. En el extracto crudo extracelular se observó un comportamiento similar, mostrando un pico cromatográfico a los 10.3 min asociado a un PM de 41.97 ± 1.59 kDa y otro a los 9.4 min asociado a PM de 99 ± 3.76 kDa. Al realizar la búsqueda de los compuestos con estos PM en el extracto crudo extracelular control proveniente de cultivos no activados, no estuvieron presentes. Los dos compuestos detectados en ambos extractos deben ser los mismos, aunque los PM extrapolados sean un poco diferentes entre sí, debido a la incertidumbre en la medición de los tiempos de retención en los cromatogramas. El análisis del espectro de absorción Ultravioleta de ambas señales (10.4 y 10.3 min), los cuales son más evidentes, mostró que ambos cuentan con el mismo perfil teniendo un máximo de absorción a los 258.2 nm. Este comportamiento corroboró que se trató del mismo compuesto, presentando un PM promedio de 40 kDa. Como se comentó antes, la diferencia de PM observada de este

pico determinada en las dos columnas puede deberse a la variación en la retención del componente, calculada en ± 2.4 kDa a través de la propagación del error con tres repeticiones de cada extracto en la columna SRT SEC-300, Sephax Technologies. Debido al seguimiento resulta evidente que este componente se encuentra en ambos extractos crudos y con posibilidad de pasar de la parte interna o externa de la célula al medio extracelular participando en la degradación *intra-* y *extra-* celular. La imagen de los cromatogramas obtenidos y el espectro Ultravioleta analizado se encuentra en la figura 6.20.

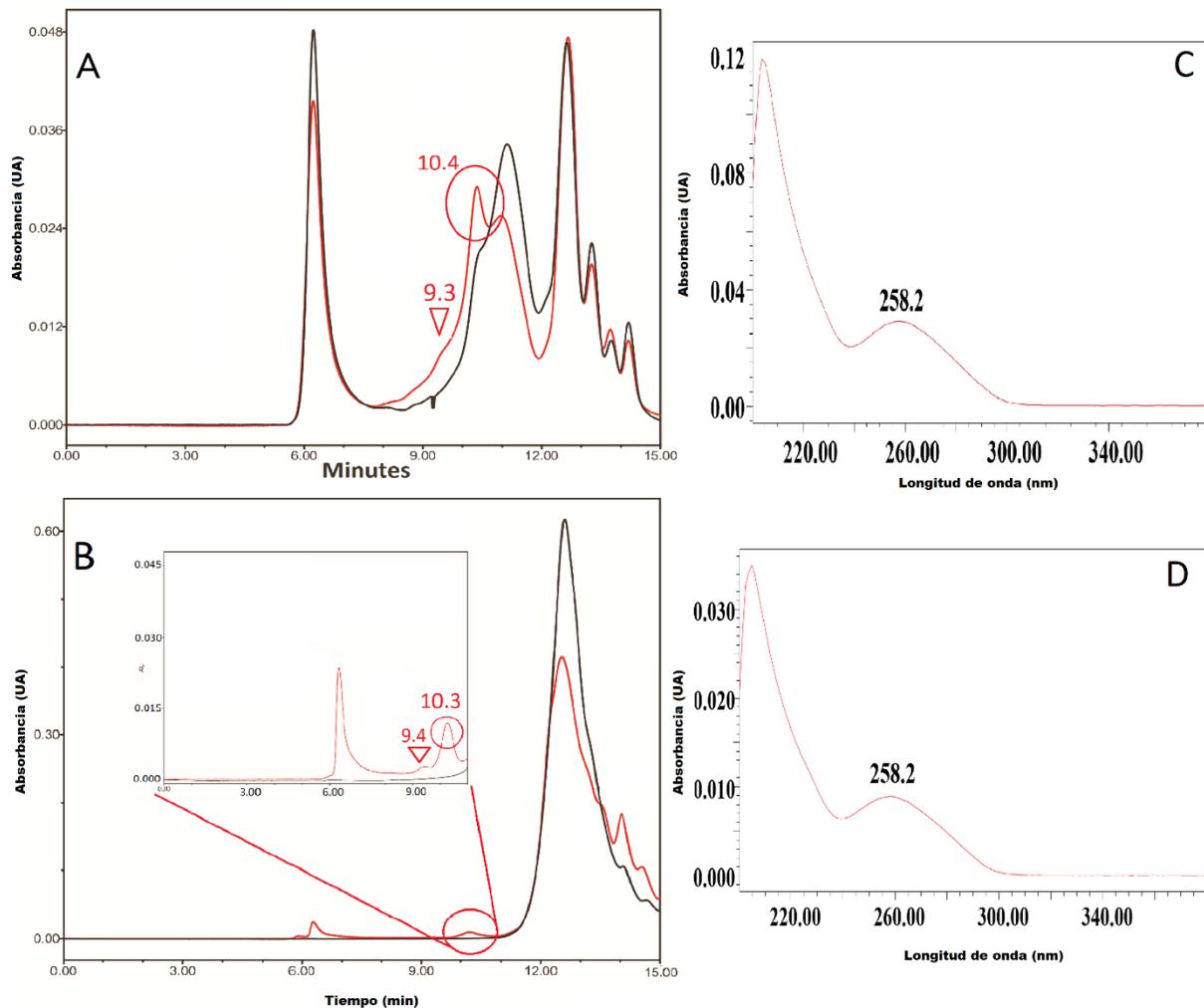


Figura 6.20. Cromatogramas de A) Extracto Crudo Intracelular concentrados (x4), y B) Extracto Crudo Extracelular concentrados (x4), incubados por 3 h con B[a]P y también usado en la activación (72 h), frente Extractos Crudos concentrados (x4) sin activación (negro). Espectro de absorción de los picos de 10.4 min (C) y 10.3 min (D). Equipo usado, cromatógrafo Waters 1525 y la columna SRT SEC-300.

De acuerdo con el PM promedio de 40 kDa y 104 kDa de los componentes encontrados, estos podrían

evidenciar a un sistema enzimático multicomponente. De acuerdo con los sistemas enzimáticos publicados, los PM encontrados podrían estar ligados a la presencia de una *di*-oxigenasa ya que se ha publicado su conformación por diversos componentes. Jouanneau y colaboradores (2006) publicaron para *Sphingomonas sp* *CHY-1* subunidades 52 y 20 kDa de una dioxigenasa hidroxilante de anillo implicada en la degradación de HAP. El mismo autor propone que la oxigenasa purificada tiene una masa molecular de aproximadamente 200 kDa, indicando que es un hexámero $\alpha_3\beta_3$. En nuestro caso, los componentes evidenciados podrían pertenecer en conjunto a un tetrámero $\alpha_2\beta_2$. Por otra parte, también han sido asociadas unidades con tamaños que corresponden a 50 (subunidad grande) y 20 kDa (subunidad pequeña) en *Mycobacterium* (Krivobok et al., 2003). También Chemerys y colaboradores (2014), a partir de suelo bacteriano que contenía *beta*-proteobacterias especialmente *Rhodocyclaceae* y *Burkholderiales* y sobre expresadas en *E. coli* caracterizaron *di*-oxigenasas hidroxilantes de anillo aromático en la degradación de HAP de bajo peso molecular describiendo una sobre expresión de un componente proteico de aproximadamente 37 kDa tamaño que también se aproxima al PM analizado. Adicionalmente se han mostrado espectros de adsorción en la cristalización y caracterización de la protocatecuato 3,4-*di*-oxigenasa procedente de células *Pseudomonas aeruginosa* inducida por *p*-hidroxi-benzoato el cual muestra un espectro de absorción similar al mostrado en este trabajo y con un máximo en 281 nm (Fujisawa y Hayaishi, 1968).

6.2.9. Bioensayos de evaluación de degradación por exposición al B[a]P de extractos crudos concentrados fraccionados en Sephadex G-50

Los extractos crudos concentrados (x 12) fueron aplicados en una columna Sephadex G-50 para obtener cuatro fracciones, dos de extracto crudo intracelular y dos del extracto crudo extracelular una con componentes >30 kDa y otra con componentes de 30 kDa – 1.5 kDa, las cuales fueron usadas en la evaluación de biodegradación por un intervalo de 3 h por exposición al B[a]P (4 µg). Posteriormente, fueron analizadas por Extracción en Fase Sólida- Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución cuantificando el 4,5-*cis*-dB[a]P. Las cantidades de metabolito determinadas en estos bioensayos fueron ajustadas con la sustracción de las cantidades del metabolito obtenidas en el control residual proveniente de los cultivos que sufrieron activación por exposición al B[a]P. De esta manera se determinaron 40.25 ± 1.02 ng de 4,5-*cis*-dB[a]P en el extracto crudo intracelular > 30 kDa, y 25.49 ± 1.17 ng en el extracto crudo intracelular 30 kDa - 1.5 kDa. Por otra parte, la formación de metabolito en las fracciones del extracto crudo extracelular no se evidenció, por lo que en el extracto crudo extracelular > 30 kDa no se observó degradación, mientras que en el extracto crudo extracelular 30 kDa - 1.5 kDa la presencia del 4,5-*cis*-dB[a]P

se observó apenas en el LD. Ejemplo de los cromatogramas obtenidos están en la figura 6.21.

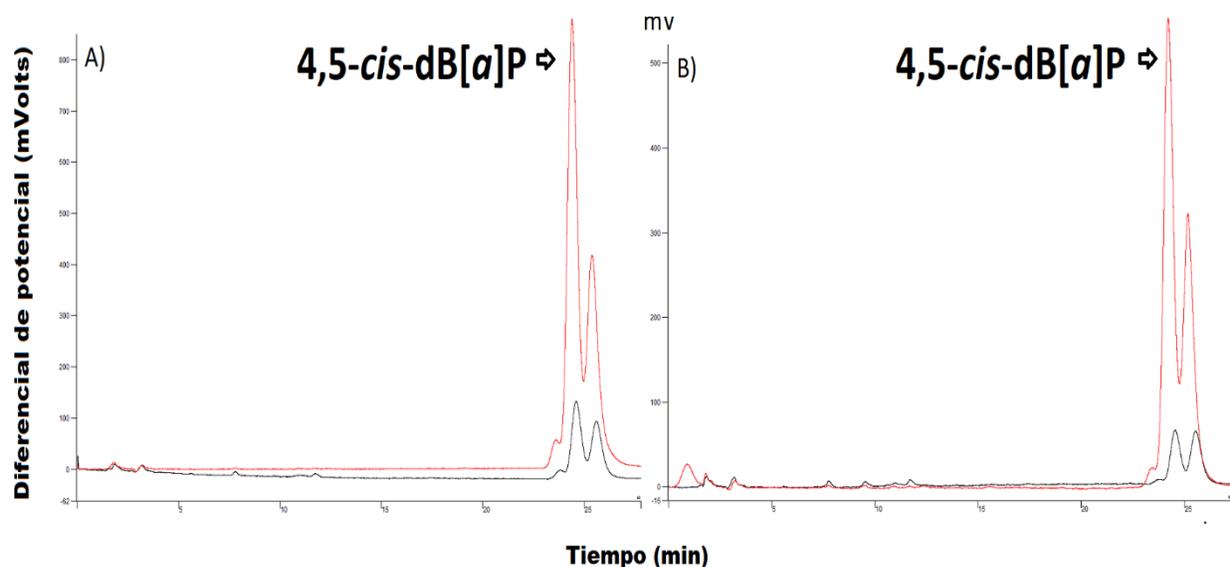


Figura 6.21. Cromatogramas de A) Extracto Crudo Intracelular > 30 kDa y B) Extracto Crudo Intracelular 30 kDa - 1.5 kDa ambos extractos concentrados (x12) e incubados por 3 h con B[a]P, también usado en la activación. Los controles del residual de metabolitos se muestran en negro y los bioensayos de degradación en rojo. Se uso el equipo Varian ProStar y la columna Microsorb-MV.

La presencia del metabolito de aparición temprana *4,5-cis-dB[a]P* demostró la degradación en los extractos crudos intracelulares, en otras palabras, se mantuvo el sistema enzimático activo. La desaparición de la degradación en el extracto crudo extracelular puede asociarse al proceso de concentración por filtración (membrana <30 kDa) y al tiempo necesario para el procesamiento del volumen total (180 mL) perdiendo algún componente o subunidad del sistema enzimático ya que el extracto crudo extracelular fue concentrado por filtración y no así el extracto crudo intracelular. Este comportamiento se ha observado previamente en *di*-oxigenasas capaces de degradar pesticidas como el cloridazon (Pirazol); donde sus fracciones colectadas no mostraron actividad degradadora por separado, mientras que, al colocarlas juntas de nuevo recuperan su biodegradación (Sauber et al., 1977). La presencia de la biodegradación en las ambas fracciones del extracto crudo intracelular puede explicarse por el solapamiento de las fracciones, debido a la baja resolución del proceso de fraccionamiento, favoreciendo la degradación del B[a]P a *4,5-cis-dB[a]P*, proceso similar observado en el fraccionamiento pirazon dioxigenasa donde las fracciones colectadas contaron con pequeñas cantidades de las fracciones continuas (Sauber et al., 1977).

6.2.10. Bioensayos de evaluación de degradación por exposición al B[a]P de extractos crudos concentrados fraccionados con Sephadex G-100

Los extractos crudos concentrados (x 12) fueron aplicados en una columna Sephadex G-100 para obtener las fracciones A y B. Este ensayo se mostró biodegradación por el sistema enzimático en la fracción A al cuantificarse la producción total del 4,5-*cis*-dB[a]P en 5.26 ± 0.19 ng. Por esta razón, con uso de las calibraciones secundarias se realizó el seguimiento de los componentes proteicos en la fracción A, los primeros 8 mL colectados del intervalo de trabajo, ya que en la fracción B el metabolito de seguimiento no se detectó. Por otra parte, la cantidad residual del 4,5-*cis*-dB[a]P arrastrada del bioensayo de activación por exposición al B[a]P en la fracción A y B no fue detectada, en consecuencia, se pudo concluir que el sistema enzimático se encontraba presente en la fracción A ya que se encontró la formación del metabolito de seguimiento.

El siguiente paso para encontrar el PM de los componentes presentes en la fracción A, involucró el fraccionamiento fino con la fase G-100 obteniendo las fracciones A1 hasta B4. En dichas fracciones se realizó la evaluación de la biodegradación por exposición al B[a]P, observando que solo las fracciones A1 y A2 mostraron presencia de biodegradación asociada a la determinación del 4,5-*cis*-dB[a]P de tal manera que se midió la cantidad de 21.06 ± 0.29 ng y de 5.54 ± 0.34 ng; respectivamente. El seguimiento de las cantidades del 4,5-*cis*-dB[a]P obtenido a través de todas las fracciones de análisis en Sephadex G-50 y 100 se muestran a manera de resumen en la tabla 6.5.

Tabla 6.5. Cantidades del 4,5-*cis*-dB[a]P cuantificadas en las fracciones de los Extractos Crudos obtenidas por cromatografía de exclusión molecular y analizadas por cromatografía de líquidos de alta resolución. Se uso el cromatógrafo Varían ProStar y la columna Microsorb MV.

Fracción	4,5- <i>cis</i> -dB[a]P, metabolito de seguimiento			
	Volumen de fracción (mL)	Fase de fraccionamiento	Bioensayo (ng) extracto EFS	Control (ng) Extracto EFS
ECI > 30	8.2		45.99 ± 1.16	5.74 ± 0.19
ECI 30 -1.5	10	Sephadex G-50	25.49 ± 1.10	< LC
ECE > 30	8.2	V.e.: 8.2 ± 0.06 mL	N.D.	N.D.
ECE 30 -1.5	10	V.p.t.: 25.5 ± 0.2 mL	< LC	< LC
ECI A	8		5.26 ± 0.19	< LC
ECI B	8		N.D.	N.D.
ECI A1	2		21.06 ± 0.29	N.D.
ECI A2	2		5.54 ± 0.34	N.D.

Fracción	4.5- <i>cis</i> -dB[a]P, metabolito de seguimiento			
	Volumen de fracción (mL)	Fase de fraccionamiento	Bioensayo (ng) extracto EFS	Control (ng) Extracto EFS
ECI A3	2	Sephadex G-100 V.e.: 12.4 ±0.53 mL V.p.t.: 45.3 ±1.7 mL	< LC	N.D.
ECI A4	2		< LC	N.D.
ECI B1	2		N.D.	N.D.
ECI B2	2		N.D.	N.D.
ECI B3	2		N.D.	N.D.
ECI B4	2		N.D.	N.D.
ECI A1a	1		6.96 ±0.3	N.D.
ECI A1b	1		< LC	N.D.
ECI A2a	1	N.D.	N.D.	
ECI A2b	1	N.D.	N.D.	
ECE > 30 kDa + ECE 30 kDa - 1.5 kDa	7.5 mL cada fracción	No se fraccionó	25.6 ± 1.05	18.74±0.97

N.D.: No detectado, < LC: bajo del límite de cuantificación, V.e.: volumen de exclusión y V.p.t.: volumen permeación total. Ecuaciones para el seguimiento de PM: (Sephax SRT SEC-300: $y = -0.4457x + 5.8994$; Agilent Bio SEC-5: $y = -0.406x + 4.9261$), ECE: extracto crudo extracelular ECI: extracto crudo intracelular, EFS: Extracción en Fase Sólida

Al observar las cantidades de metabolitos en las fracciones y subfracciones obtenidas de los extractos crudos se notó que los extractos crudos extracelulares, no presentaron el nivel de biodegradación previo ya que fue en fracciones del extracto crudo intracelular provenientes de la biomasa donde se solamente cuantificó la presencia de los metabolitos. Es decir, con las fracciones provenientes del extracto crudo extracelular no se cuantificó el metabolito 4,5-*cis*-dB[a]P probablemente por la ausencia del sistema enzimático activo. En contra parte, el extracto crudo intracelular > 30 kDa y el extracto crudo intracelular 30 kDa – 1.5 kDa permitió la observación de la degradación efectuada por el sistema enzimático por la formación del metabolito, y aproximadamente fue del doble en la fracción > 30 kDa comparada con la obtenida en la fracción 30 kDa – 1.5 kDa. La dilución del sistema enzimático fue un factor involucrado en la disminución del grado de biodegradación porque en las fracciones A y B del extracto crudo intracelular la cantidad del metabolito de seguimiento disminuyó considerablemente, no detectándose en la fracción B. Adicionalmente, la fase Sephadex G-100 sirvió para realizar una detección de moléculas en un intervalo de PM más amplio que en la fase Sephadex G-50, pero fraccionando finamente los componentes del sistema enzimático presente. La corroboración del efecto de la dilución en la determinación del metabolito se observó en el análisis de las 8 subfracciones A1 a B4 del extracto crudo intracelular. Esta experimentación, en donde se manejaron las subfracciones en su volumen original de 2 mL, logró que la

cantidad del 4,5-*cis*-*dB[a]P* fuera cuantificada con 300.4% más que con la cuantificación del metabolito en la fracción completa A de 8 mL y llevada a un volumen de 15 mL por empleo de medio Bristol en presencia del amortiguador Tris 50 mM pH 7.6 expuesta a *B[a]P* (266 ng mL⁻¹). En las subfracciones A1 y A2 se consideró una mayor degradación, siendo más notable en la subfracción A1, asociando una mayor cantidad del metabolito a una mayor presencia del sistema enzimático. Con base en los resultados obtenidos con las subfracciones A1 y A2, éstas pudieran contener compuestos proteicos con un PM rondando los 150 kDa, de acuerdo con el intervalo de trabajo de la fase concordante con los PM de las *di*-oxigenasas encontradas en el proceso de degradación de HAP con pesos de hasta 200 kDa (Jouanneau et al. 2006). El control de cantidades residuales del 4,5-*cis*-*dB[a]P* en las subfracciones A1 a B4 no presentaron cantidades de metabolitos detectables o cuantificables según el caso. La tabla 6.5. también muestra el seguimiento del 4,5-*cis*-*dB[a]P* en las subfracciones A1a a A2b procedentes del extracto crudo intracelular y un bioensayo realizado en conjunto con fracciones extracto crudo extracelular <30 kDa y extracto crudo extracelular 30 kDa a 1.5 kDa que será descrito más adelante.

El análisis por Cromatografía de Exclusión Molecular a nivel analítico de las fracciones A1 a B4 con la columna Sephax SRT SEC-300 mostró que las microalgas generaron una sobreproducción de componentes con PM de 325.15 ± 3.54 kDa (7.6 min), 215.68 ± 5.34 kDa (8 min), 91.1 ± 29.3 kDa (8.84 min), y 37.68 ± 4.22 kDa (9.7 min) en las fracciones en donde se evidenció degradación y se les pudo realizar un seguimiento (A1 y A2), observado que en las fracciones donde no se pudo realizar el seguimiento de estos componentes la biodegradación desapareció. Los PM mostrados fueron calculados con la curva de calibración secundaria preparada previamente al análisis de las fracciones. Los PM grandes como 325.15 y 215.68 kDa encajan en la descripción de sistemas multi componentes encabezados por *di*-oxigenasas ya que se han descrito alcanzan tamaños de hasta 200 kDa (Bourguignon et al., 2019 Jouanneau et al., 2006), mientras que los PM de 91.1 y 37.7 kDa son cercanos a la descripción de una peroxidasa (Kim et al., 2004) y una *di*-oxigenasa (Chemerys et al 2014). Adicionalmente, también se observó la sobreproducción de PM de menor tamaño en las fracciones sin biodegradación. Este análisis derivó en la construcción de un histograma con los PM que permitieron su seguimiento, figura 6.22. La figura 6.23 muestra los cromatogramas obtenidos de las fracciones A1 y A2 con la columna Sephax SRT SEC-300.

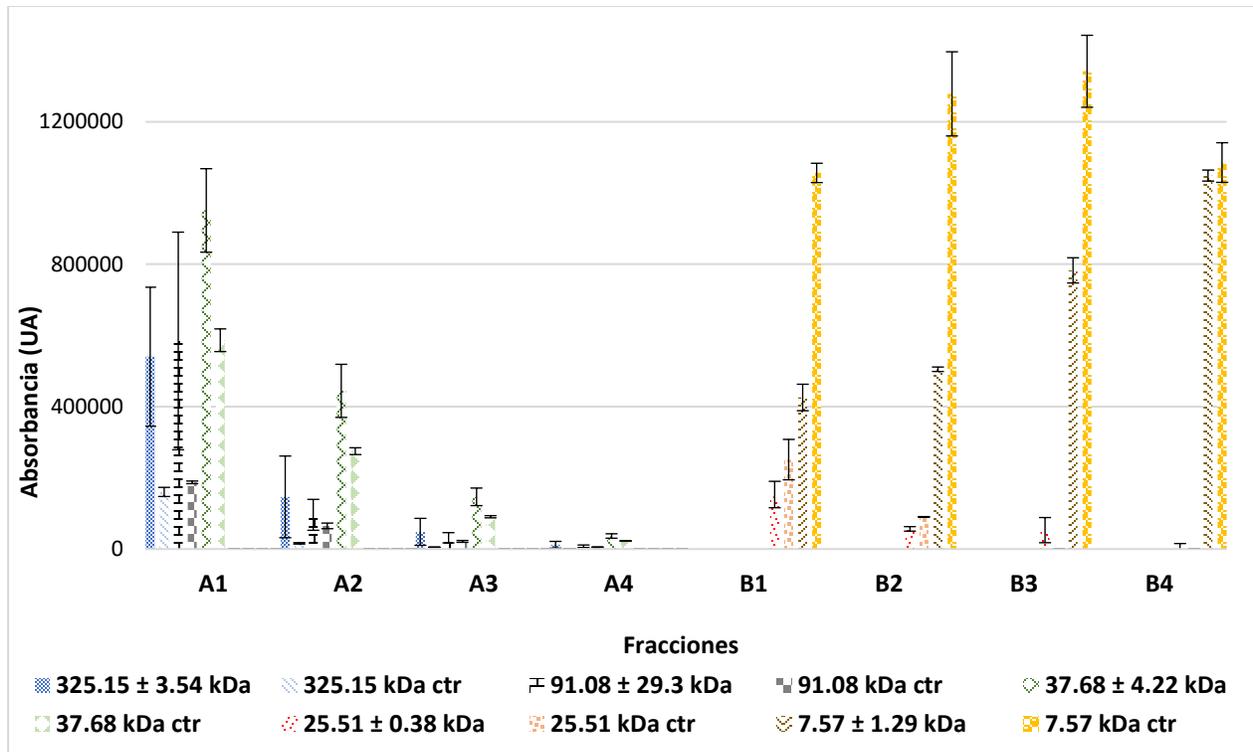


Figura 6.22. Histograma de las fracciones A1 a B4 del Extracto Crudo Intracelular obtenidas por el uso de la fase G-100 y analizadas con la columna analítica Sephax SRT SEC-300 y el cromatógrafo Waters 1525. Ctr: control de fracción sin activación. Los volúmenes de las fracciones A1- B4 corresponden a 2 mL.

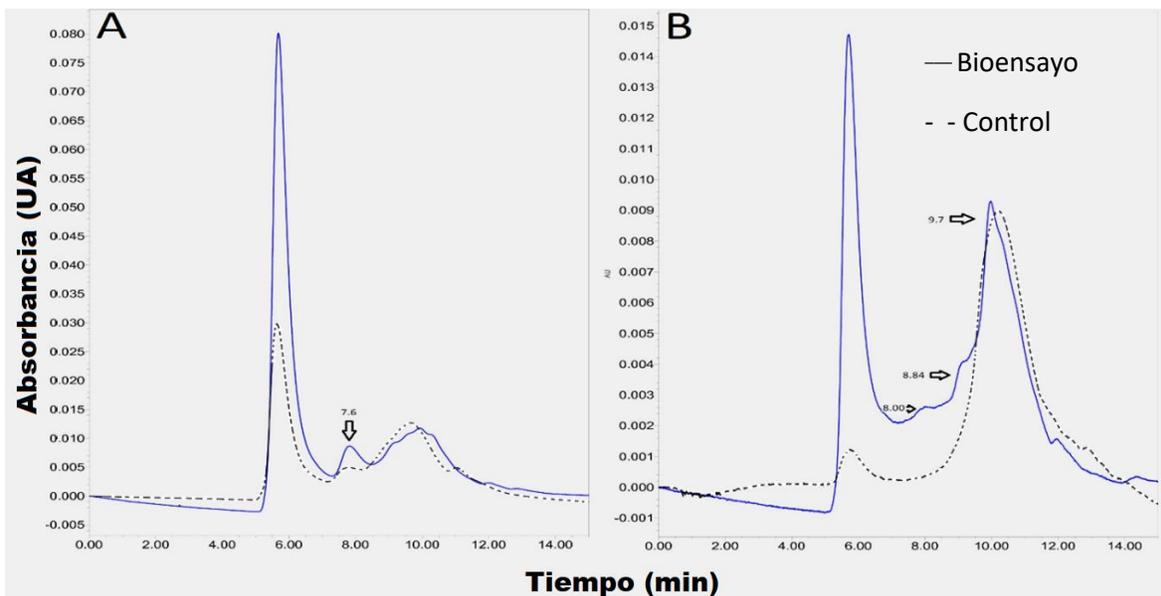


Figura 6.23. Cromatogramas de A) la fracción A1 (230 nm) y B) la fracción A2 (258.3 nm). Obtenidos por el uso de la columna Sephax SRT SEC-300 y el equipo Waters 1525. La línea continua muestra el análisis de la fracción obtenida en el bioensayo, la línea punteada muestra el control de fracción sin activación.

También, se realizó el análisis de las fracciones A1 a B4 empleando la columna Agilent Bio SEC-5 (0.5-150 kDa) usando la curva de calibración secundaria. Esta columna se empleó para la mejor determinación de componentes moleculares en el intervalo bajo de PM. En este análisis se demostró la presencia de componentes proteicos de un PM de 69.26 ± 3.59 (7.6 min), 41 kDa (8.16 min) y 26.7 ± 0.41 kDa (27.20 min), el cromatograma de la fracción A1 se muestra en la figura 6.24. Los PM de 69.26 y 26.69 pueden estar relacionados con la descripción de subunidades grandes y pequeñas; respectivamente, en el análisis de *di*-oxigenasas (Krivokok et al., 2003; Beilen y Witholt, 2007). El PM de 38.2 kDa se encuentra dentro del intervalo del componente molecular hallado en el análisis de los extractos crudos no fraccionados, 38.15 – 41.97 kDa describiendo una *di*-oxigenasa (Chemerys et al 2014).

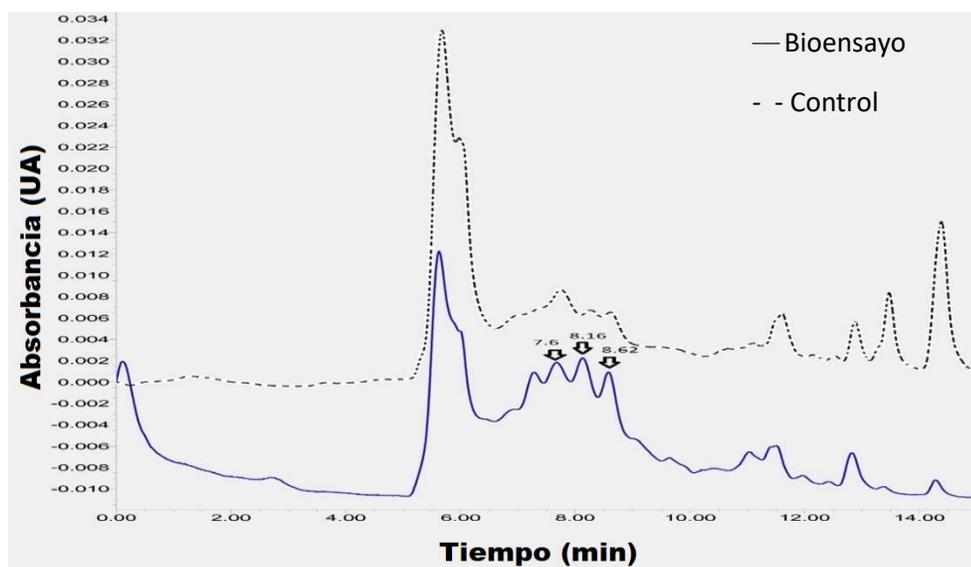


Figura 6.24. Cromatograma de la fracción A1. Obtenido por uso de la columna Agilent Bio SEC-5 (230 nm) y el equipo Waters 1525. La línea continua muestra el análisis de la fracción obtenida en el bioensayo, la línea punteada muestra el control de la fracción sin activación.

El histograma realizado con la columna Agilent Bio SEC-5 se muestra en la figura 6.25. En este se realizó el seguimiento de los PM 69.26 ± 3.59 , 41 ± 2.72 , 26.69 ± 0.41 ya mencionados y los componentes de bajo peso molecular de 6.2 ± 0.53 , 2.55 ± 0.61 y 0.76 ± 0.16 kDa. Resultando de interés aquellos que encajan con la descripción de *di*-oxigenasas conformadas por subunidades y diferentes componentes proteicos como se ha discutido previamente con el histograma construido con la columna Sephax SRT SEC-300. En este análisis se observaron varios de los componentes previamente contenidos en las fracciones A1 y A2, las cuales presentaron la formación del 4,5-*cis*-dB[a]P al realizar el ensayo de “evaluación de degradación”

con B[a]P. Igualmente, los componentes de bajo peso molecular pueden estar asociados al proceso de biodegradación como cofactores dentro de los intervalos de interés, 6.4 a 200 kDa, (Navarro-Llorens et al., 2005, Vandra et al., 2015). Además, tomando en consideración que el histograma muestra que algunos componentes proteicos desaparecen través de la elución de las fracciones, comportamiento también presente en la evaluación de degradación, evidencia una vez más la presencia de cofactores como donadores de electrones que posibilitan el proceso de biodegradación. Los cuales, al perderse en el proceso de filtración impiden que se efectuó la degradación.

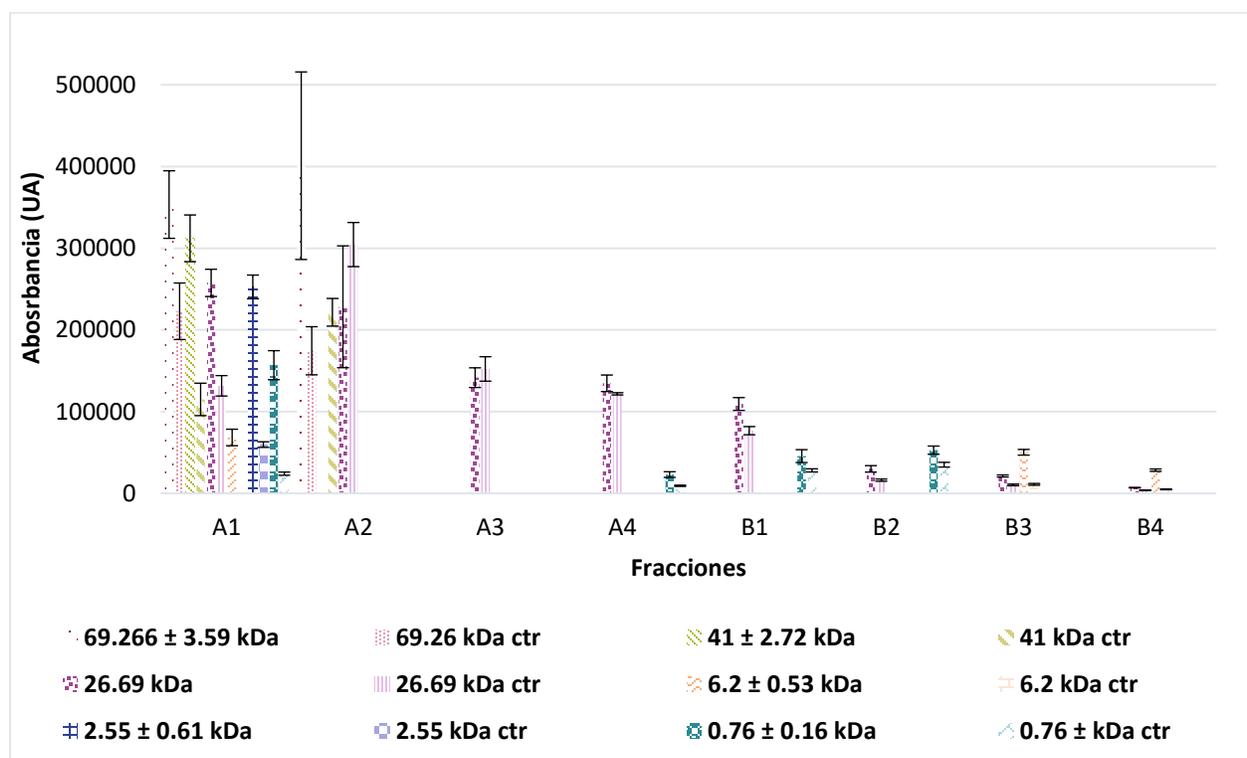


Figura 6.25. Histograma de las fracciones A1 a B4 del Extracto Crudo Intracelular obtenidas por el empleo de la fase G-100 y analizadas con la columna analítica Agilent Bio SEC-5 y el cromatógrafo Waters 1525. Ctr: control de fracción sin activación. Los volúmenes de las fracciones A1- B4 corresponden a 2 mL.

En la poca información encontrada en la literatura que aborda la degradación de HAP por microalgas, el B[a]P degradado por la microalga *S. capricornutum* es el modelo de estudio más usado siguiendo metabolitos como 4,5-, 7,8-, 9,10- y 11, 12 dB[a]P, algunos de ellos mostrados en este trabajo con isomería *cis* lo que hace evidente la presencia *di*-oxigenasas como se ha publicado en sistemas bacterianos (Warshawsky et al., 1995). Pero, la presencia de metabolitos *mono*- y *di*- hidroxilados podrían involucrar

distintas enzimas como *di*-oxigenasas y el sistema citocromo P-450 *mono*-oxigenasa en el mismo proceso de degradación de HAP (Ke et al., 2010) abriendo la posibilidad a la presencia de más de un sistema enzimático. Adicionalmente es interesante mencionar que en sistemas enzimáticos bacterianos degradadores de pesticidas, descritos por la unión de subunidades α (grandes) y β (pequeñas) se han encontrado componentes identificados como subunidades α que forman parte de oxigenasas con PM de 41.07 kDa (Hunold et al., 2021). Peso cercano al intervalo de $38.15 - 41.97 \pm 2.4$ kDa previamente descrito y observado en el análisis con la columna Agilent Bio SEC-5.

Un ejemplo más han sido las lacasas fúngicas descritas con un PM entre 50 kDa a 82 kDa en *Scytalidium thermophilum* que cuentan con enzimas homo triméricas con subunidades de 28 kDa degradantes de HAP (Younes y Sayadi, 2011). Otro modelo sería la bacteria *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1, que replicada por *E. coli* oxidó HAP de alto peso molecular con los componentes CYP150 (44.8 kDa) y PipA (48.7 kDa) adaptándose al sistema transportador de electrones presente (Brezna et al., 2006). En esta misma bacteria Kim y colaboradores (2004) determinaron un sistema multicomponente involucrado en la degradación de HAP y formado por: una catalasa-peroxidasa, una *mono*-oxigenasa, una subunidad pequeña de *di*-oxigenasa y una aldehído-deshidrogenasa. Por otra parte, la bacteria *Rhodococcus wratislaviensis* 9 ante pireno y B[a]P sobre produce enzimas degradadoras de 40.3 kDa probablemente involucrada en su degradación (Subashchandrabose et al., 2019). Otro sistema guía es la bacteria *Amycolatopsis tucumanensis* DSM 45259 que, ante naftaleno, fenantreno y pireno sintetizan diferentes proteínas en el intervalo de 6.4 a 200 kDa siendo de interés las de PM entre 39.72 a 71.35 kDa sugiriendo la presencia de oxigenasas hidroxilantes multicomponentes (Navarro-Llorens et al., 2005, Vandera et al., 2015). Finalmente, tomando en cuenta la proteína CYP108J1 y sus cofactores donadores de electrones, involucrados en el sistema de *mono*-oxigenasas del sistema citocromo P-450 degradador de HAP de bajo peso molecular y alto peso molecular se han publicado PM de interés de 52.3, 44.3 y 15 kDa (Luo et al., 2016). Considerando toda esta información y el componente de PM en el intervalo de $38.15 - 41.97 \pm 2.4$ kDa, este último puede ser una subunidad de un sistema multicomponente conformado por *di*-oxigenasas al encontrar metabolitos con configuración geométrica de tipo cis. El cual puede contar con adaptación a diferentes condiciones y cofactores donadores de electrones a través de las diferentes fracciones colectadas al presentar biodegradación o también, probablemente estas fracciones contienen más de un tipo de enzima.

Después de la evaluación de la biodegradación en la fracción A1 y A2 se realizó el nuevo fraccionamiento obteniendo así las subfracciones de A1a, A1b, A2a y A2b con la fase G-100. En estas subfracciones fue posible detectar la presencia del 4,5-*cis*-dB[a]P en A1a, A1b y A2a, aunque solo fue cuantificable en A1a (6.96 ± 0.29 ng). El posterior análisis de las subfracciones A1a, A1b y A2a por Cromatografía de Exclusión Molecular usando la columna Agilent Bio SEC-5 permitió observar una señal asociada a un $PM=82.73 \pm 3.15$ kDa que disminuye a través de la elución de estas. El seguimiento de la respuesta en presencia de este componente se muestra en la figura 6.26 a diferentes longitudes de onda.

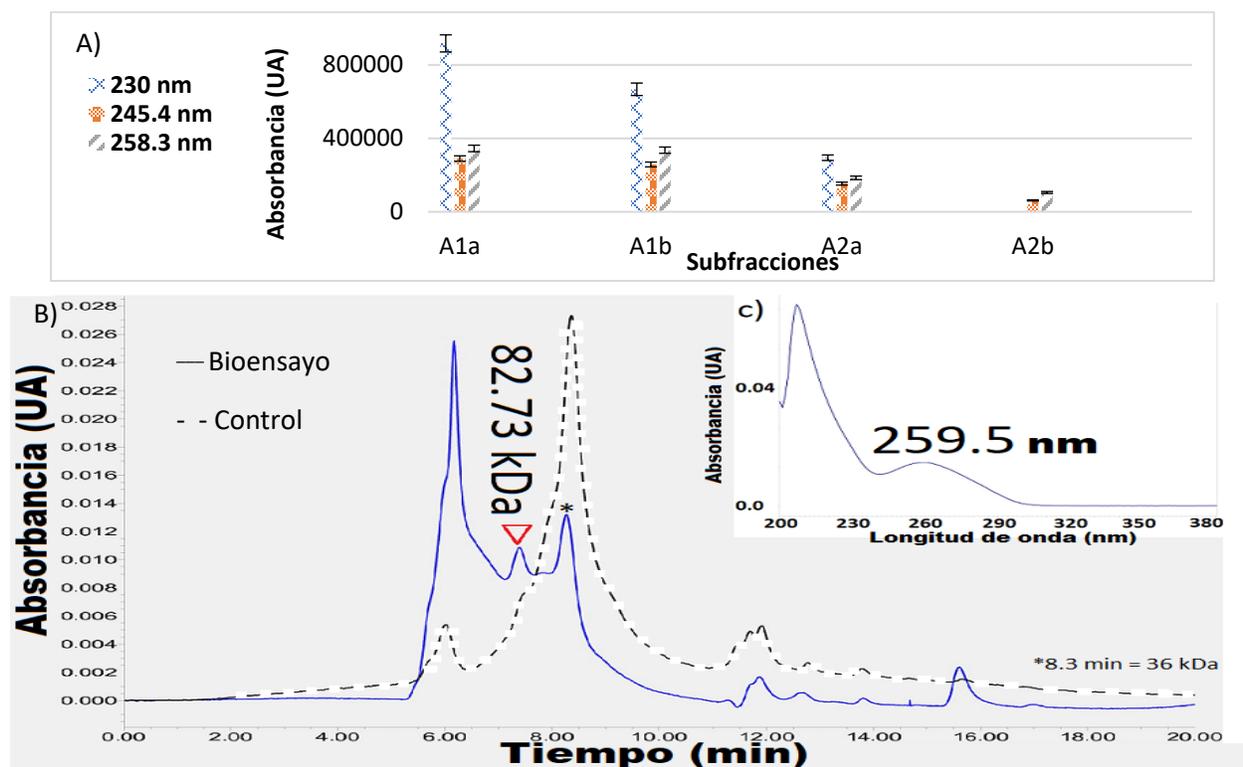


Figura 6.26. A) Histograma de las subfracciones A1a a A2b analizadas a diferentes longitudes de onda para seguimiento del Peso Molecular 82.73 kDa (7.41 min). B) Cromatograma (245.4 nm) obtenido del análisis de la fracción (A1b, 1 mL) realizado con el equipo Waters 1525 y la columna Agilent Bio Sec-5. La línea continua muestra el bioensayo, la línea punteada muestra el control. C) Espectro Ultravioleta de la señal de interés.

La disminución de este compuesto ($PM= 82.73 \pm 3.15$) a través de la elución de las fracciones A1a a A2b mostrada en el histograma de la figura podría ligarse a la inhibición de la biodegradación a causa del estrés por exposición a B[a]P afectando el sistema enzimático responsable, si bien la señal de seguimiento es mayor en la fracción A1a, la composición del cromatograma del bioensayo y control de la fracción A1b

permiten una mejor visualización del pico asociado al PM de 82.73 kDa. El pico correspondiente al PM se obtuvo a tres longitudes de onda 230, 245.4 y 258.3 y disminuyó. De esta misma manera, en el análisis realizado del pico a la derecha del compuesto de interés (8.3 min = 36 kDa) se observó un comportamiento inconstante entre fracciones lo que derivó en no poder realizar su seguimiento. Por último, el seguimiento del PM 82.73 kDa a 258.3 nm mostró una presencia estable entre fracciones permitiendo su seguimiento ya que se determinó coincidente su espectro Ultravioleta obteniendo un máximo a 259.5 nm. Un PM similar fue observado en el análisis del extracto crudo intracelular con la columna Sephax SRT SEC-300 (figura 6.21) que puede compararse con el sistema de degradación de *Mycobacterium sp. PYR-1* con el cual han publicado un PM de 81 kDa relacionado a un conjunto de 5 proteínas inducidas por pireno. Este conjunto de proteínas se asocia a una catalasa-peroxidasa por su N-aminoácido terminal, similar a lo observado en *Mycobacterium fortuitum* que involucra la participación de *di*-oxigenasas (Cerniglia, 2013). Es de importancia mencionar que en el análisis de las fracciones A1 a B4 del extracto crudo extracelular concentrado usando la columna Agilent Bio Sec-5, se observaron PM adicionales que contaron con una presencia inconsistente entre fracciones lo que derivó en no poder realizar su seguimiento.

Dado que el extracto crudo extracelular en su volumen reducido (2 mL) por centrifugación no mostró degradación de *B[a]P*, probablemente a causa de la separación de componentes que actúan en conjunto; se evaluó la recuperación de la biodegradación al juntar 7.5 mL de la fracción reducida del extracto crudo extracelular >30 kDa y 7.5 mL del filtrado obtenido al emplear 12 cultivos y su extracto crudo extracelular 30 kDa – 1.5 kDa. Al término del periodo de exposición al *B[a]P*, el análisis Extracción en Fase Sólida-Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución permitió la determinación del 4,5-*cis*-*dB[a]P*, cuantificándolo en 6.85 ± 0.03 ng, demostrando la separación de los componentes enzimáticos de la degradación por la filtración y que estos componentes solo degradan a los HAP al estar en conjunto. Es decir que el proceso de degradación depende de cofactores, donadores de electrones, como la ferredoxina que es una proteína soluble de hierro-azufre (Fe_2/S_2) con tamaños de 9.91 kDa a 22 kDa determinados por SDS-PAGE en microorganismos como la microalga *Chlamydomonas sp. UWO241* (Cvetkovska et al., 2018) o NADH, dinucleótido de nicotinamida y adenina que cuenta con la función de intercambiar electrones y protones en células vivas; componentes que permiten la biodegradación (Sauber et al., 1977; Enseley et al., 1981; Yeh et al., 1977; Haddock et al., 1993, Jouanneau et al., 2006). La separación de componentes enzimáticos por el efecto de la centrifugación exhaustiva se puede corroborar mediante la obtención de las fracciones extracto crudo intracelular (extracto crudo intracelular > 30 kDa y extracto crudo intracelular 30 kDa – 1.5 kDa) empleando la membrana centricon y posteriormente evaluando la biodegradación en las fracciones

por individual y en conjunto esperando un comportamiento similar.

6.2.11. Análisis de subfracciones de extractos crudos por electroforesis (SDS-PAGE) y descripción del perfil enzimático

La electroforesis (SDS-PAGE) de las subfracciones de A1a, A1b, A2a y A2b mostró una distribución de los componentes proteicos por sus masas aparentes; su concentración fue estimada por el empleo de la lisozima ($1 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$). El gel de electroforesis y las cantidades cuantificadas de proteína se encuentran en la figura 6.27.

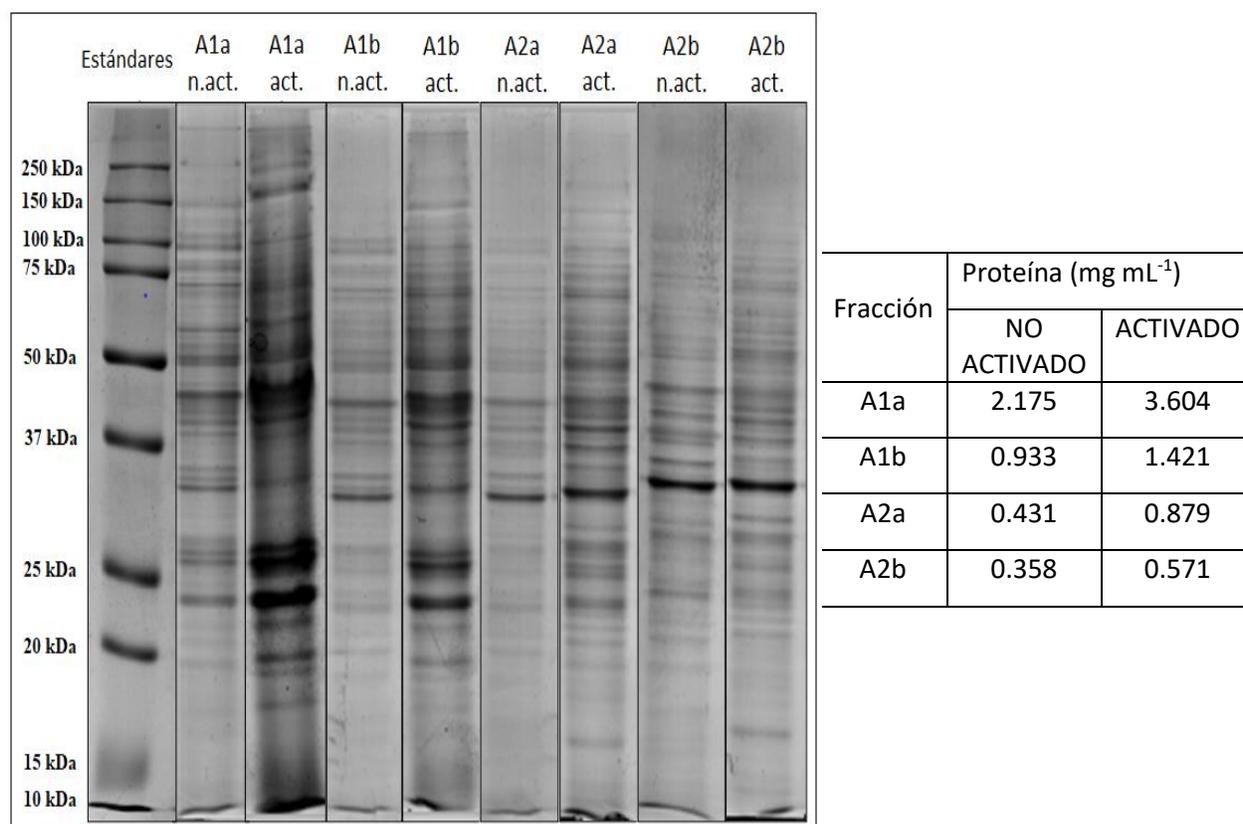


Figura 6.27. Gel de electroforesis SDS PAGE usado en el análisis de las subfracciones A1a a A2b (izq.). Comparación de las cantidades de proteína cuantificada en las subfracciones provenientes de cultivos activados y no activados por *B[a]P* (*der.*). n.act: no activados por *B[a]P* act: activados por *B[a]P*.

El análisis mostró una evidente sobreproducción de componentes proteicos de interés en todas las fracciones estudiadas después del proceso de activación de las células por exposición frente al *B[a]P*. La sobreproducción del material proteico en las fracciones se estimó mayor al 50%. Siendo la subfracción A1a la que presentó mayor cantidad de proteína sin importar que provinieran de cultivos activados o no. La

sobreproducción de componentes proteicos en las fracciones analizadas se asoció a la exposición a *B[a]P*, siendo esta última condición la diferencia entre ambos grupos.

El análisis de la subfracción A1a, con evidencia cuantificable de biodegradación manifestó tres zonas de interés con sobreproducción proteica en el intervalo de 18.6 a 26.2 kDa, 34.1 a 59.9 kDa y 68.3 a 250 kDa. Las concentraciones de los componentes moleculares individuales observados en este gel se presentan en el histograma de la figura 6.28, donde se corroboran PM previamente observados por el análisis por Cromatografía de Exclusión Molecular.

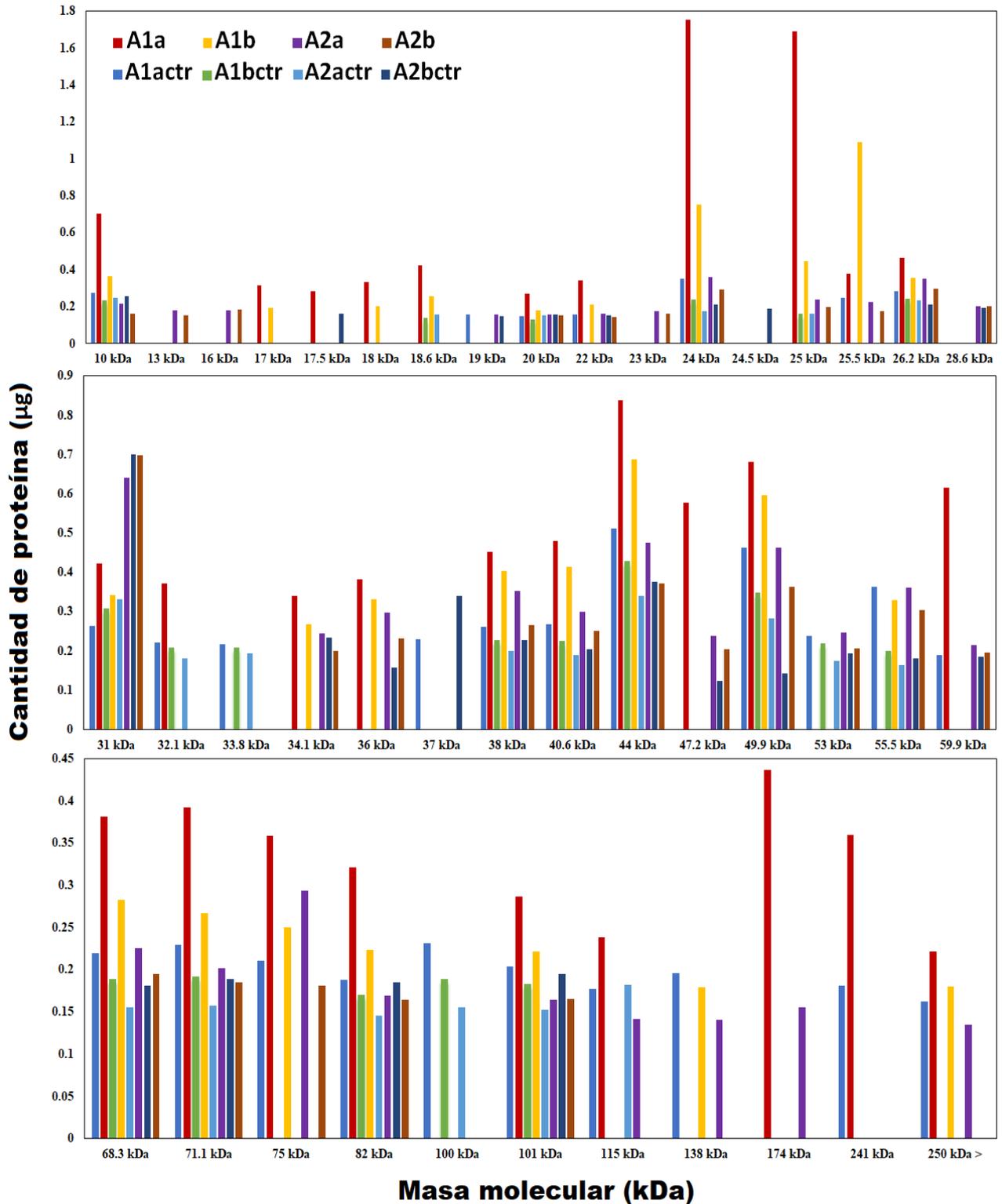


Figura 6.28. Histograma de las subfracciones A1a a A2b por electroforesis SDS PAGE. Seguimiento de las señales observadas en las fracciones obtenidas de cultivos activados con *B[a]P* (72 h) frente los controles, fracciones de cultivos sin activación.

El componente de PM = 38.15 - 41.97 kDa observado en los extractos crudos concentrados se observa en electroforesis mostrando dos componentes de PM aparente de 38 a 40.6 kDa. La sobreproducción del componente de PM = 82 kDa que pasó de 0.2 µg en fracciones provenientes de cultivos no activados a 0.35 µg en las fracciones con activación por exposición al *B[a]P* podría representar al componente de PM = 82.73 kDa observado en las fracciones A1a a A2b (Agilent Bio SEC-5) incluso al PM de 82 kDa previamente observado en las fracciones A1 a A4 del extracto crudo intracelular evaluadas con la columna Sephax SRT SEC-300 al realizar su fraccionamiento en búsqueda de diferencias proteicas como componentes posiblemente involucrados en el proceso de biodegradación. Adicionalmente al componente de 81 kDa relacionado con una catalasa peroxidasa por Cerniglia (2013), Kim y colaboradores (2004) describieron también una catalasa-peroxidasa de 80.9 - 85.2 kDa, una *mono*-oxigenasa de 21.9 kDa y subunidades pequeñas de *di*-oxigenasas de 18 - 19 kDa en cultivos de *Mycobacterium* involucradas en la degradación de HAP; PM. Siendo interesante observar que todos estos PM se sobre produjeron en la subfracción con actividad enzimática A1a, incluso en las subfracciones usadas en ensayos previos al análisis realizado con los extractos crudos concentrados.

La sobre producción de componentes con PM de 49.9 y 20 kDa muestra similitud a lo descrito por comportamientos Krivobok y colaboradores (2003) que publicaron la presencia de subunidades de *Mycobacterium di*-oxigenasas de tamaños de 52 y 20 kDa. Los PM entre 44 y 47.2 kDa son de interés al considerar su relación con el sistema *mono*-oxigenasa del sistema citocromo P-450 ya que se han encontrado PM de 44.3 kDa en cultivos de *Rhodococcus* y PM de 44.8 y 48.7 kDa en cultivos de *Mycobacterium* relacionados con un sistema enzimático degradador de HAP (Luo et., al 2016, Brezna et al., 2006). En la microalga verde *Chlorella*, utilizada en procesos de biodegradación de sitios contaminados se ha descrito la presencia de una dihidrolipoil acetiltransferasa de PM = 47,7 kDa (Subashchandrabose et al., 2017). Al considerar una amidohidrolasa de 40.3 kDa en cultivos de *Rhodococcus* asociada a la degradación de pireno y *B[a]P* aumenta el interés por el PM de 40.6 kDa que se sobre produce en las subfracciones A1a a A2b en el análisis del gel de electroforesis.

Finalmente, los PM 174 y 241 kDa observados en el análisis de las subfracciones de A1a y A2b por electroforesis y el PM 215.68 ± 5.34 kDa observado en el análisis de las fracciones del extracto crudo intracelular realizado con la columna Sephax SRT SEC-300 (con posible presencia en el análisis por electroforesis) podrían reflejar la unión de componentes enzimáticos, es decir subunidades grandes y

pequeñas de *di*-oxigenasas formando la estructura de *di*-oxigenasas que en conjunto con cofactores pueden contar con un tamaño similar al de las *di*-oxigenasas de *Sphingomonas* expuestas a *B[a]P* con un PM de 200 kDa (Jouanneau et al., 2006). Datos más recientes han mostrado que las enzimas y subunidades involucradas en la biodegradación de los HAP pueden abarcar el intervalo de 18 a 200 kDa (Méndez y García de Llasera, 2021). En la tabla 6.6. se muestran PM previamente observados en la literatura, que fueron encontrados en la evaluación de las fracciones y subfracciones a través del análisis por Cromatografía de Exclusión Molecular analítica y SDS-PAGE en este trabajo.

Tabla 6.6. Pesos moleculares observados en el análisis de las fracciones y subfracciones de los Extractos Crudos realizado por cromatografía de exclusión molecular analítica y electroforesis SDS PAGE.

PM observados (kDa)	P.M. publicados (kDa)	Tipo	Proteína y posible función (posible)	Referencia
Bajo peso molecular **	diversos	cofactores	Moléculas como ferredoxinas, coenzimas como NADH, proteínas de bajo peso molecular con núcleo de hierro-azufre además de flavoproteínas	Cerniglia 2013; Kanaly y Harayama, 2000; Cammack, 2012; Haddock et al., 1993
18-23**	18-19	<i>di</i> -oxigenasas	Subunidades de <i>di</i> -oxigenasas involucradas en la degradación de fenantreno y pireno por <i>Mycobacterium vanbaalenii</i> PYR-1	Kim et al., 2004
23.48 ± 0.09*	20	<i>di</i> -oxigenasas	Subunidades de <i>di</i> -oxigenasas involucradas en la degradación de pireno	Krivobok et al., 2003
	21.9	mono-oxigenasa	Involucrada en la degradación de pireno y fenantreno en <i>Mycobacterium vanbaalenii</i> PYR-1	Kim et al., 2004
	21.5 y 51	subfracciones β y α	Sistema enzimático multicomponente involucrado en la degradación de HAP en <i>Phenylobacterium immobile</i> E DSM 1986	Hunold et al., 2021
27.2 ± 0.41*	28-50	subfracciones	Subunidades de <i>di</i> -oxigenasas en sistemas en <i>Scytalidium</i>	Younes y Sayadi, 2011

PM observados (kDa)	P.M. publicados (kDa)	Tipo	Proteína y posible función (posible)	Referencia
			<i>thermophilum</i> presentes en la degradación de HAP	
-37.53 ± 0.22 *	37	di-oxigenasa	Hidroxilación del anillo aromático con DNA metalogénico bacteriano, <i>E. coli</i> .	Chemerys et al 2014
-38.15-41.97 ± 2.4*	40.3	amidohidrolasa	Degradación de HAP de alto peso molecular en <i>Rhodococcus sp. RHA1</i>	Subashchandabrose et al., 2019
-38.2 ± 2.72*	41.07	di-oxigenasa	Subunidad α que inserta átomos de oxígeno y provoca la ruptura del anillo aromático en <i>Phenylobacterium immobile E DSM 1986</i>	Hunold et al., 2021
44-47.2**	- 44.3	mono-oxigenasa citocromo P-450	Procesos de degradación de HAP de <i>Rhodococcus</i>	Luo et., al 2016
	- 44.8 y 48.7	CYP150 y PipA	- Enzimas con adaptación en el inicio del proceso de degradación frente diferentes sistemas transportadores de electrones de <i>Mycobacterium vanbaalenii</i> PYR-1	Brezna et al., 2006
	- 47.7	di-hidrolipoil acetiltransferasa	Útil en la biodegradación en sitios contaminados empleando la microalga verde <i>Chlorella spp. MM3</i>	Subashchandrabose et al., 2017
	- 47.7	DLAT. gi 302837029	Componente del piruvato deshidrogenasa de <i>Micractinium pusillum</i>	Li et al., 2012
	- 50 kDa	di-oxigenasas	Subunidades de di-oxigenasas involucradas en la degradación de pireno	Krivobok et al., 2003
	- 52.3, 44.3 y 15	CYP108J1	Sistema mono-oxigenasa del sistema citocromo P-450 involucrado en la degradación	Luo et al., 2016

PM observados (kDa)	P.M. publicados (kDa)	Tipo	Proteína y posible función (posible)	Referencia
			de HAP de alto y bajo peso molecular, necesitando la presencia de cofactores como donadores de electrones	
91.1 ± 29.3*	82	lacasas	Inducción de la formación de <i>di</i> -oxigenasas en <i>Scytalidium thermophilum</i>	Younes y Sayadi, 2011
82.73 ± 3.15*	80.9-85.2	catlasa- peroxidasa	Involucrada en el sistema de degradación de pireno y fenantreno en especies de <i>Mycobacterium vanbaalenii</i> <i>PYR-1</i>	Kim et al., 2004
82**	81	catlasa-peroxidasa	- Con la presencia de pireno, se induce la formación de un conjunto de 5 proteínas relacionadas a la presencia de <i>di</i> -oxigenasas	Cerniglia, 2003
287.5 ± 3.54* >174 **	200	<i>di</i> -oxigenasa	Hidroxilación del anillo aromático, enzima proveniente de <i>Sphingomonas</i> <i>CHY-1</i> por exposición a <i>B[a]P</i> formando un hexámero en <i>Mycobacterium</i> <i>sp. PYR-1</i>	Jouanneau et al., 2006
*: PM observados a través de la metodología en Cromatografía de Exclusión Molecular				
**: PM observados a través de la metodología SDS- PAGE				

Como se puede observar los PM encontrados al realizar el análisis por la metodología Cromatografía de Exclusión Molecular y la metodología SDS-PAGE pudieron reflejar la presencia de sistemas enzimáticos previamente observados en microorganismos involucrados en el proceso de degradación de HAP tanto de alto como bajo PM. El reconocimiento de diversos PM en los extractos crudos muestra que la microalga *S. capricornutum* cuenta con un sistema enzimático multicomponente involucrando diferentes tipos de sistemas que convergen en el proceso de degradación de HAP. Basado en las evidencias de componentes presentes de 20 kDa y 50 kDa (Krivobok et al., 2003; Hunold et al., 2021) se podrían estar observando subunidades α y β de *di*-oxigenasas.

La variedad de los componentes encontrados en las fracciones de análisis apuntó a contar con la presencia de más de un sistema enzimático dirigido a la degradación de HAP, ya que los PM alrededor de 80 kDa se han asociado a distintos sistemas precursores de *di*-oxigenasas (Younes y Sayadi, 2011; Kim et al., 2004) además de los PM alrededor de 50 kDa que han descrito la presencia de *mono*-oxigenasas del sistema citocromo P-450 (Luo et al., 2016). La biodegradación presente en las subfracciones podría hablar de un sistema inducido ante la presencia de contaminantes y la composición del medio como los procesos fúngicos observados en la degradación de *B[a]A* (Sun et al., 2020) y también la adaptación a diferentes donadores de electrones (Brezna et al., 2006). La acumulación de bajo peso molecular podría estar mostrando la presencia de cofactores que como se han observado son indispensables en el seguimiento de la degradación al proveer de electrones el proceso (Cammack, 1992; Cerniglia, 1993; Kanaly y Harayama 2000).

7. CONCLUSIONES

Se determinó por primera vez en extractos crudos y fraccionados de las microalgas *Scenedesmus acutus* y *Selenastrum capricornutum* el proceso de biodegradación de *B[a]A* y *B[a]P*. Este logro permitió dar seguimiento a componentes enzimáticos de diverso peso molecular y así describir el desarrollo de la degradación de hidrocarburos de alto peso molecular en etapas iniciales.

Los PM de 40 kDa y 104 kDa obtenidos en los ensayos preliminares acotaron la investigación a la determinación de un sistema enzimático multicomponente con la posible presencia de subunidades de *di*-oxigenasas. Además, el espectro de adsorción del componente con PM de 40 kDa concordó con los usados en la caracterización de la protocatecuato 3,4-*di*-oxigenasa de *Pseudomonas aeruginosa*. Por otra parte, es posible que en los componentes aislados se observará la conformación completa del sistema al contar con componentes de PM aproximado a 200 kDa.

Gracias a la determinación y análisis de los metabolitos en etapas tempranas del proceso de biodegradación se corroboró su configuración geométrica del tipo “*cis*”, ya que con los cultivos de *Selenastrum capricornutum* expuestos a *B[a]P* por 6 h, se logró la identificación del *cis*- 4,5- y 7,8- *dB[a]P*. Esta importante información condujo a señalar la presencia de *di*-oxigenasas como responsables de la biodegradación de HAP, usándolos como fuente de carbono. Proceso similar al ya descrito por la literatura en sistemas bacterianos.

Es importante mencionar que el proceso de activación de los cultivos y la evaluación de la biodegradación en los extractos crudos debe abordarse como un proceso conjunto debido a la nula degradación en extractos crudos provenientes de cultivos no activados. El proceso activación-evaluación de la biodegradación permitió evaluar la presencia de componentes proteicos degradadores en el extracto crudo intracelular usando periodos de 3 h y procedentes de cultivos de *S. capricornutum* activados por exposición al *B[a]P* en un periodo de 72 h.

El fraccionamiento de los extractos crudos de *Selenastrum capricornutum* con capacidad de degradar HAP de alto peso molecular presentado por primera vez en este trabajo, permitió la descripción de componentes moleculares que involucran la presencia de un sistema multicomponente ya que los pesos moleculares observados ajustan a la descripción de diversos sistemas enzimáticos observados en

ambientes acuáticos, cianobacterias y microalgas. Por ejemplo, los componentes de 20 kDa y 50 kDa pueden ser subunidades α y β de *di*-oxigenasas; respectivamente. Por otra parte, los componentes alrededor de 37 kDa pueden evidenciar *di*-oxigenasas hidroxilantes del anillo aromático. Finalmente, los componentes con PM aparente de 80-91 kDa pueden exponer precursores de *di*-oxigenasas, mientras los de PM de 50 kDa pueden explicar la presencia de *mono*-oxigenasas del sistema citocromo P-450.

Cabe señalar que el requerimiento de tiempos extensos para la evaluación del proceso activación-evaluación de la biodegradación en extracto crudo intracelular de *S. acutus* no permitió el estudio de su perfil proteico al no poder determinar la degradación en los extractos, pero se logró evidenciar que probablemente sucede a través del propio mecanismo presente en *S. capricornutum* ante la presencia de los mismos metabolitos de degradación. La evaluación del sistema enzimático presente en *S. acutus* puede ser acotada con exposiciones al *B[a]A* al requerir menos tiempo para su biodegradación en comparación con exposiciones frente al *B[a]P*.

8. PERSPECTIVA

La sospecha de la presencia de componentes enzimáticos abordada en este trabajo por estudio de sus pesos moleculares puede ser disipada al continuar la investigación con técnicas cromatográficas y espectrometría de masas, entre otras técnicas, para su análisis e identificación.

La presencia del mismo sistema enzimático en las microalgas utilizadas, frente a los HAP de estudio, se puede corroborar por bioensayos que empleen procesos de activación por exposición a uno de los dos HAP, (*B[a]A* o *B[a]P*), para proceder con la evaluación de biodegradación en los extractos crudos obtenidos por uso del HAP contrario en el proceso activación, evidenciando la aparición de ambos grupos de metabolitos y la continuación de la biodegradación.

9. REFERENCIAS

- Abdel-Shafy, H. I., & Mansour, M. S. M. (2016). A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum*. Egyptian Petroleum Research Institute 25 (1), 107-123. <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2015.03.011>
- Abril, G. A., Amarillo, A. C., Mateos, A. C., Diez, S. C., Wannaz, E. D., Pignata, M. L., & Carreras, H. A. (2022). Exposure to atmospheric particle-bound Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the vicinity of two cement plants in Córdoba, Argentina. *Microchemical Journal*, 177 (1), 1-9. <https://doi.org/10.1016/J.MICROC.2022.107271>
- Acevedo, F., Pizzul, L., Castillo, M. del P., Cuevas, R., & Diez, M. C. (2011). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the Chilean white-rot fungus *Anthraco-phyl-lum discolor*. *Journal of Hazardous Materials*, 185(1), 212–219. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.09.020>
- Agrawal, P. K., Shrivastava, R., & Verma, J. (2018). Bioremediation approaches for degradation and detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Emerging and Eco-Friendly Approaches for Waste Management*, Ch 6, 99–119. https://doi.org/10.1007/978-981-10-8669-4_6
- Alegbeleye, O. O., Opeolu, B. O., & Jackson, V. A. (2017). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: A Critical Review of Environmental Occurrence and Bioremediation. *Environmental Management* 2017, 60(4), 758–783. <https://doi.org/10.1007/S00267-017-0896-2>
- Allegrini, F., Olivieri, A. C. (2014). IUPAC-consistent approach to the limit of detection in partial least-squares calibration. *Analytical Chemistry*, 86 (15), 7858–7866. https://doi.org/10.1021/AC501786U/SUPPL_FILE/AC501786U_SI_001.ZIP
- Arey, J., & Atkinson, R. (2003). Photochemical Reactions of PAHs in the Atmosphere. *PAHs: An Ecotoxicological Perspective*, Ch 4, 47–63. <https://doi.org/10.1002/0470867132.CH4>
- Arun, A., & Eyini, M. (2011). Comparative studies on lignin and polycyclic aromatic hydrocarbons degradation by basidiomycetes fungi. *Bioresource Technology*, 102(17), 8063–8070. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.05.077>
- Azuola R., Vargas P., 2007. Extracción de sustancias asistida por ultrasonido (EUA) | Revista Tecnología en Marcha. (n.d.). Retrieved March 14, 2022, from https://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec_marcha/article/view/449
- Baek, K. H., Kim, H. S., Oh, H. M., Yoon, B. D., Kim, J., Lee, I. S. (2011). Effects of Crude Oil, Oil Components, and Bioremediation on Plant Growth, 39 (9), 2465–2472. <https://doi.org/10.1081/ESE-200026309>
- Battisti, C., Girelli, A. M., & Tarola, A. M. (2014). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in yogurt samples, 8(1), 50–55. <https://doi.org/10.1080/19393210.2014.968880>
- Bergmeyer H, (1974). *Methods of Enzymatic Analysis V2* - Google Libros. (n.d.). Retrieved March 14, 2022, from https://books.google.com.mx/books?id=OOy4tyLB4uEC&printsec=frontcover&dq=Methods+of+Enzymatic+Analysis&hl=es-419&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=Methods of Enzymatic Analysis
- Bilińska, L., Blus, K., Gmurek, M., & Ledakowicz, S. (2019). Coupling of electrocoagulation and ozone treatment for textile wastewater reuse. *Chemical Engineering Journal*, 358, 992–1001. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.10.093>
- Birungi, Z. S., & Chirwa, E. M. N. (2015). The adsorption potential and recovery of thallium using green micro-algae from eutrophic water sources. *Journal of Hazardous Materials*, 299, 67–77. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2015.06.011>
- Björck, Å. (1990). Least squares methods. *Handbook of Numerical Analysis*, 1, 465–652. [https://doi.org/10.1016/S1570-8659\(05\)80036-5](https://doi.org/10.1016/S1570-8659(05)80036-5)
- Boopathy, R. (2017). Anaerobic Degradation of Petroleum Hydrocarbons in Sediments. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Solid Waste Management*, Ch 20, 475–490. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63664-5.00020-4>
- Bosma, R., Van Spronsen, W. A., Tramper, J., & Wijffels, R. H. (2003). Ultrasound, a new separation technique to harvest microalgae. *Journal of Applied Phycology* 2003, 15(2), 143–153. <https://doi.org/10.1023/A:1023807011027>
- Bourguignon, N., Irazusta, V., Isaac, P., Estévez, C., Maizel, D., Ferrero, M. A. (2019). Identification of proteins induced by polycyclic aromatic hydrocarbon and proposal of the phenanthrene catabolic pathway in *Amycolatopsis tucumanensis* DSM 45259. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 175, 19–28. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2019.02.071>
- Brezinski, K., & Gorczyca, B. (2019). An overview of the uses of high-performance size exclusion chromatography (HPSEC) in the characterization of natural organic matter (NOM) in potable water, and ion-exchange applications. *Chemosphere*. Elsevier Ltd, 217, 122-139 <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.028>

- Brezna, B., Kweon, O., Stingley, R. L., Freeman, J. P., Khan, A. A., Polek, B., Cerniglia, C. E. (2006). Molecular characterization of cytochrome P450 genes in the polycyclic aromatic hydrocarbon degrading *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(4), 522–532. <https://doi.org/10.1007/S00253-005-0190-8>
- Bugg, T., Foght, J. M., Pickard, M. A., & Gray, M. R. (2000). Uptake and Active Efflux of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* LP6a. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(12), 5387-5392. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.12.5387-5392.2000>
- Bumpus, J. A. (1989). Biodegradation of polycyclic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(1), 154-158. <https://doi.org/10.1128/aem.55.1.154-158.1989>
- Cajthaml, T., Möder, M., Kačer, P., Šašek, V., & Popp, P. (2002). Study of fungal degradation products of polycyclic aromatic hydrocarbons using gas chromatography with ion trap mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A*, 974(1–2), 213–222. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00904-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00904-4)
- Camacho-Morales, R., García-Fontana, C., Fernández-Irigoyen, J., Santamaría, E., González-López, J., Manzanera, M., & Aranda, E. (2018). Anthracene drives sub-cellular proteome-wide alterations in the degradative system of *Penicillium oxalicum*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 159, 127–135. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2018.04.051>
- Cammack, R. (1992). Iron—Sulfur Clusters in Enzymes: Themes and Variations. *Advances in Inorganic Chemistry*, 38(C), 281–322. [https://doi.org/10.1016/S0898-8838\(08\)60066-5](https://doi.org/10.1016/S0898-8838(08)60066-5)
- Carratt, S. A., Hartog, M., Buchholz, B. A., Kuhn, E. A., Collette, N. M., Ding, X., & Van Winkle, L. S. (2019). Naphthalene genotoxicity: DNA adducts in primate and mouse airway explants. *Toxicology Letters*, 305, 103–109. <https://doi.org/10.1016/J.TOXLET.2019.01.009>
- Cerniglia, C. E. (2003). Recent Advances in the Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Species. *The Utilization of Bioremediation to Reduce Soil Contamination: Problems and Solutions*, Ch 2, 51–73. https://doi.org/10.1007/978-94-010-0131-1_4
- Cerniglia, C. E. (1993). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology*, 4(3), 331–338. [https://doi.org/10.1016/0958-1669\(93\)90104-5](https://doi.org/10.1016/0958-1669(93)90104-5)
- Cerniglia, C. E., White, G. L., & Heflich, R. H. (1985). Fungal metabolism and detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Archives of Microbiology* 1985, 143(2), 105–110. <https://doi.org/10.1007/BF00411031>
- Cerniglia CE, Heitkamp MA: 1989. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in the aquatic environment. In Varanasi U, ed, *Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment*. CRC, Boca Raton, FL, USA, pp 41–68.
- Cerniglia CE, Baalen CV, Gibson DT: 1980. Metabolism of naphthalene by the cyanobacteria *Oscillatoria* sp., strain JCM. *J Gen Microbiol* 116: 485–
- Chan, S. M. N., Luan, T., Wong, M. H., & Tam, N. F. Y. (2006). Removal and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Selenastrum capricornutum*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(7), 1772–1779. <https://doi.org/10.1897/05-354R.1>
- Chen, H., Diao, X., & Zhou, H. (2018). Tissue-specific metabolic responses of the pearl oyster *Pinctada martensii* exposed to benzo[a]pyrene. *Marine Pollution Bulletin*, 131, 17–21. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.03.057>
- Chen, T., Zhou, Y., Ng, I. S., Yang, C. S., & Wang, H. Y. (2015). Formation and characterization of extracellular polymeric substance from *Shewanella xiamenensis* BC01 under calcium stimulation. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 57, 175–181. <https://doi.org/10.1016/J.JTICE.2015.05.031>
- CHURCHWELL, M., TWADDLE, N., MEEKER, L., & DOERGE, D. (2005). Improving LC–MS sensitivity through increases in chromatographic performance: Comparisons of UPLC–ES/MS/MS to HPLC–ES/MS/MS. *Journal of Chromatography B*, 825(2), 134–143. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.05.037>
- Cromlab (2022). Extracción en Fase Sólida EFS-SPE. (n.d.). Retrieved March 14, 2022, from http://www.cromlab.es/efs_principal.html
- Cvetkovska, M., Szyszka-Mroz, B., Possmayer, M., Pittock, P., Lajoie, G., Smith, D. R., & Hüner, N. P. A. (2018). Characterization of photosynthetic ferredoxin from the Antarctic alga *Chlamydomonas* sp. UWO241 reveals novel features of cold adaptation. *New Phytologist*, 219(2), 588–604. <https://doi.org/10.1111/NPH.15194>
- Da Silva, M., Esposito, E., Moody, J. D., Canhos, V. P., & Cerniglia, C. E. (2004). Metabolism of aromatic hydrocarbons by the filamentous fungus *Cylothrium* sp. *Chemosphere*, 57(8), 943–952. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2004.07.051>
- Deka, P., Medhi, C., Bhuyan, P., Gope, M., Balachandran, S., & Rafiqul Hoque, R. (2022). Understanding exposure risks of women and children to PAHs in biomass using households of Brahmaputra valley. *Journal of Air Pollution and Health*, 7(1), 33-50. <https://doi.org/10.18502/JAPH.V7I1.8918>

- Dey, S., & Rathod, V. K. (2013). Ultrasound assisted extraction of β -carotene from *Spirulina platensis*. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(1), 271–276. <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2012.05.010>
- Dissanayake, A., & Bamber, S. D. (2010). Monitoring PAH contamination in the field (Southwest Iberian Peninsula): Biomonitoring using fluorescence spectrophotometry and physiological assessments in the shore crab *Carcinus maenas* (L.) (Crustacea: Decapoda). *Marine Environmental Research*, 70(1), 65–72. <https://doi.org/10.1016/J.MARENRES.2010.03.003>
- Domínguez, J. J. A., Inoue, C., & Chien, M. F. (2020). Hydroponic approach to assess rhizodegradation by sudangrass (*Sorghum x drummondii*) reveals pH- and plant age-dependent variability in bacterial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Journal of Hazardous Materials* 387, 1-11. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2019.121695>
- Du, J., Liu, J., Jia, T., & Chai, B. (2022). The relationships between soil physicochemical properties, bacterial communities, and polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations in soils proximal to coking plants. *Environmental Pollution*, 298, 1-10. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2022.118823>
- Environment Canada (2007). Biological test method: growth inhibition test using a freshwater alga - Canada.ca. (n.d.). Retrieved March 14, 2022, from <https://www.canada.ca/en/environment-climate-change/services/wildlife-research-landscape-science/biological-test-method-publications/growth-inhibition-test-freshwater-alga.html>
- Fanali, L. Z., Franco-Belussi, L., Bonini-Domingos, C. R., & de Oliveira, C. (2018). Effects of benzo[a]pyrene on the blood and liver of *Physalaemus cuvieri* and *Leptodactylus fuscus* (Anura: Leptodactylidae). *Environmental Pollution*, 237, 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.02.030>
- Fasano, E., Yebra-Pimentel, I., Martínez-Carballo, E., & Simal-Gándara, J. (2016). Profiling, distribution and levels of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in traditional smoked plant and animal foods. *Food Control*, 59, 581–590. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2015.06.036>
- Fritsche, W., & Hofrichter, M. (2008). Aerobic Degradation by Microorganisms. *Biotechnology: Second, Completely Revised Edition*, Ch 6, 144–167. <https://doi.org/10.1002/9783527620999.CH6M>
- Fujisawa, H., & Hayaishi, O. (1968). Protocatechuate 3,4-Dioxygenase. *Journal of Biological Chemistry*, 243(10), 2673–2681. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)93425-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)93425-3)
- García de Llasera, M. P., Olmos-Espejel, J. de J., Díaz-Flores, G., & Montaña-Montiel, A. (2016). Biodegradation of benzo(a)pyrene by two freshwater microalgae *Selenastrum capricornutum* and *Scenedesmus acutus*: a comparative study useful for bioremediation. *Environmental Science and Pollution Research International*, 23(4), 3365–3375. <https://doi.org/10.1007/S11356-015-5576-2>
- García de Llasera, M. P., 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. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2017.01.011>
- García de Llasera, M. P., Fuentes Pérez, A. C., Peralta Marín, G., & Beltrán Calva, E. G. (2022). First evidence of extracellular enzymatic degradation of benzo(a)pyrene by the phytoplankton species *Selenastrum capricornutum* and the influence of temperature. *Environmental Advances*, 8, 1-10. <https://doi.org/10.1016/J.ENVADV.2022.100246>
- Gao, J., & Chi, J. (2015). Biodegradation of phthalate acid esters by different marine microalgal species. *Marine Pollution Bulletin*, 99(1–2), 70–75. <https://doi.org/10.1016/J.MARPOLBUL.2015.07.061>
- Gaur, N., Narasimhulu, K., & PydiSetty, Y. (2018). Recent advances in the bioremediation of persistent organic pollutants and its effect on environment. *Journal of Cleaner Production*, 198, 1602–1631. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2018.07.076>
- Gerde, J. A., Montalbo-Lombay, M., Yao, L., Grewell, D., & Wang, T. (2012). Evaluation of microalgae cell disruption by ultrasonic treatment. *Bioresource Technology*, 125, 175–181. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2012.08.110>
- Ghosal, D., Ghosh, S., Dutta, T. K., & Ahn, Y. (2016). Current state of knowledge in microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. *Frontiers in Microbiology*. *Frontiers Media S.A.*, 7, 1-27 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01369>
- Gianfreda, L., Xu, F., & Bollag, J. M. (1999). Laccases: A useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediation Journal*, 3(1), 1–25. <https://doi.org/10.1080/10889869991219163>
- Gibson, D. T., Mahadevan, V., Jerina, D. M., Yagi, H., & Yeh, H. J. C. (1975). Oxidation of the Carcinogens Benzo[a]pyrene and Benzo[a]anthracene to Dihydrodiols by a Bacterium. *Science*, 189(4199), 295–297. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1145203>
- Giovanella, P., Vieira, G. A. L., Ramos Otero, I. V., Pais Pellizzer, E., de Jesus Fontes, B., & Sette, L. D. (2020). Metal and organic pollutants bioremediation by extremophile microorganisms. *Journal of Hazardous Materials*. Elsevier B.V., 382, 1-14 <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121024>

- Gojkovic, Ž., Garbayo, I., Ariza, J. L. G., Márová, I., & Vilchez, C. (2015). Selenium bioaccumulation and toxicity in cultures of green microalgae. *Algal Research*, 7, 106–116. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2014.12.008>
- Gorovtsov, A., Demin, K., Sushkova, S., Minkina, T., Grigoryeva, T., Dudnikova, T., Barbashev, A., Semenov, I., Romanova, V., Laikov, A., Rajput, V., & Kocharovskaya, Y. (2022). The effect of combined pollution by PAHs and heavy metals on the topsoil microbial communities of Spolic Technosols of the lake Atamanskoe, Southern Russia. *Environmental Geochemistry and Health*, 44(4), 1299–1315. <https://doi.org/10.1007/S10653-021-01059-X/TABLES/4>
- Graupner, A., Instanes, C., Dertinger, S. D., Andersen, J. M., Lindeman, B., Rongved, T. D., ... Olsen, A. K. (2014). Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE) and Pig-a mutation assay in vivo - tools for genotoxicity testing from a regulatory perspective: a study of benzo[a]pyrene in Ogg1-/- mice. *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 772, 34-41. <https://doi.org/10.1016/J.MRGENTOX.2014.07.010>
- Greene, L. V., Elzey, B., Franklin, M., & Fakayode, S. O. (2017). Analyses of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) and chiral-PAH analogues-methyl- β -cyclodextrin guest-host inclusion complexes by fluorescence spectrophotometry and multivariate regression analysis. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 174, 316–325. <https://doi.org/10.1016/J.SAA.2016.11.047>
- Grice, K., Schouten, S., Peters, K. E., & Sinninghe Damsté, J. S. (1998). Molecular isotopic characterisation of hydrocarbon biomarkers in Palaeocene–Eocene evaporitic, lacustrine source rocks from the Jiangnan Basin, China. *Organic Geochemistry*, 29(5–7), 1745–1764. [https://doi.org/10.1016/S0146-6380\(98\)00075-8](https://doi.org/10.1016/S0146-6380(98)00075-8)
- Gu, D., Xiang, X., Wu, Y., Zeng, J., & Lin, X. (2022). Synergy between fungi and bacteria promotes polycyclic aromatic hydrocarbon cometabolism in lignin-amended soil. *Journal of Hazardous Materials*, 425, 1-9. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2021.127958>
- Guntupalli, S., Thunuguntla, V. B. S. C., Chalasani, L. M., Rao, C. V., & Bondili, J. S. (2019). Degradation and Metabolite Profiling of Benz (a) Anthracene, Dibenz (a, h) Anthracene and Indeno [1, 2, 3-cd] Pyrene by *Aspergillus terricola*. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 39(1), 84–92. <https://doi.org/10.1080/10406638.2016.1262878>
- Gupta, S., Pathak, B., Fulekar, M. H. (2014). Molecular approaches for biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon compounds: a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 14 (2), 241–269. <https://doi.org/10.1007/S11157-014-9353-3>
- Haemmerli, S. D., Leisola, M. S. A., Sanglard, D., & Fiechter, A. (1986). Oxidation of benzo(a)pyrene by extracellular ligninases of *Phanerochaete chrysosporium*. Veratryl alcohol and stability of ligninase. *Journal of Biological Chemistry*, 261(15), 6900–6903. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)62701-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)62701-8)
- Haddock, J. D., Nadim, L. M., & Gibson, D. T. (1993). Oxidation of biphenyl by a multicomponent enzyme system from *Pseudomonas* sp. strain LB400. *Journal of Bacteriology*, 175(2), 395-400. <https://doi.org/10.1128/JB.175.2.395-400.1993>
- Hao, H., Wu, M., Chen, Y., Tang, J., & Wu, Q. (2004). Cavitation mechanism in cyanobacterial growth inhibition by ultrasonic irradiation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 33(3–4), 151–156. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2003.09.003>
- Harayama, S., Timmis, K.N., 1992. Aerobic biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. In: Sigel, H., Sigel, A. (Eds.), *Metal Ions in Biological Systems*. 28. Marcel Dekker, New York, pp. 99–156.
- Haritash, A. K., Kaushik, C. P. (2009). Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials* 169 (1–3), 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.03.137>
- Hassanshahian, M., Abarian, M., Cappello, S. (2015). Biodegradation of Aromatic Compounds. *Biodegradation and Bioremediation of Polluted Systems - New Advances and Technologies*, Ch6, 109-123. <https://doi.org/10.5772/60894>
- He, Y., & Lee, H. K. (1998). Trace analysis by combined use of off-line solid-phase extraction, on-column sample focusing and U-shape flow cell in capillary liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 808(1–2), 79–86. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00126-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00126-5)
- Heitkamp, M. A., Freeman, J. P., Miller, D. W., & Cerniglia, C. E. (1988). Pyrene degradation by a *Mycobacterium* sp.: identification of ring oxidation and ring fission products. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(10), 2556–2565. <https://doi.org/10.1128/AEM.54.10.2556-2565.1988>
- Heitkamp, M. A., Franklin, W., & Cerniglia, C. E. (1988). Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: isolation and characterization of a pyrene-degrading bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(10), 2549–2555. <https://doi.org/10.1128/AEM.54.10.2549-2555.1988>
- Hernández Blanco, F. J., & García de Llasera, M. P. (2016). Monitoring dihydrodiol polyaromatic hydrocarbon metabolites produced by the freshwater microalgae *Selenastrum capricornutum*. *Chemosphere*, 158, 80-90. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.05.065>
- Hofrichter, M., Scheibner, K., Schneega, I., & Fritsche, W. (1998). Enzymatic combustion of aromatic and aliphatic compounds by manganese peroxidase from *Nematoloma frowardii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(2), 399–404. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.2.399-404.1998>/ASSET/DBCF6-BC07-45DD-B1FC-B30395CD192B/ASSETS/GRAPHIC/AM0281254005.JPG

- Hou, Y., Liu, Z., Zhao, Y., Chen, S., Zheng, Y., & Chen, F. (2016). CAH1 and CAH2 as key enzymes required for high bicarbonate tolerance of a novel microalga *Dunaliella salina* HTBS. *Enzyme and Microbial Technology*, 87–88, 17–23. <https://doi.org/10.1016/J.ENZMICTEC.2016.02.010>
- Hunold, A., Escobedo-Hinojosa, W., Potoudis, E., Resende, D., Farr, T., Syrén, P. O., & Hauer, B. (2021). Assembly of a Rieske non-heme iron oxygenase multicomponent system from *Phenylobacterium immobile* E DSM 1986 enables pyrazon cis dihydroxylation in *E. coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(5), 2003–2015. <https://doi.org/10.1007/S00253-021-11129-W>
- Houessou, J. K., Maloug, S., Leveque, A. S., Delteil, C., Heyd, B., & Camel, V. (2007). Effect of Roasting Conditions on the Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Content in Ground Arabica Coffee and Coffee Brew. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(23), 9719–9726. <https://doi.org/10.1021/JF071745S>
- IUPAC a- column chromatography (C01182). (n.d.). Retrieved March 14, 2022, from <https://goldbook.iupac.org/terms/view/C01182>
- Janson, J. C. (2011). *Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications: Third Edition*. Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications: Third Edition, 1–517. <https://doi.org/10.1002/9780470939932>
- Jia, C., Liu, · Changfeng, Gong, Z., Li, · Xiaojun, & Ni, Z. (2022). Differences in the properties of extracellular polymeric substances responsible for PAH degradation isolated from *Mycobacterium gilvum* SN12 grown on pyrene and benzo[a]pyrene. *Archives of Microbiology*, 204(4), 1–17. <https://doi.org/10.1007/S00203-022-02849-2>
- Jones, M. D., Singleton, D. R., Carstensen, D. P., Powell, S. N., Swanson, J. S., Pfaender, F. K., & Aitken, M. D. (2008). Effect of incubation conditions on the enrichment of pyrene-degrading bacteria identified by stable-isotope probing in an aged, PAH-contaminated soil. *Microbial Ecology*, 56(2), 341–349. <https://doi.org/10.1007/S00248-007-9352-9/FIGURES/4>
- Jouanneau, Y., Meyer, C., Jakoncic, J., Stojanoff, V., & Gaillard, J. (2006). Characterization of a naphthalene dioxygenase endowed with an exceptionally broad substrate specificity toward polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biochemistry*, 45(40), 12380–12391. https://doi.org/10.1021/BI0611311/ASSET/IMAGES/BI0611311.SOCIAL.JPEG_V03
- Joyce, E. M., Wu, X., & Mason, T. J. (2010). Effect of ultrasonic frequency and power on algae suspensions, 45(7), 863–866. <https://doi.org/10.1080/10934521003709065>
- Juhasz, A. L., & Naidu, R. (2000). Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: A review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *International Biodeterioration and Biodegradation*. Elsevier Science Ltd, 45 (1-2), 57-88. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(00\)00052-4](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(00)00052-4)
- Kadri, T., Rouissi, T., Kaur Brar, S., Cledon, M., Sarma, S., & Verma, M. (2017). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by fungal enzymes: A review. *Journal of Environmental Sciences*, 51, 52–74. <https://doi.org/10.1016/J.JES.2016.08.023>
- Kanally, R. A., & Harayama, S. (2010). Advances in the field of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation by bacteria. *Microbial Biotechnology*, 3(2), 136–164. <https://doi.org/10.1111/J.1751-7915.2009.00130.X>
- Kang, H. J., Lee, S. Y., & Kwon, J. H. (2016). Physico-chemical properties and toxicity of alkylated polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Hazardous Materials*, 312, 200–207. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2016.03.051>
- Kapdan, I. K., & Kargi, F. (2006). Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme and Microbial Technology*, 38(5), 569–582. <https://doi.org/10.1016/J.ENZMICTEC.2005.09.015>
- Ke, L., Luo, L., Wang, P., Luan, T., & Tam, N. F. Y. (2010). Effects of metals on biosorption and biodegradation of mixed polycyclic aromatic hydrocarbons by a freshwater green alga *Selenastrum capricornutum*. *Bioresource Technology* 101 (18), 6950–6961. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2010.04.011>
- Kelley, I., Freeman, J. P., & Cerniglia, C. E. (1990). Identification of metabolites from degradation of naphthalene by a *Mycobacterium* sp. *Biodegradation* 1(4), 283–290. <https://doi.org/10.1007/BF00119765>
- Khan, A. A., Wang, R. F. U., Cao, W. W., Doerge, D. R., Wennerstrom, D., Cerniglia, C. E. (2001). Molecular Cloning, Nucleotide Sequence, and Expression of Genes Encoding a Polycyclic Aromatic Ring Dioxygenase from *Mycobacterium* sp. Strain PYR-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (8), 3577–3585. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.8.3577-3585.2001>
- Kim, S. J., Jones, R. C., Cha, C. J., Kweon, O., Edmondson, R. D., & Cerniglia, C. E. (2004). Identification of proteins induced by polycyclic aromatic hydrocarbon in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and de novo sequencing methods. *Proteomics*, 4(12), 3899–3908. <https://doi.org/10.1002/PMIC.200400872>
- Kim, S. J., Kweon, O., Jones, R. C., Edmondson, R. D., & Cerniglia, C. E. (2008). Genomic analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Biodegradation* 2008, 19(6), 859–881. <https://doi.org/10.1007/S10532-008-9189-Z>

- Kong, Q., Zhu, L., & Shen, X. (2010). The toxicity of naphthalene to marine *Chlorella vulgaris* under different nutrient conditions. *Journal of Hazardous Materials*, 178(1–3), 282–286. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2010.01.074>
- Koukkou, A.-I., & Vandra, E. (2011). Hydrocarbon-degrading Soil Bacteria: Current Research. *Microbial Bioremediation of Non-Metals: Current Research*, 93–117.
- Krivobok, S., Kuony, S., Meyer, C., Louwagie, M., Willison, J. C., & Jouanneau, Y. (2003). Identification of pyrene-induced proteins in *Mycobacterium* sp. strain 6PY1: evidence for two ring-hydroxylating dioxygenases. *Journal of Bacteriology*, 185(13), 3828–3841. <https://doi.org/10.1128/JB.185.13.3828-3841.2003>
- Kweon, O., Kim, S.-J., & Cerniglia, C. E. (2010). Genomic View of Mycobacterial High Molecular Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, 1165–1178. https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4_81
- Lecina, M., Sanchez, B., Solà, C., Prat, J., Roldán, M., Hernández, M., Cairó, J. J. (2017). Structural changes of *Arthrospira* sp. after low energy sonication treatment for microalgae harvesting: Elucidating key parameters to detect the rupture of gas vesicles. *Bioresource Technology*, 223, 98–104. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2016.10.030>
- Lee, S. E., Seo, J. S., Keum, Y. S., Lee, K. J., Li, Q. X. (2007). Fluoranthene metabolism and associated proteins in *Mycobacterium* sp. JS14. *PROTEOMICS*, 7 (12), 2059–2069. <https://doi.org/10.1002/PMIC.200600489>
- Lei, A. P., Wong, Y. S., & Tam, N. F. Yee. (2003). Pyrene-induced changes of glutathione-S-transferase activities in different microalgal species. *Chemosphere*, 50(3), 293–301. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00499-X](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00499-X)
- Lei, A. P., Hu, Z. L., Wong, Y. S., & Tam, N. F. Y. (2007). Removal of fluoranthene and pyrene by different microalgal species. *Bioresource Technology*, 98(2), 273–280. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2006.01.012>
- Li, Y., Sun, N., Hu, X., Li, Y., & Deng, C. (2019). Recent advances in nanoporous materials as sample preparation techniques for peptidome research. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. Elsevier B.V., 120, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115658>
- Li, Y., Fei, X., Deng, X. (2012). Novel molecular insights into nitrogen starvation-induced triacylglycerols accumulation revealed by differential gene expression analysis in green algae *Micractinium pusillum*. *Biomass and Bioenergy*, 42, 199–211. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMBIOE.2012.03.010>
- Lin, H. Y., Shih, C. Y., Liu, H. C., Chang, J., Chen, Y. L., Chen, Y. R., Lin, H. T., Chang, Y. Y., Hsu, C. H., & Lin, H. J. (2013). Identification and Characterization of an Extracellular Alkaline Phosphatase in the Marine Diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Marine Biotechnology*, 15(4), 425–436. <https://doi.org/10.1007/S10126-013-9494-3/FIGURES/10>
- Lin, M., Ning, X. an, An, T., Zhang, J., Chen, C., Ke, Y., ... Liu, J. (2016). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in textile dyeing sludge with ultrasound and Fenton processes: Effect of system parameters and synergistic effect study. *Journal of Hazardous Materials*, 307, 7–16. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2015.12.047>
- Lindquist, B., Warshawsky, D. (1985). Identification of the 11,12-dihydro-11,12-dihydroxybenzo(a)pyrene as a major metabolite produced by the green alga, *Selenastrum capricornutum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 130 (1), 71–75. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(85\)90383-3](https://doi.org/10.1016/0006-291X(85)90383-3)
- Lu, H., Wang, W., Li, F., & Zhu, L. (2019). Mixed-surfactant-enhanced phytoremediation of PAHs in soil: Bioavailability of PAHs and responses of microbial community structure. *Science of The Total Environment*, 653, 658–666. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2018.10.385>
- Luo, L., Wang, P., Lin, L., Luan, T., Ke, L., Tam, N. F. Y. (2014). Removal and transformation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons in water by live and dead microalgae. *Process Biochemistry*, 49 (10), 1723–1732. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2014.06.026>
- Luo, A., Wu, Y. R., Xu, Y., Kan, J., Qiao, J., Liang, L., Hu, Z. (2016). Characterization of a cytochrome P450 monooxygenase capable of high molecular weight PAHs oxidization from *Rhodococcus* sp. P14. *Process Biochemistry*, 51(12), 2127–2133. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2016.07.024>
- Luo, J., Deng, J., Cui, L., Chang, P., Dai, X., Yang, C., Li, N., Ren, Z., Zhang, X. (2020). The potential assessment of green alga *Chlamydomonas reinhardtii* CC-503 in the biodegradation of benz(a)anthracene and the related mechanism analysis. *Chemosphere*, 249, 1–9. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2020.126097>
- Lyu, Y., Zheng, W., Zheng, T., Tian, Y. (2014). Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by *Novosphingobium pentaromativorans* US6-1. *PLOS ONE* 9 (7), e101438. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0101438>
- Mager Stellman, D., Warshaw, L., Brabant, C., principales John Finklea, R., Jacqueline Messite, P., Coppée. (2001). *Gestión editorial Chantal Dufresne, M. (n.d.). ENCICLOPEDIA DE SALUD Y SEGURIDAD EN EL TRABA*

- Martínez-Toledo, Á., del Carmen Cuevas-Díaz, M., Guzmán-López, O., López-Luna, J., & Ilizaliturri-Hernández, C. (2022). Evaluation of in situ biosurfactant production by inoculum of *P. putida* and nutrient addition for the removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from aged oil-polluted soil. *Biodegradation*, 33(2), 135–155. <https://doi.org/10.1007/S10532-022-09973-2>
- Masfaraud, J. F., Pfohl-Leszkowic, A., Malaveille, C., Keith, G., Monod, G. (1992). 7-ethylresorufin O-deethylase activity and level of DNA-adducts in trout treated with benzo(a)pyrene. *Marine Environmental Research* 34 (1–4), 351–354. [https://doi.org/10.1016/0141-1136\(92\)90133-7](https://doi.org/10.1016/0141-1136(92)90133-7)
- Méndez García, M., & García de Llasera, M. P. (2021). A review on the enzymes and metabolites identified by mass spectrometry from bacteria and microalgae involved in the degradation of high molecular weight PAHs. *Science of the Total Environment*, 797, 1-25. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2021.149035>
- Mohtashami, M., Fooladi, J., Haddad-Mashadrizeh, A., & Housaindokht, M. (2019). Molecular cloning, expression, and characterization of *poxa1b* gene from *Pleurotus ostreatus*. *Molecular Biology Reports*, 46(1), 981–990. <https://doi.org/10.1007/S11033-018-4555-3>
- Moody, J. D., Freeman, J. P., Cerniglia, C. E. (2005). Degradation of benz[a]anthracene by *Mycobacterium vanbaalenii* strain PYR-1, 16 (6), 513–526. <https://doi.org/10.1007/S10532-004-7217-1>
- Moradi, M., Hung, H., Li, J., Park, R., Shin, C., Alexandrou, N., Iqbal, M. A., Takhar, M., Chan, A., & Brook, J. R. (2022). Assessment of Alkylated and Unsubstituted Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Air in Urban and Semi-Urban Areas in Toronto, Canada. *Environmental Science and Technology*, 56(5), 2959–2967. <https://doi.org/10.1021/ACS.EST.1C04299>
- Mori, T., Watanabe, M., Taura, H., Kuno, T., Kamei, I., & Kondo, R. (2015). Degradation of chlorinated dioxins and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and remediation of PAH-contaminated soil by the entomopathogenic fungus, *Cordyceps militaris*. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 3(4), 2317–2322. <https://doi.org/10.1016/J.JECE.2015.08.020>
- Myint Zaw, M., Poorahong, S., Kanatharana, P., Thavarungkul, P., Thammakhet-Buranachai, C. (2022). A simple gelatin aerogel tablet sorbent for the effective vortex assisted solid phase extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from tea samples. *Food Chemistry* 383, 1-9. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2022.132388>
- Navarro-Llorens, J. M., Patrauchan, M. A., Stewart, G. R., Davies, J. E., Eltis, L. D., Mohn, W. W. (2005). Phenylacetate catabolism in *Rhodococcus* sp. strain RHA1: A central pathway for degradation of aromatic compounds. *Journal of Bacteriology* 187 (13), 4497–4504. <https://doi.org/10.1128/JB.187.13.4497-4504.2005>
- National Cancer Institute (U.S.). Division of Cancer Etiology. Chemical and Physical Carcinogenesis Branch., NCI Chemical Carcinogen Reference Standard Repository (Kansas City, M., & Midwest Research Institute (Kansas City, M. (1993). Handbook of analytical and spectral data for polycyclic aromatic hydrocarbons.
- Newman (2014). *Fundamentals of Ecotoxicology: The Science of Pollution*, Fourth Edition - Michael C. Newman - Google Libros. (n.d.). Retrieved March 14, 2022, from https://books.google.com/cu/books?id=mGnSBQAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- Olmos-Espejel, J. J., García de Llasera, M. P., & 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. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.09.015>
- Onopiuk, A., Kołodziejczak, K., Marcinkowska-Lesiak, M., & Poltorak, A. (2022). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons using different extraction methods and HPLC-FLD detection in smoked and grilled meat products. *Food Chemistry*, 373 (B), 1-7. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2021.131506>
- Ortiz de Montellano, P.R., (1995). *Cytochrome P-450. Structure, Mechanism and Biochemistry*. Plenum Press, New York. <https://ci.nii.ac.jp/naid/10012816138>.
- Otto, B., Beuchel, C., Liers, C., Reisser, W., Harms, H., & Schlosser, D. (2015). Laccase-like enzyme activities from chlorophycean green algae with potential for bioconversion of phenolic pollutants. *FEMS Microbiology Letters*, 362(11), 1-8. <https://doi.org/10.1093/FEMSLE/FNV072>
- Pathak, B., Gupta, S., Verma, R. (2018). Biosorption and Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) by Microalgae. *Ch* 7, 215–247. https://doi.org/10.1007/978-3-319-92111-2_7
- Paz, A., Chalima, A., & Topakas, E. (2021). Biorefinery of exhausted olive pomace through the production of polygalacturonases and omega-3 fatty acids by *Cryptocodium cohnii*. *Algal Research*, 59, 1-8. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2021.102470>
- Pena, M. T., Casais, M. C., Mejuto, M. C., & Cela, R. (2008). Development of a matrix solid-phase dispersion method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge samples. *Analytica Chimica Acta*, 626(2), 155–165. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2008.07.053>

- Qin, W., Fan, F. Q., Zhu, Y., Wang, Y., Liu, X., Ding, A., & Dou, J. (2017). Comparative proteomic analysis and characterization of benzo(a)pyrene removal by *Microbacterium* sp. strain M. CSW3 under denitrifying conditions. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 40(12), 1825–1838. <https://doi.org/10.1007/s00449-017-1836-5>
- Rivas, J., Gimeno, O., de la Calle, R. G., Portela, J. R., & de la Ossa, E. M. (2009). Remediation of PAH spiked soils: Concentrated H₂O₂ treatment/continuous hot water extraction–oxidation. *Journal of Hazardous Materials*, 168(2–3), 1359–1365. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2009.03.017>
- Ren, X., Pan, L., Wang, L. (2015). Toxic effects upon exposure to benzo[a]pyrene in juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 39 (1), 194–207. <https://doi.org/10.1016/J.ETAP.2014.08.006>
- Rojo, F. (2010). Enzymes for Aerobic Degradation of Alkanes. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, 781–797. https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4_59
- Sauber, K., Fröhner, C., Rosenberg, G., Eberspächer, J., Lingens, F. (1977). Purification and Properties of Pyrazon Dioxygenase from Pyrazon-Degrading Bacteria. *European Journal of Biochemistry*, 74 (1), 89–97. <https://doi.org/10.1111/J.1432-1033.1977.TB11370.X>
- Sánchez-Brunete, C., Miguel, E., & Tadeo, J. L. (2007). Analysis of 27 polycyclic aromatic hydrocarbons by matrix solid-phase dispersion and isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry in sewage sludge from the Spanish area of Madrid. *Journal of Chromatography A*, 1148(2), 219–227. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2007.03.026>
- Santonicola, S., Albrizio, S., Murru, N., Ferrante, M. C.; Mercogliano, R. (2017). Study on the occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons in milk and meat/fish-based baby food available in Italy. *Chemosphere*, 184, 467–472. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2017.06.017>
- Sayara, T., Pognani, M., Sarrà, M., & Sánchez, A. (2010). Anaerobic degradation of PAHs in soil: Impacts of concentration and amendment stability on the PAHs degradation and biogas production. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 64(4), 286–292. <https://doi.org/10.1016/J.IBIOD.2010.02.005>
- Schneider, J., Grosser, R., Jayasimhulu, K., Xue, W., & Warshawsky, D. (1996). Degradation of pyrene, benz[a]anthracene, and benzo[a]pyrene by *Mycobacterium* sp. strain RJGII-135, isolated from a former coal gasification site. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(1), 13–19. <https://doi.org/10.1128/aem.62.1.13-19.1996>
- Schoeny, R., Cody, T., Warshawsky, D., & Radike, M. (1988). Metabolism of mutagenic polycyclic aromatic hydrocarbons by photosynthetic algal species. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 197(2), 289–302. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(88\)90099-1](https://doi.org/10.1016/0027-5107(88)90099-1)
- Schnell, S., Chappell, M. J., Evans, N. D., & Roussel, M. R. (2006). The mechanism distinguishability problem in biochemical kinetics: The single-enzyme, single-substrate reaction as a case study. *Comptes Rendus - Biologies*, 329(1), 51–61. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2005.09.005>
- Stashenko E., Martínez J. R., Castrillón J. (2014). Aplicación del método de dispersión de matriz en fase sólida al aislamiento de hidrocarburos de rocas bituminosas. (n.d.). Retrieved March 14, 2022, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-02832014000100002
- Shen, C., Miao, J., Li, Y., Pan, L. (2016). Effect of benzo[a]pyrene on detoxification and the activity of antioxidant enzymes of marine microalgae. *Journal of Ocean University of China* 2016, 15 (2), 303–310. <https://doi.org/10.1007/S11802-016-2771-9>
- Sillapawisut, S., Bunkoed, O., Llompart, M., & Nurerk, P. (2022). In-syringe solid-phase extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons using an iron–carboxylate metal–organic framework and hypercrosslinked polymer composite gelatin cryogel–modified cellulose acetate adsorbent. *Microchimica Acta*, 189(4), 1–10. <https://doi.org/10.1007/S00604-022-05276-8>
- Simon, R. D. (1974). The use of an ultrasonic bath to disrupt cells suspended in volumes of less than 100 μ liters. *Analytical Biochemistry*, 60(1), 51–58. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(74\)90130-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(74)90130-4)
- Simpson, N. J. K. (2000). *Solid-Phase Extraction: Principles, Techniques, and Applications*. <https://doi.org/10.1201/9780367802653>
- Sriprapat, W., & Thiravetyan, P. (2016). Efficacy of ornamental plants for benzene removal from contaminated air and water: Effect of plant associated bacteria. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 113, 262–268. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.03.001>
- Srivastava, S., & Kumar, M. (2019). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A sustainable approach. In *Sustainable Green Technologies for Environmental Management*, Ch 6, 111–139. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2772-8_6
- Srogi, K. (2007). Monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 5(4), 169–195. <https://doi.org/10.1007/S10311-007-0095-0>

- Steffen, K. T., Hatakka, A., & Hofrichter, M. (2003). Degradation of benzo[a]pyrene by the litter-decomposing basidiomycete *Stropharia coronilla*: Role of manganese peroxidase. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(7), 3957–3964. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.7.3957-3964.2003>
- Subashchandrabose, S. R., Logeshwaran, P., Venkateswarlu, K., Naidu, R., & Megharaj, M. (2017). Pyrene degradation by *Chlorella* sp. MM3 in liquid medium and soil slurry: Possible role of dihydrolipoamide acetyltransferase in pyrene biodegradation. *Algal Research*, 23, 223–232. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2017.02.010>
- Subashchandrabose, S. R., Venkateswarlu, K., Naidu, R., & Megharaj, M. (2019). Biodegradation of high-molecular weight PAHs by *Rhodococcus wratislaviensis* strain 9: Overexpression of amidohydrolase induced by pyrene and BaP. *Science of The Total Environment*, 651, 813–821. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2018.09.192>
- Suenaga, H., Koyama, Y., Miyakoshi, M., Miyazaki, R., Yano, H., Sota, M., ... Miyazaki, K. (2009). Novel organization of aromatic degradation pathway genes in a microbial community as revealed by metagenomic analysis, 3(12), 1335–1348. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.76>
- Sun, Y., Liu, L., Zeng, J., Wu, Y., Lin, X. (2020). Enhanced cometabolism of benzo(a)anthracene by the lignin monomer vanillate is related to structural and functional responses of the soil microbiome. *Soil Biology and Biochemistry* 149, 1-10. <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2020.107908>
- Sutherland, J. B., Freeman, J. P., Selby, A. L., Fu, P. P., Miller, D. W., Cerniglia, C. E. (1990). Stereoselective formation of a K-region dihydrodiol from phenanthrene by *Streptomyces flavovirens*. *Archives of Microbiology* 154 3, 260–266. <https://doi.org/10.1007/BF00248965>
- Syed, K., Porollo, A., Lam, Y. W., Grimmett, P. E., Yadav, J. S. (2013). CYP63A2, a catalytically versatile fungal P450 monooxygenase capable of oxidizing higher-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons, alkylphenols, and alkanes. *Applied and Environmental Microbiology* 79 (8), 2692–2702. https://doi.org/10.1128/AEM.03767-12/SUPPL_FILE/ZAM999104309S01.PDF
- Syed, K., Yadav, J. S. (2012). P450 monooxygenases (P450ome) of the model white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. <http://dx.doi.org/10.3109/1040841X.2012.682050> 38 (4), 339–363. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2012.682050>
- Talano, M. A., Busso, D. C., Paisio, C. E., González, P. S., Purro, S. A., Medina, M. I., & Agostini, E. (2012). Phytoremediation of 2,4-dichlorophenol using wild type and transgenic tobacco plants. *Environmental Science and Pollution Research*, 19(6), 2202–2211. <https://doi.org/10.1007/S11356-011-0724-9/FIGURES/6>
- Tammen, H., Peck, A., Budde, P., & Zucht, H. D. (2007). Peptidomics analysis of human blood specimens for biomarker of discovery. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. Taylor & Francis, 7 (5), 605-613 <https://doi.org/10.1586/14737159.7.5.605>
- Tang, J., Wu, Q., Hao, H., Chen, Y., & Wu, M. (2003). Growth inhibition of the cyanobacterium *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* by 1.7 MHz ultrasonic irradiation. *Journal of Applied Phycology*, 15(1), 37–43. <https://doi.org/10.1023/A:1022946807082>
- Teng, C., Wu, S., & Gong, G. (2019). Bio-removal of phenanthrene, 9-fluorenone and anthracene-9,10-dione by laccase from *Aspergillus niger* in waste cooking oils. *Food Control*, 105, 219–225. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.06.015>
- Timmins, M., Thomas-Hall, S. R., Darling, A., Zhang, E., Hankamer, B., Marx, U. C., & Schenk, P. M. (2009). Phylogenetic and molecular analysis of hydrogen-producing green algae. *Journal of Experimental Botany*, 60(6), 1691. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERP052>
- Tong, Y., Li, S., Wu, Y., Guo, J., Zhou, B., Zhou, Q., Jiang, L., Niu, J., Zhang, Y., Liu, H., Yuan, S., Huang, S., & Zhan, Y. (2022). Graphene oxide modified magnetic polyamidoamide dendrimers based magnetic solid phase extraction for sensitive measurement of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chemosphere*, 296, 1-8. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2022.134009>
- Tomar, R. S., & Jajoo, A. (2021). Enzymatic pathway involved in the degradation of fluoranthene by microalgae *Chlorella vulgaris*. *Ecotoxicology*, 30(2), 268–276. <https://doi.org/10.1007/S10646-020-02334-W/TABLES/2>
- Van Beilen, J. B., & Funhoff, E. G. (2007). Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(1), 13–21. <https://doi.org/10.1007/S00253-006-0748-0>
- Vandera, E., Samiotaki, M., Parapouli, M., Panayotou, G., & Koukkou, A. I. (2015). Comparative proteomic analysis of *Arthrobacter phenanthrenivorans* Sph3 on phenanthrene, phthalate and glucose. *Journal of Proteomics*, 113, 73–89. <https://doi.org/10.1016/J.JPROT.2014.08.018>
- Vila, J., & Grifoll, M. (2009). Actions of *Mycobacterium* sp. Strain AP1 on the Saturated- and Aromatic-Hydrocarbon Fractions of Fuel Oil in a Marine Medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(19), 6232-6239. <https://doi.org/10.1128/AEM.02726-08>
- Vyas, B. R. M., Bakowski, S., Šašek, V., & Matucha, M. (1994). Degradation of anthracene by selected white rot fungi. *FEMS Microbiology Ecology*, 14(1), 65–70. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6941.1994.TB00091.X>

- Wagrowski, D. M., & Hites, R. A. (1997). Polycyclic aromatic hydrocarbon accumulation in urban, suburban, and rural vegetation. *Environmental Science and Technology*, 31(1), 279–282. <https://doi.org/10.1021/es960419i>
- Wang, W., Wang, L., & Shao, Z. (2018). Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) degradation pathways of the obligate marine PAH degrader *Cycloclasticus* sp. strain P1. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(21), 1-15. <https://doi.org/10.1128/AEM.01261-18>
- Warshawsky, D., Cody, T., Radike, M., Reilman, R., Schumann, B., LaDow, K., & Schneider, J. (1995). Biotransformation of benzo[a]pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic analogs by several green algae and other algal species under gold and white light. *Chemico-Biological Interactions*, 97(2), 131–148. [https://doi.org/10.1016/0009-2797\(95\)03610-X](https://doi.org/10.1016/0009-2797(95)03610-X)
- Wu, X., Joyce, E. M., & Mason, T. J. (2011). The effects of ultrasound on cyanobacteria. *Harmful Algae*, 10(6), 738–743. <https://doi.org/10.1016/J.HAL.2011.06.005>
- Xu, T., Liu, T., Jiang, D., Yuan, Z., & Jia, X. (2021). Attainment and characterization of a microbial consortium that efficiently degrades biphenyl and related substances. *Biochemical Engineering Journal*, 173, 1-9. <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2021.108073>
- Yeh, W. K., Gibson, D. T., & Liu, T. N. (1977). Toluene dioxygenase: A multicomponent enzyme system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 78(1), 401–410. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(77\)91268-2](https://doi.org/10.1016/0006-291X(77)91268-2)
- Yong, S. K., Lim, B. H., Saleh, S., & Tey, L. H. (2016). Optimisation, purification and characterisation of extracellular lipase from *Botryococcus sudeticus* (UTEX 2629). *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 126, 99–105. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCATB.2016.02.004>
- Younes, S.; Sayadi, S. (2011). Purification and characterization of a novel trimeric and thermotolerant laccase produced from the ascomycete *Scytalidium thermophilum* strain. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 73(1–4), 35–42. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCATB.2011.07.014>
- Yuan, F., Yang, C., & Zhong, P. (2015). Cell membrane deformation and bioeffects produced by tandem bubble-induced jetting flow. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(51), 1-9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1518679112>
- Zhang, G., Zhang, P., Wang, B., & Liu, H. (2006). Ultrasonic frequency effects on the removal of *Microcystis aeruginosa*. *Ultrasonics Sonochemistry*, 13(5), 446–450. <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2005.09.012>
- Zhang, S., Hu, Z., & Wang, H. (2019). Metagenomic analysis exhibited the co-metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons by bacterial community from estuarine sediment. *Environment International*, 129, 308–319. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.05.028>
- Zhang, Y., & Tao, S. (2009). Global atmospheric emission inventory of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) for 2004. *Atmospheric Environment*, 43(4), 812–819. <https://doi.org/10.1016/J.ATMOENV.2008.10.050>
- Zhang, Y., Wang, N., Lu, Z., Chen, N., Cui, C., & Chen, X. (2022). Smart Titanium Wire Used for the Evaluation of Hydrophobic/Hydrophilic Interaction by In-Tube Solid Phase Microextraction. *Molecules*, 27(7), 1-14. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES27072353>
- Zhu, Y., Chen, K., Ding, Y., Situ, D., Li, Y., Long, Y., ... Ye, J. (2019). Metabolic and proteomic mechanism of benzo[a]pyrene degradation by *Brevibacillus brevis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 172, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01>

10. MATERIAL ANEXO

A.1. Determinación de proteínas totales en extractos crudos por método de Lowry.

En esta determinación se utilizó una curva de calibración construida con albúmina de suero bovino (BSA) en un intervalo que abarca su ausencia hasta su concentración de $29.17 \mu\text{g mL}^{-1}$. Los cultivos activados (15 mL de cultivo de microalga) evaluados por este proceso se obtuvieron bajo las mismas condiciones de tiempo y temperatura, expuestos o no al HAP (266 ng mL^{-1}). En un tubo de microcentrifuga (1.5 mL) se agregó en diferentes proporciones agua desionizada y albumina más 500 μL del reactivo A para ser mezclados vigorosamente. Finalmente, la mezcla fue adicionada y mezclada con 250 μL del reactivo B para alcanzar el volumen final (1.2 mL). La mezcla final se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente para luego medir su absorbancia a 750 nm. La composición de los reactivos A y B se presentan en la tabla a.1. Mientras que la proporción de agua y proteína adicionada se enlistan en la tabla a.2.

Tabla a.1. Composición de los reactivos A y B usados en el método de Lowry para la cuantificación de proteínas totales.

Reactivo	Composición	Condición de preparación
A	- 1 mL de reactivo tartrato carbonato de cobre (CTC), - 1 mL de hidróxido de sodio 0.8 M, - 1 mL de dodecilsulfato de sodio 10 % p/v, - 1 mL de agua desionizada.	Preparación inmediatamente antes de uso
CTC	- Carbonato de sodio 10 % p/v, - Tartrato de sodio y potasio 0.2 % p/v, - Sulfato de cobre 0.1 % p/v.	Estable hasta por 2 meses
B	Agua desionizada: reactivo de Folin-Ciocalteu a proporción 5:1	De fresca preparación

Tabla a.2. Composición de los niveles de concentración de la curva de calibración de albúmina de suero bovino (BSA) usada en la determinación de proteínas por el método de Lowry

Nivel	H ₂ O (μL)	BSA (1 mg / mL)	Concentración BSA ($\mu\text{g} / \text{mL}$)
1	450	-	0.00
2	445	5	4.17
3	440	10	8.33
4	435	15	12.50
5	430	20	16.67
6	425	25	20.83
7	420	30	25.00

Nivel	H ₂ O (μ L)	BSA (1 mg / mL)	Concentración BSA (μ g / mL)
8	415	35	29.17
ECE / ECI	425	25	Dependiente de la muestra

A.2.Cambio de procesador ultrasónico

El cambio del procesador ultrasónico Branson Digital Sonifier 450 (20 MHz) por el equipo Cole Palmer CP 505 (50 MHz) fue evaluado por la variación en la amplitud usada en la obtención del extracto crudo intracelular y el subsecuente nivel de biodegradación observado, buscando que el extracto crudo intracelular produjera cantidades similares de metabolito de seguimiento. El ensayo usó cultivos de *S. capricornutum* y *S. acutus* expuestos a *B[a]P* por 72h para la obtención del extracto crudo intracelular y posterior evaluación de biodegradación por exposición a *B[a]P* por 3 h cuantificando el 4,5-*cis*-dB[a]P. Los resultados se muestran en la figura a.1. Las amplitudes utilizadas fueron 20%, 30% y 40%, mostrando que su incremento afectó la biodegradación presente en el extracto crudo intracelular proveniente de *S. capricornutum*. El 20% de la amplitud del equipo Cole Palmer proporcionó extracto crudo intracelular con la biodegradación previamente observada, cuantificando 212.34 ± 14.16 ng (210 ± 14.04 ng previos), siendo la condición de elección para la continuación del desarrollo de la investigación. En *S. acutus* la variación de amplitud no mostró efecto negativo en la biodegradación presente en los extractos crudos intracelulares.

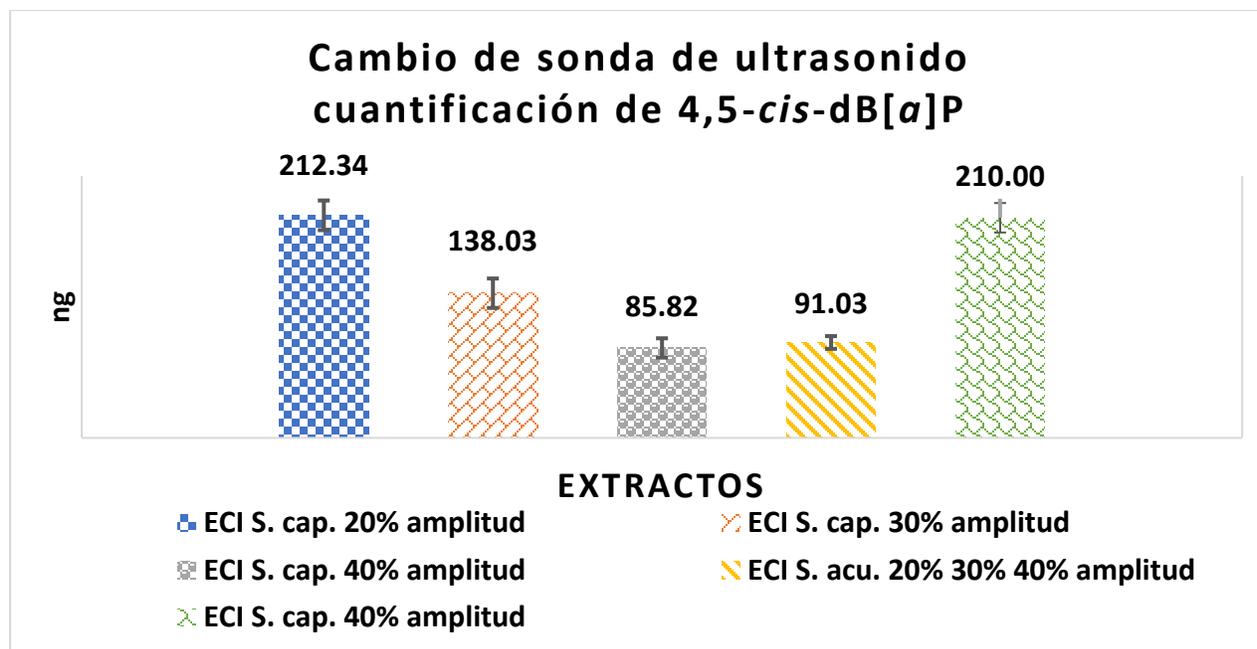


Figura a.1. Evaluación del cambio de sonda de ultrasonido por cuantificación del 4,5-*cis*-dB[a]P a causa de la biodegradación en el Extracto Crudo Intracelular de *Selenastrum capricornutum* y *Scenedesmus acutus*. Se utilizó un periodo de activación de 72 h y la evaluación de biodegradación de 3h.

A.3. Ejemplo de prueba de hipótesis para evaluación de cantidad de proteína en cultivos expuestos y no a B[a]P

En este ensayo se cuantificó la cantidad de proteína en cultivos expuestos a B[a]P por un intervalo de 48 y 72 h además de la cantidad de proteína en cultivos control. Para ello se realizó una prueba de hipótesis y una prueba t con un intervalo de confianza del 95% y un nivel de significancia del 0.05 para describir las varianzas y posteriormente sus diferencias. La tabla a.3. muestra ejemplos de las pruebas realizadas para los extractos crudos en individual y considerando ambas muestras.

Tabla a.3. Pruebas de hipótesis para el Extracto Crudo Extracelular (A) el Extracto Crudo Intracelular (B) y ambos extractos crudos (C)

A)

Análisis de extracto crudo extracelular de <i>Selenastrum capricornutum</i> por 48 horas			
Prueba F para varianzas de dos muestras			Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales
	Activación	Control	
Media	0.081	0.085	Estadístico t
Varianza	0.000129	0.00005	P(T<=t) dos colas
Observaciones	3	2	Valor crítico de t (dos colas)
Grados de libertad	2	1	Resultado: No hay diferencia significativa entre muestras de activación y control
F	2.58		
Valor crítico para F	799.5		

Resultado: No hay diferencia significativa en las varianzas

B)

Análisis de extracto crudo intracelular de *Scenedesmus acutus* por 72 horas

Prueba F para varianzas de dos muestras			Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales	
	<i>Activación</i>	<i>Control</i>		
Media	0.156666667	0.155	Estadístico t	0.347804172
Varianza	1.63333E-05	5E-05	P(T<=t) dos colas	0.750960064
Observaciones	3	2	Valor crítico de t (dos colas)	3.182446305
Grados de libertad	2	1	Resultado: No hay diferencia significativa entre muestras de activación y control	
F	0.326666667			
Valor crítico para F	799.5			
Resultado: No hay diferencia significativa en las varianzas				

C

Análisis total de *Scenedesmus acutus* 72 h

Prueba F para varianzas de dos muestras			Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales	
	<i>Activación</i>	<i>Control</i>		
Media	0.245666667	0.24	Estadístico t	6.42539604
Varianza	2.33333E-06	0	P(T<=t) dos colas	0.02337552
Observaciones	3	2	Valor crítico de t (dos colas)	4.30265273
Grados de libertad	2	1	Valor crítico de t (dos colas)	3.18244631
F	65535		Resultado: Hay diferencia significativa entre muestras	
Valor crítico para F	799.5			
Resultado: Hay diferencia significativa en las varianzas				

A.4. Artículo publicado en la revista Polycyclic Aromatic Compounds



Polycyclic Aromatic Compounds

ISSN: (Print) (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/gpol20>

Size Exclusion Chromatography Protein Profile of *Selenastrum capricornutum* Culture Extracts Degrading Benzo(a)Pyrene

José Eduardo Becerril Mercado, Martha Patricia García de Llasera & Manuel Méndez García

To cite this article: José Eduardo Becerril Mercado, Martha Patricia García de Llasera & Manuel Méndez García (2022): Size Exclusion Chromatography Protein Profile of *Selenastrum capricornutum* Culture Extracts Degrading Benzo(a)Pyrene, Polycyclic Aromatic Compounds, DOI: [10.1080/10406638.2022.2159987](https://doi.org/10.1080/10406638.2022.2159987)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/10406638.2022.2159987>

 View supplementary material [↗](#)

 Published online: 23 Dec 2022.

 Submit your article to this journal [↗](#)

 Article views: 17

 View related articles [↗](#)

 View Crossmark data [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=gppl20>



Size Exclusion Chromatography Protein Profile of *Selenastrum capricornutum* Culture Extracts Degrading Benzo(a)Pyrene

José Eduardo Becerril Mercado, Martha Patricia García de Llasera, and Manuel Méndez García

Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México, México

ABSTRACT

Benzo[a]pyrene (B[a]P) is an environmentally ubiquitous, persistent, and carcinogenic pollutant belonging to the polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) family. Several methods have been employed to follow PAH degradation by bacteria. However, there is very scarce information about microalgae as bioremediation species. In this work, we investigated the protein profile for B[a]P degradation by the *Selenastrum capricornutum* algae culture extract employing high-performance liquid chromatography (HPLC) in size exclusion chromatography mode (SEC) and electrophoresis (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis [SDS-PAGE]). We evaluated the degradation of crude extracts (CEs) and SEC fractions, and we found the presence of trace levels of 4, 5-dihydrodiolbenzo[a]pyrene (4,5-dB[a]P) and 7,8-dihydrodiolbenzo[a]pyrene (7,8-dB[a]P) in cis geometry as B[a]P degradation products. SEC chromatographic profile comparison of CEs and SEC fractions, both exposed to B[a]P along with the corresponding controls, allowed us the identification of molecular weights (MWs) of a multi-component system involved in the B[a]P biodegradation through protein over-production. Electrophoresis analysis showed several protein components, with MWs between 10 and 250 kDa, where two subunits of 38.15–41.97 and 82.73 ± 3.15 kDa suggested the presence of multi-component di-oxygenases in the early stages of B[a]P biodegradation by *S. capricornutum* cultures. This work extends the knowledge of the biodegradation process of high molecular PAHs by microalgae.

ARTICLE HISTORY

Received 10 March 2022
Accepted 13 December 2022

KEYWORDS

B[a]P; microalgae; biodegradation; SEC; electrophoresis; protein

Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are a group of more than 100 organic and recalcitrant compounds formed by the fusion of two or more aromatic rings,¹ resulting from the incomplete combustion of organic materials.² These PAHs along with their different sources of exposure as industrial effluents,³ spills, and leaks from anthropogenic activity near urban centers,⁴ are highly risk to human health.^{5,6} The research priority PAHs list includes the benzo[a]pyrene (B[a]P), a pollutant used as a removal and degradation model of PAHs.^{7–9}

Bioremediation is an affordable, efficient, and environmentally safe pollutant removal process.^{10,11} It has been used with PAHs,¹² and so far, in bacteria and fungi, it has a greater focus on PAHs with low molecular weight (MW). PAHs with less than four aromatic rings union. By

CONTACT Martha Patricia García de Llasera  pgcllas@unam.mx  Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México, D.F. 04510, México

 Supplemental data for this article can be accessed online at <https://doi.org/10.1080/10406638.2022.2159987>.

© 2022 Taylor & Francis Group, LLC

bacteria, PAH degradation has shown enzymes as di- and mono-oxygenases,^{2,13,14} where di-oxygenases mainly produce *cis*-dihydrodiols¹⁵ and work as multi-component systems.¹⁶ In contrast, the cytochrome P-450 system,¹⁷ and soluble extracellular enzymes as mono-oxygenases induced PAHs degradation by fungal,^{18,19} generating *trans*-dihydrodiols.¹¹ Although the enzymatic system responsible for the degradation of PAH in microalgae is not yet defined.

Non-membrane bound di-oxygenases formed by reductases, hydroxylases, and ferredoxins add O₂ and cleave the PAH in cofactors presence such as NADH.^{20,21} *Amycolatopsis tucumanensis* DSM 45259 in the PAH degradation process produces proteins from 6.4 to 200 kDa with multi-component oxygenases in the range of 39.72–71.35 kDa.^{21,22} *Mycobacterium* has been used to describe a large subunit (50 kDa) of a dioxygenase PAH degrader,^{23–25} two dioxygenases (Pdo1 and Pdo2) made up of a 52 kDa α subunit and a 20 kDa β subunit,²⁶ two pyrene oxygenating components (CYP450 44.8 kDa and PipA 48.7 kDa), an adaptive electron transporter system,²⁷ a catalase-peroxidase (85.2 kDa), a mono-oxygenase (21.9 kDa), and a dioxygenase small subunit.²⁸

In the PAH degradation by fungi, the presence of dehydrogenases, ligninolytic enzymes, mono-oxygenases, and hydrolase enzymes, working in coupled with the cytochrome P-450 system, has been reported its mono-hydroxylated and *trans*-dihydrodiols metabolites.^{29–32} Laccases (50–82 kDa) involved in the B[a]P oxidation have been observed in the fungus *Pleurotus ostreatus*.³³ These laccases and their subunits (28 kDa) have been characterized by electrophoresis and preparative size exclusion chromatography (SEC).³⁴

Dihydrolipoyl transacetylase (DLAT; 50–69 kDa) is the most characterized microalgae enzyme,³⁵ as long as the main compounds involved in PAH degradation by microalgae are dioxygenases and the CYP-P450 system, without achieving its complete isolation and characterization. In *Chlamydomonas reinhardtii* 503, enzymes such as homogentisate 1,2 di-oxygenase (49.9 kDa), carboxymethylenebutenolidase (25.8 kDa), ribulose 1,5 bisphosphate carboxylase (55 kDa large subunit, and 13 kDa small subunit, pool size of 70 kDa) and ubiquinol oxidase (39.9 kDa) participate in the biodegradation of B[a]A.³⁶

Biodegradation studies of PAH by *Selenastrum capricornutum* have shown the production of dihydrodiols.^{37,38} Research has been described these metabolites as *cis*-dihydrodiols, produced by di-oxygenases as it happens in bacteria.³⁹ In contrast, others are classified as hydroxy compounds consequence of mono-oxygenases action as described in fungi.^{40,41} The analysis of these PAH metabolites is complex due to their instability to light, temperature, and low production levels.

Solid-phase extraction (SPE) and matrix solid-phase dispersion (MSPD), as sample treatments, improve their quantification by chromatographic techniques,^{17,42} through continuous assays performed with persistent biodegradation data collection or discontinuous assays at intervals or at the end of the process.⁴³ Moreover, the protein components can be extracted by physicochemical methods. The physical process of ultrasonication could extract the biodegradation protein system involved.⁴⁴ In peptidomics research,⁴⁵ SEC has been used to determine MWs to remove interferents and to make liquid samples fractionation.⁴⁶

There are few studies of high-MW PAHs biodegradation, such as B[a]P, with microalgae. Existing analyses only deduce oxygenases as a possible enzymatic system through the type of metabolites. In this work, we used *S. capricornutum* crude extract (CE) obtained from microalgae cultures exposed to B[a]P to analyze them using chromatographic and electrophoresis techniques. According to this, our CEs analysis could differentiate the presence of *cis*-dihydrodiols as metabolites, whose geometric composition confirms the action of di-oxygenases. Furthermore, for the first time, we described the CEs and SEC extracts protein profile capable of degrading the B[a]P indicating the presence and action of a multi-component enzymatic system and the possible presence of cytochrome P-450 enzymes in the biodegradation process.

Materials and methods

Materials and reagents

The following supplies were used: B[a]P standard (Chem Service, West Chester, PA). *Cis*- and *trans*- 4,5- and 7,8-dihydrodiolbenzo[a]pyrene (7,8-dB[a]P) (NCI Chemical Carcinogen Reference Standards Repository, Kansas, MO). High-performance liquid chromatography (HPLC)-grade methanol, acetonitrile, and isopropanol. Reagent-grade Bristol medium components: NaNO₃ (2.94 mM), CaCl₂·2H₂O (0.17 mM), MgSO₄·7H₂O (0.30 mM), K₂HPO₄ (1.29 mM), NaCl (0.43 mM), and KH₂PO₄ (1.29 mM) (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ). Peptone protease, bacteriological agar (MCD LAB, Tlalnepantla, MEX, Mexico), and TRIS buffer (Bio-Rad, Hercules, CA, US). About 20 cm³/30 cm³ glass columns (Wilmad LabGlass, Vineland, NJ). Dextran blue (2000 kDa) and bromophenol blue (0.670 kDa) (Thermo Scientific, Waltham, MA). Sephadex G-50 and G-100. Phosphate buffer, supelclean C18 silica (45 μm), molecular protein kit with thyroglobulin (669 kDa), amylase (200 kDa), albumin (66 kDa), anhydrase (29 kDa), aprotinin (6.51 kDa), and uracil (0.12 kDa) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Centricon centrifugal filters YM-30 kDa, 15 mL (Millipore, Billerica, MA). *S. capricornutum* (Culture Collection of Algae, UTEX, University of Texas, Austin, TX). Water, 18.2 MΩ cm⁻¹ resistivity (Millipore Simplicity UV deionizer, Bedford, MA).

Bioassays

Growth cultures

S. capricornutum microalga was cultured in Bristol medium (+1% protease w/v) at room temperature with automatic photoperiods (16/8 h light/dark) and orbital agitation (80 rpm, 2346 Thermo Scientific shaker). Growth was UV-monitored (Genesys 10S Scientific spectrophotometer, Thermo Scientific).

Microalgae culture exposure bioassays

Cultures (15 mL/3 replicates) in exponential growth phase (6.75×10^6 cells mL⁻¹) were exposed (or activated) to B[a]P (266 ng mL⁻¹) at 50 rpm/28 °C/yellow light (40 W incandescent lamp) through 90 min, 3 h, 6 h, 48 h, and 72 h using the SI-600R orbital incubator (Jeitech Lab Companion, Seoul, South Korea). These assays served to select the optimal conditions for enzyme induction in the microalgae activation assay (MAA). The exposure bioassay had the following controls:

1. To test that biodegradation is due to microalgae: abiotic, medium without microalgae with B[a]P under exposure conditions (biomass [BM] and extracellular crude extracts [ECEs] from exposure bioassays section).
2. To determine the possible presence of metabolites interferents: BM and ECE under exposure conditions without B[a]P.

Metabolites isomer determination

Standard addition method to determine the isomerism of the metabolites formed⁴⁷ (10, 20, and 25 ng of *cis*- and *trans*- 4,5- and 7,8-dB[a]P) was applied to cultures from 6 h incubation which with SPE and MSPD were extracted.

Sample preparation

Biomass and extracellular crude extracts from exposure bioassays

After B[a]P exposure (266 ng mL^{-1}), microalgae cultures were separated in ECE (15 mL) and BM (5 mg dry mass) by cc, 3900 rpm, 15 min. Then, the B[a]P and metabolite extracts were obtained by SPE/MSPD for both ECE and BM. The B[a]P and metabolite extracts were analyzed by HPLC-UV/fluorescence detection (FD).

Intracellular crude extract obtention by an ultrasound probe

The collected BM was rinsed with TRIS buffer (3 mL/50 mM/pH 7.6/cc) and placed in 5 mL of fresh-TRIS buffer. After the collection, BM was cooled ($4^\circ\text{C}/15 \text{ min}$) in an ice bath and later exposed to automated ultrasound pulses (10 s/5 s-pauses, 50 kHz, amplitude 20%, Cole Palmer Ultrasonic Processor) until complete 5 min. Finally, the lysate or intracellular CE (ICE) was collected by cc (3900 rpm, 15 min, and 4°C).

CEs concentration for preparative SEC

CEs obtained from 12 individual B[a]P-activated microalgal cultures were concentrated in 2 mL. ICEs were pooled in one flask (5 mL each/60 mL total), Buchi R-205 rotatory evaporator 85 rpm/ $37^\circ\text{C}/10 \text{ mbar}$) while the ECEs (15 mL each/180 mL total) were filtered employing the centricon device under cc ($7700 \text{ rpm}/4^\circ\text{C}/15 \text{ min}$ each). Finally, the cellular debris was discarded from the concentrated CEs by cc ($3900/15 \text{ min}/4^\circ\text{C}$).

Fractioning and Sub-fractioning of concentrated CEs by preparative SEC

Each of the concentrated CEs was fractionated in 20 and 30 cm^3 preparative SEC glass columns packed with Sephadex G-50 (1.18 g) and G-100 (0.71 g) with an operating range of 1.5–30 and 4–150 kDa, respectively. The mobile phase (MP, 0.24 mL min^{-1}) was TRIS buffer 50 mM, pH 7.6.

The exclusion limit volume (ELV) was obtained from the elution of dextran blue solution ($8.2 \pm 0.06 \text{ mL}$) on the G-50 phase; meanwhile, the working range volume (WRV) was acquired from the elution of bromophenol blue solution ($10 \pm 0.15 \text{ mL}$). First, for each concentrated CEs, fractions of MW $>30 \text{ kDa}$ (intracellular SEC extract [ISEC] >30 and extracellular SEC extract [ESEC] >30) and MW $<30 \text{ kDa}$ and up to 1.5 kDa (ISEC <30 – 1.5 kDa and ESEC <30 – 1.5 kDa) were collected. Then, all fractions were diluted with TRIS buffer (15 mL) and exposed to B[a]P as indicated in the ICE and ECE degradation assay section.

For Sephadex G-100, the ELV and WRV were acquired employing 12.25 ± 0.53 and $17.3 \pm 0.12 \text{ mL}$ of eluted MP, respectively. Two WRV fractions (8 mL) were recovered from each concentrated CEs and named A and B for ISEC and ESEC, respectively. Eventually, A and B fractions were sub-fractionated into four more parts (ISEC/ESEC A1, A2, A3, A4, B1, B2, B3, and B4), 2 mL each. Finally, ISEC A1 and A2 fractions were sub-fractionated, getting two fractions (ISEC A1a, A1b, A2a, and A2b), 1 mL each. These undiluted SEC fractions were exposed to B[a]P, as mentioned in ICE and ECE degradation assay section.

Electrophoresis analysis

To obtain the protein profile, 1-DE was performed. Only A1a to A2b fractions were suitable for analysis. The 1-DE analysis employed sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) as a stationary phase and was analyzed with a densitometer GS-900. Precision plus MW markers from Bio-Rad and lysozyme (1 μg) were used as quantification references (λ : 280 nm). The sample load used 6 μL subfraction, 4 μL of Urea-6 M/Tris-100 mM buffer pH 8.5,

and 5 μL of loading buffer (2 h, 135 V). The staining solution (8% w/v $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /2% H_3PO_4 /20% CH_4O /0.1% coomassie blue G-250) was flushed with distilled water for 24 h.

Biodegradation assay

Microalgae activation assay (MAA)

The degradative B[a]P protein compounds were induced in cultures by exposure bioassays of 48 and 72 h (34 °C, B[a]P = 266 ng mL⁻¹), a process known as MAA. This MAA allows the optimal production of the degrading enzymes, and the monitoring and the quantification of metabolites were favored. The metabolites and B[a]P quantification process are described in the following section: ICE and ECE degradation assay.

ICE and ECE degradation assay

The CE biodegradation was tested through B[a]P incubations over 90 min, 3 h, and 6 h (using ambient light, room temperature, and 50 rpm). This procedure was identified as ICE and ECE degradation assay (IEAA). IEAA was also performed on the ISEC and ESEC fractions that were B[a]P incubated (3 h/266 ng mL⁻¹). In addition, IEAA of A and B fractions from the SEC and their undiluted subfractions were evaluated following the metabolite production by the HPLC methodology described in the Analysis of CE and SEC extracts for metabolites quantification section. The IEAA had the following controls:

3. To differentiate the metabolite production between MAA and IEAA: residual activation analyte until the 3 h IEAA without B[a]P addition.
4. To test if the MAA induces the biodegradation or not: CEs from cultures not B[a]P activated and B[a]P exposed (3 h).
5. To determine the residual metabolite and protein composition differences: SEC fractions and subfractions from B[a]P and no B[a]P activated cultures.

Chromatographic conditions and detection

All the chromatographic conditions for the metabolite quantification were validated as described in the Supplementary material, and validation parameters are resumed in Table 1S.

Analysis of B[a]P and metabolites in BM and ECE extracts from the microalgae culture exposure bioassay

B[a]P analyses were performed in a 210 Varian HPLC with a 9065 Polychrom UV detector (λ 263 nm), a Hypersil Green PAH column Thermo Scientific (5 μm , 4.6 mm \times 100 mm) with guard column (20 \times 2 mm). MP was 100% methanol (1 mL min⁻¹).

Metabolites analysis was done in a 9012 Varian HPLC with 363 ProStar FD (λ_{ex} 264 nm, λ_{em} 390 nm). An Eclipse XDB-C18 column (3.5 μm , 4.6 mm \times 150 mm) with a guard column (20 \times 2 mm) was used for the separation. MP was methanol: H₂O 65:35 v/v (1 mL min⁻¹). Both analyses used 20 μL as injection volume.

Analysis of CEs and SEC fractions for metabolites quantification

Residual B[a]P analysis used the 210 Varian HPLC, an ODS HYPERSYL column Thermo Scientific (150 \times 4.6 mm) with guard column (20 mm \times 2 mm), UVD. MP was methanol: H₂O 85:15 (1 mL min⁻¹), while for the metabolite analysis was used a 9012 Varian HPLC, a Microsorb-MV column Agilent Scientific Instruments (100-5 C18 250 \times 4.5 mm) with guard

column (20 mm x 2 mm), FD, and the MP was methanol: H₂O 62:38 (1 mL min⁻¹). Both analyses used 20 µL as injection volume.

Analysis of concentrated CEs protein profiles by size exclusion chromatography

The concentrated CEs analysis by SEC was performed using a 1525 Waters HPLC with a UV detector (λ 230, 245.4, and 258.3 nm), the molecular protein kit (materials and reagents section), and the columns: SRT SEC-300, Sephadex Technologies (5 µm, 300 Å, 7.8 × 300 mm, 5–1250 kDa) and Bio SEC-5, Agilent (5 µm, 150 Å 7.8 × 300 MM, 0.5–150 kDa) with their respective guard columns (5 µm, 7.8 × 50 mm). The MP (1 mL min⁻¹) was a phosphate buffer solution (0.15 M, pH = 7). The injection volume was 20 µL.

Results and discussion

Biodegradation through time

During MAA, the results showed that at 72 h, the degradation process almost completely depleted the added amount of B[a]P. Meanwhile, the metabolites concentration of *cis*-4, 5-dihydrodiolbenzo[a]pyrene (4,5-dB[a]P) and *cis*-7,8-dB[a]P started to increase from the assay reaching its maximum after 6 h of B[a]P exposure. After that, their concentration decreased until complete depletion at 48 h for *cis*-7,8-dB[a]P. However, after 72 h, *cis*-4,5-dB[a]P was still present in a low concentration (<3.6 ng mL⁻¹). According to these results, the optimum times for the obtention of a residual metabolite concentration were 48 and 72 h and therefore were selected to perform the activation assay. Besides, Control 1 analysis showed that abiotic degradation was minimum and less effective than biotic degradation since in abiotic conditions were preserved 98.42 ± 6.9% of the B[a]P added. Also, Control 2 did not show any interferences present in metabolite detection.

During IEAA, after collecting ICE and ECE from the previously exposed microalgae *S. capricornutum*, optimum activation time was achieved at 72 h of B[a]P exposure since ICE and ECE extracts showed a quantifiable amount of the *cis*-4,5-dB[a]P metabolite. In the case of *cis*-7,8-dB[a]P, its concentration was not quantifiable and discarded for further analysis. Figure 1(a) and Table 2S, in Supplementary material, show the comparison of the activation times on the ICE and ECE extracts at 48 and 72 h, respectively. Metabolite production showed a higher presence of *cis*-4,5-dB[a]P in ECE (up to 82.18%) compared to the ICE. However, this trend changed after the fractioning process, as discussed in the Identification of enzymatic MWs section. At 72 h of B[a]P exposure, the higher metabolite amount observed in ECE compared to ICE can be explained by possible exogenous enzymes like the cytochrome P-450 system enzymes. This specific response system has been observed in fungi and plants, in which releasing enzymes into the environment caused the PAHs degradation and metabolite over-production.^{48,49} Control 3 showed a low concentration of *cis*-4,5-dB[a]P on IEAA, demonstrating that the degradation was preserved on CEs after microalgae extraction. Control 4 demonstrated the need for microalgae activation before obtaining CEs since a residual of 91 ± 3.3% of the B[a]P was observed when lysates were not previously activated.

Figure 1(b) indicates the outcomes of IEAA on the 72 h MAA. ICE subjected to IEAA showed a gradual concentration increase of *cis*-4,5-dB[a]P through time, reaching its maximum (250.72 ± 38.86 ng) at 6 h after beginning the assay, suggesting that the degradation was still going. ECE showed maximum concentration at 3 h (604.54 ± 28.74 ng) and a slight variation at 6 h, indicating that the degradation is preserved beyond the evaluated times. The higher metabolite formation in ECE compared to ICE could be associated with the biodegradation system presence and the release from the internal environment.^{50,51}

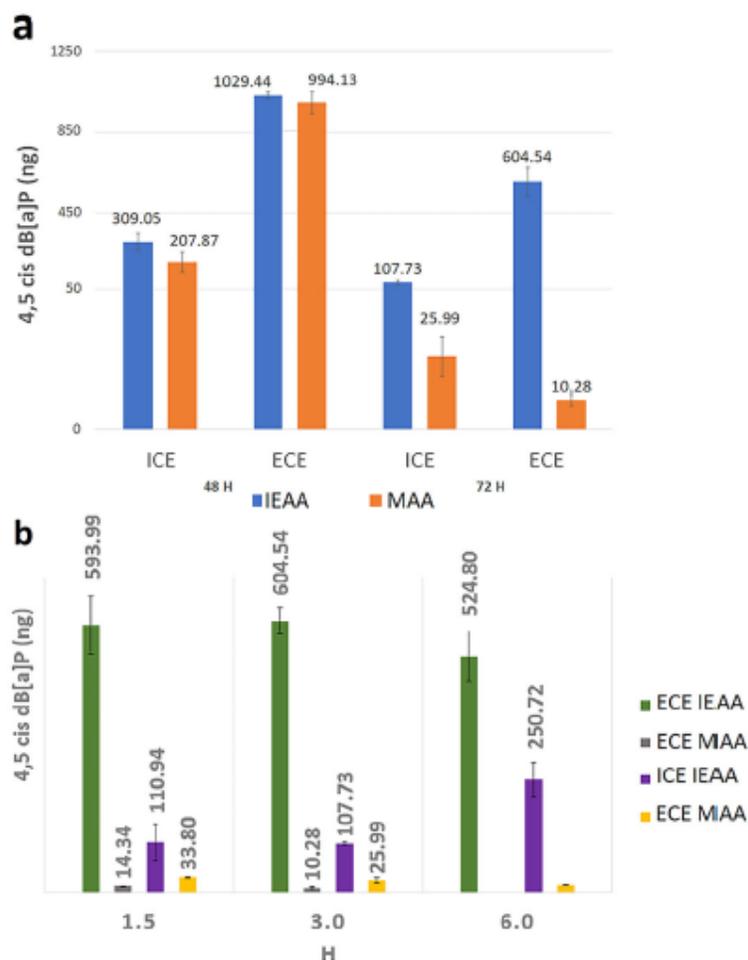


Figure 1. *Cis*-4,5- dB[a]P quantification in degradation assays performed in ICE and ECE versus activation extracts. (a) Extracts obtained by 48 and 72 h activation assays of *Selenastrum capricornutum* cells. (b) Bio-degradation process evaluation over time from activated extracts (72 h versus B[a]P) obtained from ECE and ICE of *Selenastrum capricornutum*.

Isomer study

The time retention (t_r) comparison between the chromatographic peaks of *cis*- and *trans*- metabolites standards and peaks of the algal extracts from 6 h exposure bioassays were employed to determine which isomers were formed during biodegradation and which enzymatic system could be involved in such a process. The t_r of the standard peaks were 7.43 min (*cis*-4,5-dB[a]P), 7.79 min (*trans*-4,5-dB[a]P), 8.6 min (*cis*-7,8-dB[a]P), and 11.8 min (*trans*-7,8-dB[a]P). An increase in signals intensity for *cis* isomers on the bioassay extracts after B[a]P exposure strongly suggest that metabolites *cis*-4,5-dB[a]P and *cis*-7,8-dB[a]P were produced by specific enzymatic systems since the corresponding *trans* compounds were not produced during the biodegradation process. As far as we know, this work is the first report that corroborates the hypothesis that cultures of *S. capricornutum* exposed to B[a]P produce *cis* metabolites due to the action of di-oxygenases, as was suggested before.³⁰ These enzymes and those grouped to CYP 450 are the most associated with this process.⁵² Figure 2 shows the resulting chromatograms from analyzing biomass extracts added with metabolites standards. Here, a coincidence can be observed between the *cis* standard peak and the peak obtained from the extract. Meanwhile, signals from *trans* isomers

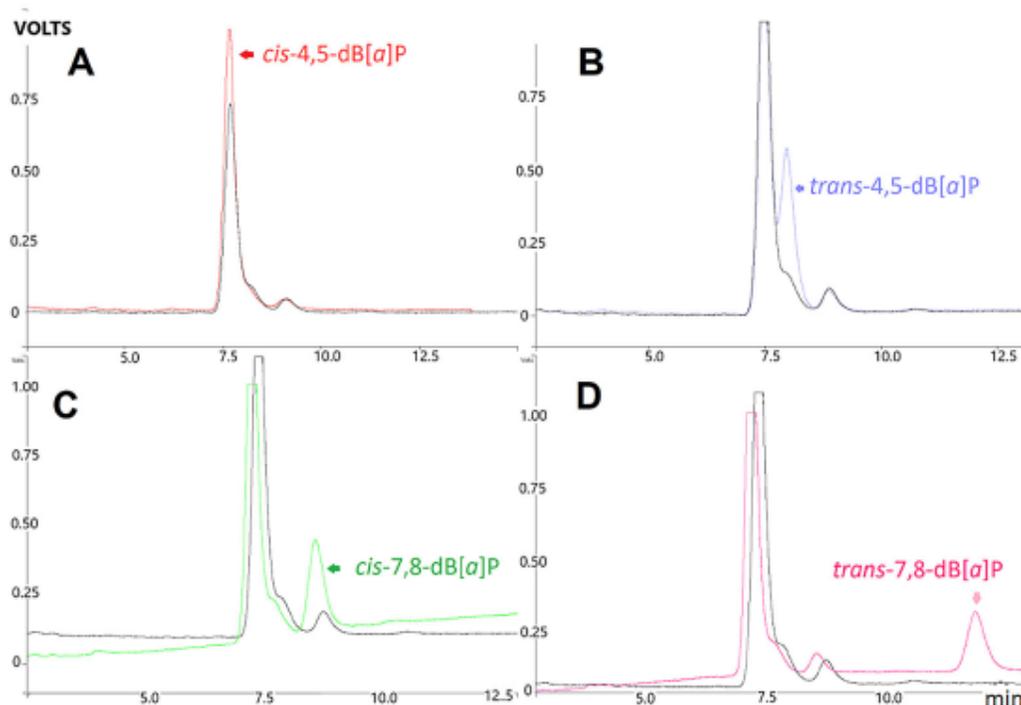


Figure 2. Chromatograms obtained from bioassays with biomass (in black). Additions of metabolites are shown in color chromatograms. (A) fortified w/*cis*-4,5-dB[a]P (25 µg), (B) fortified w/*trans*-4,5-dB[a]P (10 µg), (C) fortified w/*cis*-7,8-dB[a]P (20 µg) y, and (D) fortified w/*trans*-7,8-dB[a]P (20 µg). The arrow shows the addition.

only increased their intensity on the standard signals, and there were no changes in the B[a]P exposed algae extract signals.

Identification of enzymatic MWs

The chromatographic evaluation of CE_S using the SRT-SEC 300 column is shown in Figure 3. ICE exhibited one peak at 10.4 min that was differentiated from a shoulder at Control 5 (see ICE and ECE degradation assay section). The MW was estimated at 38.15 ± 1.8 kDa. Similar behavior was observed in ECE with a chromatographic peak at 10.3 min associated with 41.97 ± 1.59 kDa, which was not observed in the control. The absorption spectra of these chromatographic signals showed the same shape with a maximum of 258.2 nm, potentially describing the same component (MW 38.15 – 41.97 kDa). The low elution difference could be due to a slight variation in the compound retention. These last MWs were not in the ECE control, possibly due to an intracellular over-production of this compound during the MAA process. This compound could be released to the extracellular medium and thus remain available in the ECE after the B[a]P exposition to participate in the IEAA process. Some authors have been reported the production of ring hydroxylating di-oxygenase components (20–50 kDa) involved in the PAH degradation. An approximate 37 kDa weight was involved in the biodegradation.⁵³ According to the observed MWs, the prevalence of *cis*-4,5-dB[a]P and the absence of *trans* metabolites formation after the biodegradation process, the identified component could be part of the enzyme system involved in the biodegradation of B[a]P in *S. capricornutum*.

Table 1 shows the concentration of metabolites found on CE_S after the SEC fractionation, only those fractions that presented quantifiable biodegradation were shown. The results showed that

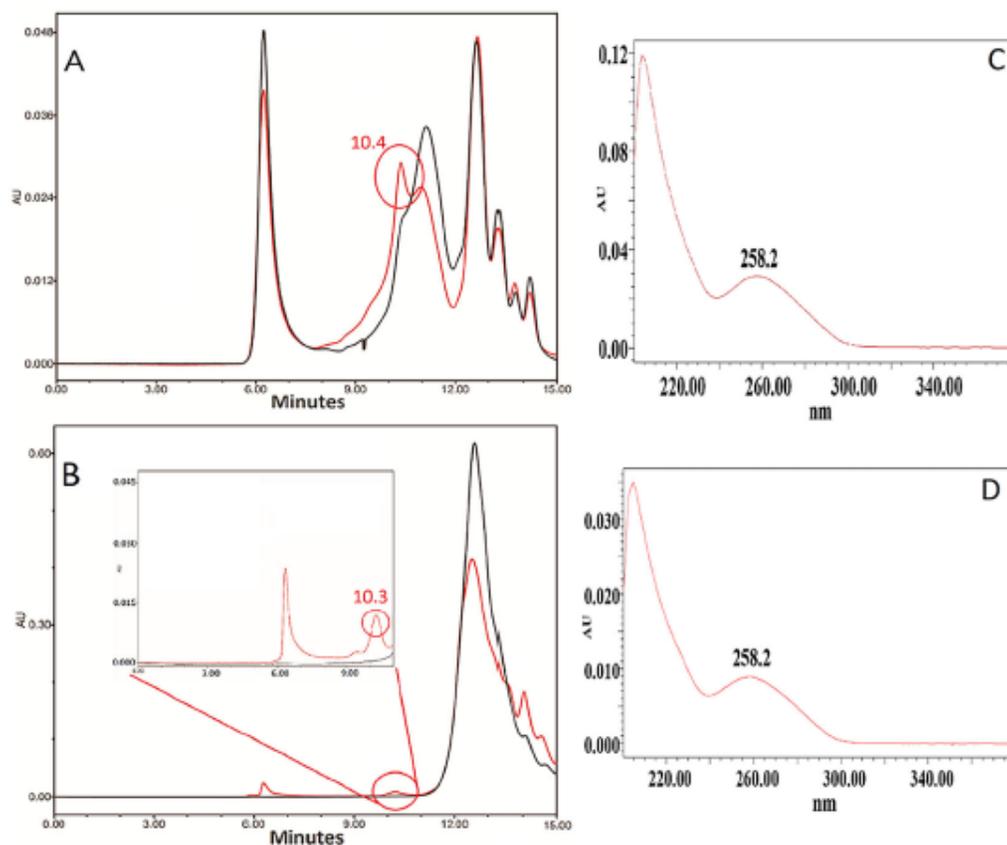


Figure 3. Chromatograms obtained from CEs SEC analysis with the SRT SEC-300 column. ECI (A) and ECE (B) incubated (3 h) and obtained from activated cultures (x 4) are shown in red. CEs chromatograms without activation are in black. Absorption spectra of the peaks of interest, 10.4 min (C) and 10.3 min (D) on the right.

Table 1. *Cis*-4,5-dB[a]P concentration found in the biodegradation test of concentrated size-exclusion ICE fractions (ISEC) and fraction controls obtained from exposure to B[a]P (266 ng mL^{-1}) for 3 h and ambient conditions (ambient light, room temperature, 50 rpm).

Fraction kDa	Fractionated by	<i>Cis</i> -4,5-dB[a]P	
		Concentration $\mu\text{g L}^{-1}$	Control without exposure to B[a]P $\mu\text{g L}^{-1}$
ISEC > 30	Sephadex G-50	15.33 ± 0.4	1.91 ± 0.1
ISEC < 30 – 1.5		8.5 ± 0.4	Under LOQ
ISEC A	Sephadex G-100	1.75 ± 0.06	Under LOQ
ISEC A1		7.02 ± 0.1	Not detected
ISEC A2		1.85 ± 0.11	Not detected
ISEC A1a		2.32	Not detected

biodegradation was superior in the ISEC > 30 kDa fraction, which could contain the component previously found of MW between 38.15 and 41.97 kDa and slight amounts of an enzymatic unit with MW < 30–1.5 kDa. Biodegradation in the fractions listed in Table 1 suggested that degradation could be due to more than one enzyme system.²⁸ In our case, the possible two enzymatic units are the ones with MW 38.15–41.97 kDa and MW < 30–1.5 kDa. In contrast, in ESEC fractions, there was no evidence of B[a]P biodegradation after exposure to the pollutant. This evaluation demonstrated that the biodegradation remains in the ISEC fractions after their fractionation with Sephadex G-50.

Fractionation with Sephadex G-100 was done to further explore the possibility of having several enzymatic units of MW > 30 kDa to provide cleaner CE extracts after discarding the exclusion volume (12 mL). The degradation was found in only one of the collected fractions from ICE, named fraction A in Table 1. This fraction was then sub-fractionated to determine the MWs of the possible enzymatic units that presented degradation.

Of the four ISEC subfractions (see Fractioning and sub fractioning of concentrated CEs by SEC section) obtained from fraction A employing the Sephadex G-100, subfractions A1 and A2 did show the presence of *cis*-4,5-dB[a]P. The analysis of these subfractions with the Sephax SRT SEC-300 column showed an over-production of units with MWs of 325.15 ± 3.54 kDa, 215.68 ± 5.34 kDa, 91.08 ± 29.3 kDa, and 37.68 ± 4.22 kDa, these results are shown in Figure 4(a).

The subfractions A1 and A2 were fractionated using an Agilent Bio SEC-5 column to explore the possibility that the detected units with MW = 325.15 ± 3.54 kDa and 215.68 ± 5.34 kDa were composed of more than one enzymatic unit. The results of this analysis are shown in Figure 4(b).

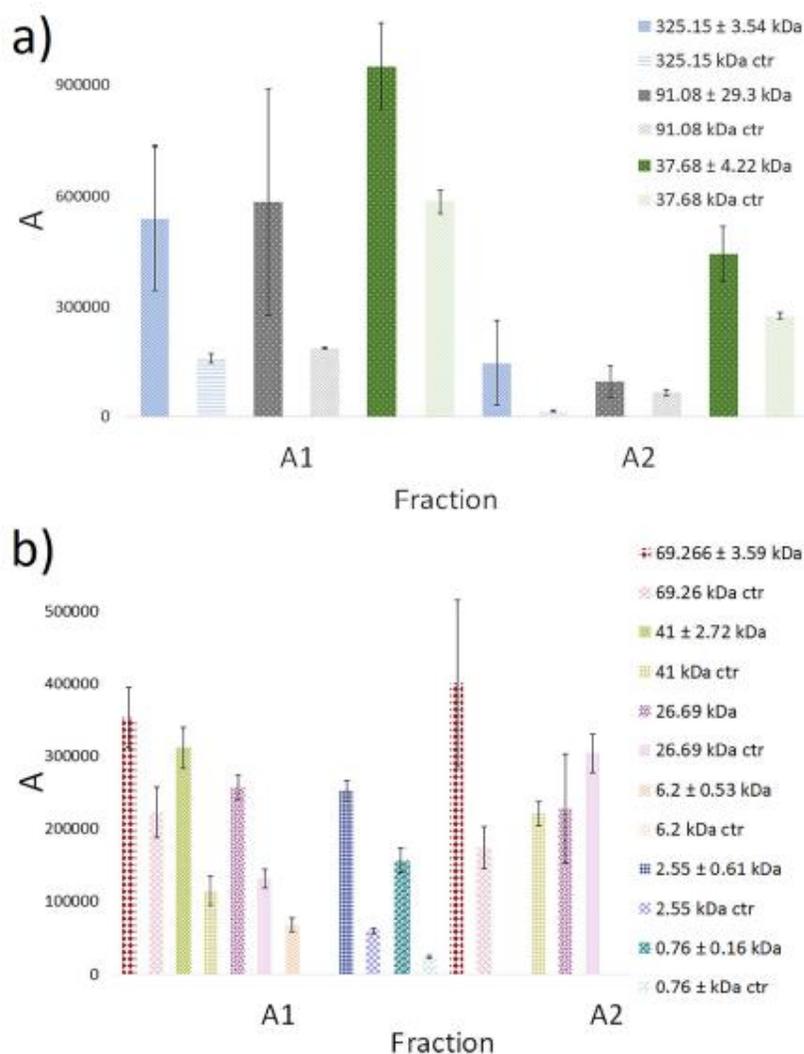


Figure 4. Histograms of ISEC fractions A1 and A2 to follow the signals observed a) analysis using Sephax SRTSEC-300 b) analysis using Agilent Bio SEC-5.

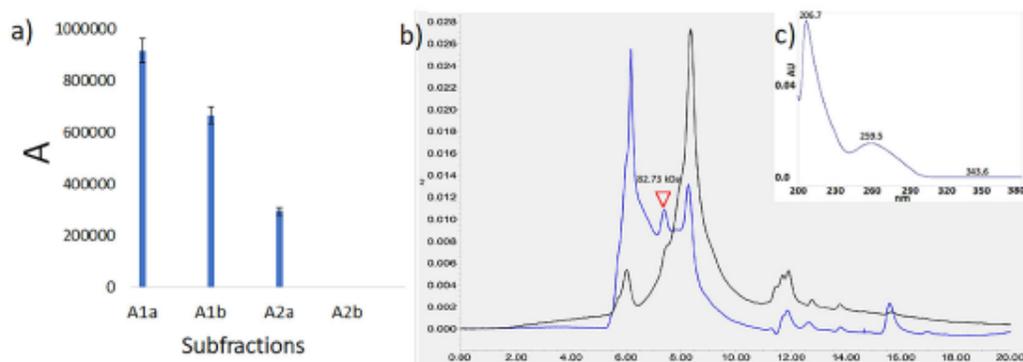


Figure 5. (a) Histogram of subfractions A1a–A2b to follow the signal of 7.41 min (82.73 ± 3.15 kDa). (b) Chromatogram obtained from the A1b analysis fraction. Chromatographic analysis by SEC with the Agilent Bio Sec-5 column, 7.41 min signal tracking (c) UV spectrum of the signal of interest (λ : 245.4).

In this analysis, we found a species with MW = 41.03 kDa, which coincides with the previous unit found with MW between 38.15 and 41.97 kDa during the CEs analysis. Di-oxygenases involved in B[a]P biodegradation (around 200 kDa) could be composed of multi-component structures with variable α and β size subunits of mean MWs of 51 and 21.5 kDa, respectively.⁵⁴ In this regard, we can suggest that the enzyme system found in this work (MW of 38.15 – 41.97 kDa) could be a subunit of a di-oxygenase.

Four subfractions A1a, A1b, A2a, and A2b of the previous fractions denoted as A1 and A2, which showed degradation, were obtained employing a Sephadex G-100 column. Fractions A1a, A1b, and A2a from this separation showed degradation. Figure 5 shows these results graphically. Finally, these last subfractions were analyzed by HPLC using the Bio SEC-5 column. Analysis results showed one signal associated with an MW of 82.73 ± 3.15 kDa, which decreases its presence through the elution of A1a to A2a. This MW was previously observed during the ISEC fractionation with the Sepax SRT SEC-300 column, confirming the possibility of another enzymatic unit responsible for the degradation.

Analysis of subfractions by SDS-PAGE

Subfractions A1a to A2b were analyzed by 1-DE. A scanned picture of the obtained gel is shown in Figure 6. A1a showed three protein zones of interest with MWs of 18.6–26.2 kDa, 34.1–59.9 kDa, and 68.3–250 kDa. A gel scan resulted in a histogram shown in Figure 7 that corroborated the MWs observed in the fractions A1 and A2 obtained by the analytical SEC. Furthermore, MWs near the component range of 38.15 and 41.97 kDa were also corroborated by the electrophoresis analysis (38.0–40.6 kDa). In addition, the component over-production with MW = 82 kDa was quantified, and a mass increase was observed from 0.2 to 0.35 μ g after the activation process. Furthermore, the component MW = 82.73 \pm 3.1 kDa could be involved in the B[a]P biodegradation process. This result was also observed by other authors,⁵⁵ who reported the production of a group of five enzymes of MW = 81 kDa after exposing *Mycobacterium* cultures to pyrene. Also, one catalase-peroxidase (MW = 80.9 – 85.2 kDa), a mono-oxygenase (21.9 kDa), and di-oxygenase small subunits 18–19 kDa from *Mycobacterium* cultures in the presence of pyrene were reported.⁵³ Similar MWs have been identified in A1a and A1b subfractions (22 kDa and 17–18.6 kDa).

The units with MWs analyzed in the 1-DE as 49.9 and 20 kDa could represent a similar behavior as the one observed by Krivobok,²⁶ who reported a di-oxygenase from *Mycobacterium* with subunits of 52 and 20 kDa. Furthermore, Luo et al.,⁵⁶ described a 44.3 kDa compound Brezna

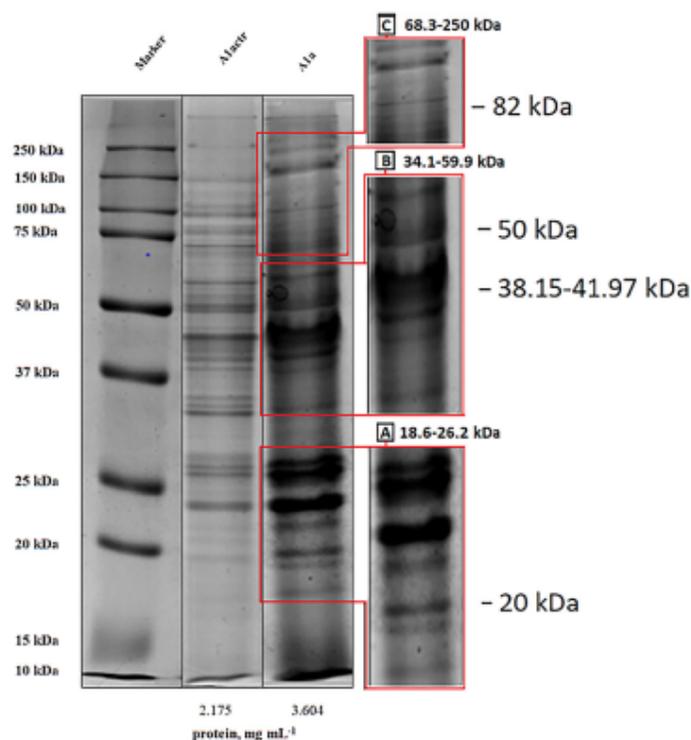


Figure 6. SDS PAGE-1DE. A1a subfraction comparison from activated culture versus A1a control from non-activated culture. Sections A, B, and C show zones of interest.

et al.,²⁷ also mentions a couple of protein components (44.8 and 48.7 kDa) from cytochrome P450 mono-oxygenases from *Rhodococcus* and *Mycobacterium* each. Additionally, Subashchandrabose,³⁵ has described a DLAT (47.7 kDa) from the green microalga *Chlorella* and its involvement in bioremediation processes; those compounds could be related to the MWs between 44 and 47.2 kDa from this work. Moreover, Subashchandrabose,⁵⁷ have also reported an amidohydrolase (40.3 kDa) in the pyrene degradation process and B[a]P due to *Rhodococcus*, which could be related to the 40.6 kDa compound obtained in the subfractions analyzed (A1a–A2a). Furthermore, the high MWs found in this work in the Identification of enzymatic MWs section (325.15 ± 3.54 kDa and 215.68 ± 5.34 kDa) become important when considering Jouanneau et al.,⁵⁸ who described a 200 kDa di-oxygenases from *Sphingomonas* in the B[a]P biodegradation process. Finally, in a recent research article,⁵² the authors described the range of MWs of enzymes involved in the PAHs biodegradation between 18 and 200 kDa.

Conclusions

The CEs obtained from *S. capricornutum* showed biodegradation of B[a]P and the production of *cis*-dihydrodiolbenzo[a]pyrene metabolites in the early stages of the process. This fact determines that di-oxygenases may be involved in the process, as reported in bacterial systems. The variable protein profile possibly describes a multi-component enzymatic system responsible for biodegradation and presumably presents subunits of di-oxygenase and their complete conformation with an MW around 200 kDa. Moreover, based on the MWs described, it is feasible that aromatic ring hydroxylating di-oxygenases, di-oxygenase precursors, catalase-peroxidase, and mono-oxygenases were present, pointing to the action of a degrading system adaptable to environmental conditions.

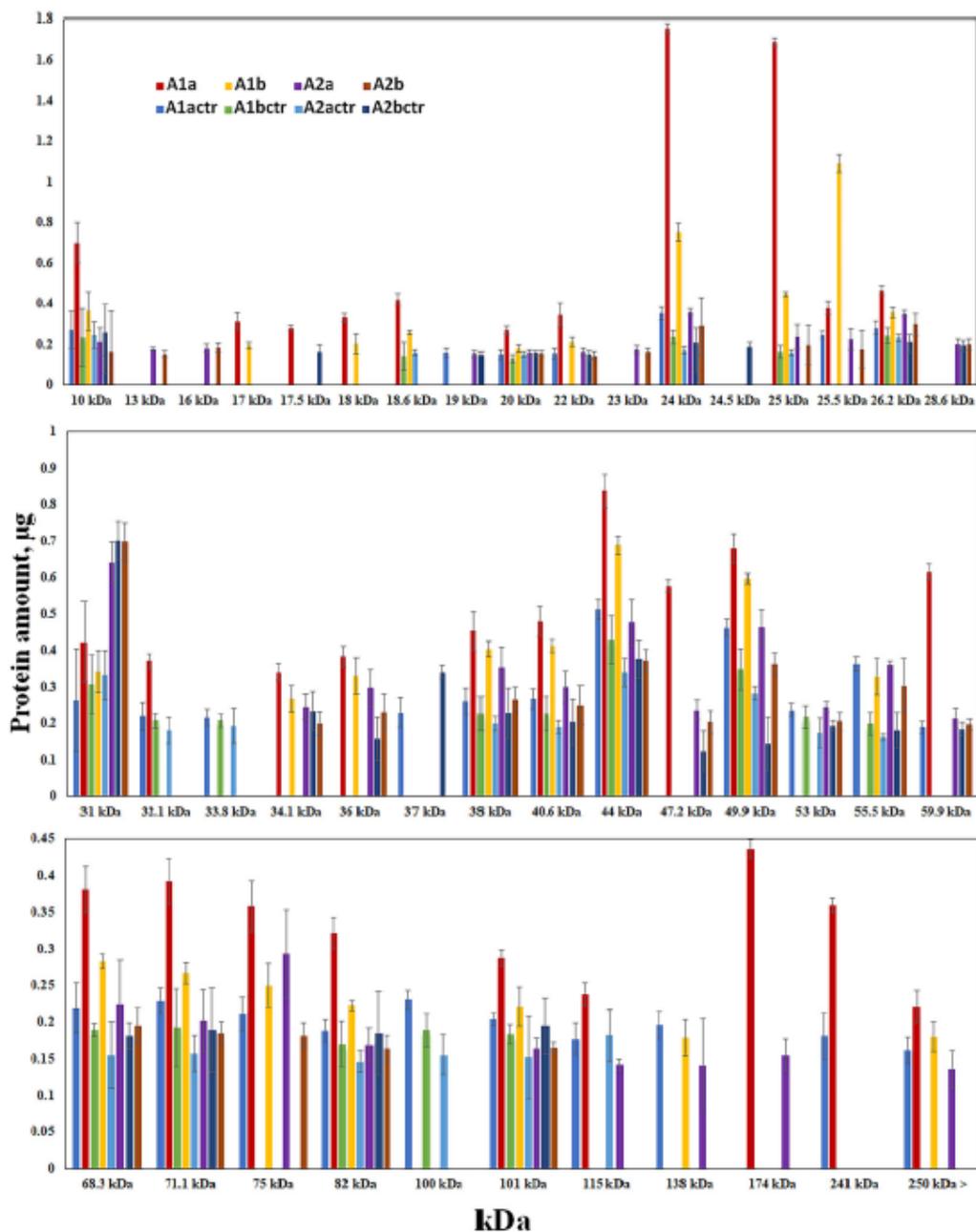


Figure 7. Histogram of subfractions A1a to A2b by SDS PAGE 1-DE. Tracking of all signals versus controls. Cultures B[a]P activated through 72h and again B[a]P exposed (266 ng mL^{-1}), controls non-B[a]P activated.

Furthermore, the biodegradation of the protein components could be followed until the fractionation of ICE, but not with the concentrated ECE, suggesting that the filtration process is responsible for the loss of a cofactor.

This work improves the knowledge of the PAHs biodegradation process by microalgae species and is recommended for future studies. Furthermore, SEC fraction extracts obtained from algae species can be subjected to protein characterization techniques to complete the study of the

degradation pathway. Finally, some protein components can be subjected to biotechnological processes to be used in essential tasks of bioremediation.

Acknowledgments

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT) project CB No. 283377 is thanked for the budget support and the doctoral scholarship awarded to J. E. Becerril Mercado No. 577195. Dirección General de Asuntos de Personal Académico from Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA-UNAM) is also thanked for the PAPIIT IT202718 project and to the PAIP project 50009034 of the Faculty of Chemistry, UNAM. Finally, the authors thank R. Covarrubias Herrera for the technical assistance for liquid chromatography.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

Funding

This work was supported by Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México; Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química.

References

1. S. Zhang, Z. Hu, and H. Wang, "Metagenomic Analysis Exhibited the Co-Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Bacterial Community from Estuarine Sediment," *Environment International* 129 (2019): 308–19. doi:10.1016/j.envint.2019.05.028
2. A. K. Haritash, and C. P. Kaushik, "Biodegradation Aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): a Review," *Journal of Hazardous Materials* 169, no. 1–3 (2009): 1–15. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.03.137
3. S. Guntupalli, V. B. S. C. Thunuguntla, L. M. Chakraborty, C. V. Rao, and J. S. Bondili, "Degradation and Metabolite Profiling of Benz (a) Anthracene, Dibenz (a, h) Anthracene and Indeno [1, 2, 3-cd] Pyrene by *Aspergillus terricola*," *Polycyclic Aromatic Compounds* 39, no. 1 (2019): 84–92. doi:10.1080/10406638.2016.1262878
4. R. Li, J. Cai, J. Li, Z. Wang, P. Pei, J. Zhang, and P. Krebs, "Characterizing the Long-Term Occurrence of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Their Driving Forces in Surface Waters," *Journal of Hazardous Materials* 423 (2022): 127065. doi:10.1016/j.jhazmat.2021.127065
5. S. Srivastava, and M. Kumar, "Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A Sustainable Approach," in *Sustainable Green Technologies for Environmental Management*, edited by S. Shah, V. Venkatraman and R. Prasad, 1st ed. (Singapore: Springer, 2019), 111–39. doi:10.1007/978-981-13-2772-8_6
6. W. Yang, Z. Cao, and Y. Lang, "Pollution Status of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Northeastern China: A Review and Metanalysis," *Environmental Processes* 8, no. 2 (2021): 429–54. doi:10.1007/s40710-020-00489-6
7. H. Chen, X. Diao, and H. Zhou, "Tissue-Specific Metabolic Responses of the Pearl Oyster *Pinctada Martensii* Exposed to Benzo[a]Pyrene," *Marine Pollution Bulletin* 131, no. Pt A (2018): 17–21. doi:10.1016/j.marpolbul.2018.03.057
8. L. Z. Fanali, L. Franco-Belussi, C. R. Bonini-Domingos, and C. de Oliveira, "Effects of Benzo[a]Pyrene on the Blood and Liver of *Physalaemus Cuvieri* and *Leptodactylus fuscus* (Anura: Leptodactylidae)," *Environmental Pollution* 237 (2018): 93–102. doi:10.1016/j.envpol.2018.02.030
9. W. Qin, F. Q. Fan, Y. Zhu, Y. Wang, X. Liu, A. Ding, and J. Dou, "Comparative Proteomic Analysis and Characterization of Benzo (a) Pyrene Removal by *Microbacterium* sp. strain M. CSW3 under Denitrifying Conditions," *Bioprocess and Biosystems Engineering* 40, no. 12 (2017): 1825–38. doi:10.1007/s00449-017-1836-5
10. P. Giovannella, G. A. L. Vieira, I. V. Ramos Otero, E. Pais Pellizzer, B. de Jesus Fontes, and L. D. Sette, "Metal and Organic Pollutants Bioremediation by Extremophile Microorganisms," *Journal of Hazardous Materials* 382 (2020): 121024. doi:10.1016/j.jhazmat.2019.121024
11. S. R. Subashchandrabose, M. Megharaj, K. Venkateswarlu, and R. Naidu, "Interaction Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Heavy Metals on a Soil Microalga, *Chlorococcum* sp. MM11," *Environmental Science and Pollution Research International* 22, no. 12 (2015): 8876–89. doi:10.1007/s11356-013-1679-9

12. R. C. Prince, "Bioremediation of Marine Oil Spills," in *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, edited by Terry McGenity, Jan Roelof van der Meer and Victor de Lorenzo, 1st ed. (Berlin, Germany: Springer-Verlag, 2010), 2617–30. doi:10.1007/978-3-540-77587-4
13. A. Nzila, "Biodegradation of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons under Anaerobic Conditions: Overview of Studies, Proposed Pathways, and Future Perspectives," *Environmental Pollution* 239 (2018): 788–802. doi:10.1016/j.envpol.2018.04.074
14. J. S. Seo, Y. S. Keum, and Q. X. Li, "Bacterial Degradation of Aromatic Compounds," *International Journal of Environmental Research and Public Health* 6, no. 1 (2009): 278–309. doi:10.3390/ijerph6010278
15. W. Wang, L. Wang, and Z. Shao, "Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Degradation Pathways of the Obligate Marine PAH Degradator *Cycloclasticus* sp. strain P1," *Applied and Environmental Microbiology* 84, no. 21 (2018): 1–15. doi:10.1128/AEM.01261-18
16. A. Imam, S. Kumar, P. K. Kanaujia, and A. Ray, "Biological Machinery for Polycyclic Hydrocarbons Degradation: A Review," *Bioresource Technology* 343 (2022): 126121. doi:10.1016/j.biortech.2021.126121
17. H. I. Abdel-Shafy, and M. S. M. Mansour, "A Review on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Source, Environmental Impact, Effect on Human Health and Remediation," *Egyptian Journal of Petroleum* 25, no. 1 (2016): 107–23. doi:10.1016/j.ejpe.2015.03.011
18. A. Arun, and M. Eyini, "Comparative Studies on Lignin and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Degradation by Basidiomycetes Fungi," *Bioresource Technology* 102, no. 17 (2011): 8063–70. doi:10.1016/j.biortech.2011.05.077
19. C. Teng, S. Wu, and G. Gong, "Bio-Removal of Phenanthrene, 9-Fluorenone and Anthracene-9, 10-Dione by Laccase from *Aspergillus Niger* in Waste Cooking Oils," *Food Control* 105 (2019): 219–25. doi:10.1016/j.foodcont.2019.06.015
20. C. E. Cerniglia, "Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons," *Current Opinion in Biotechnology* 4, no. 3 (1993): 331–8. doi:10.1016/0958-1669(93)90104-5
21. R. A. Kanaly, and S. Harayama, "Advances in the Field of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Biodegradation by Bacteria," *Microbial Biotechnology* 3, no. 2 (2010): 136–64. doi:10.1111/j.1751-7915.2009.00130.X
22. E. Vandra, M. Samiotaki, M. Parapouli, G. Panayotou, and A. I. Koukoku, "Comparative Proteomic Analysis of *Arthrobacter phenanthrenivorans* Spe3 on Phenanthrene, Phthalate and Glucose," *Journal of Proteomics* 113, no. 15 (2015): 73–89. doi:10.1016/j.jprot.2014.08.018
23. A. A. Khan, R. F. Wang, W. W. Cao, D. R. Doerge, D. Wennerstrom, and C. E. Cerniglia, "Molecular Cloning, Nucleotide Sequence, and Expression of Genes Encoding a Polycyclic Aromatic Ring Dioxygenase from *Mycobacterium* sp. Strain PYR-1," *Applied and Environmental Microbiology* 67, no. 8 (2001): 3577–85. doi:10.1128/AEM.67.8.3577-3585.2001
24. S. E. Lee, J. S. Seo, Y. S. Keum, K. J. Lee, and Q. X. Li, "Fluoranthene Metabolism and Associated Proteins in *Mycobacterium* sp. JS14," *Proteomics* 7, no. 12 (2007): 2059–69. doi:10.1002/PMIC.200600489
25. J. M. Navarro-Llorens, M. A. Patrauchan, G. R. Stewart, J. E. Davies, L. D. Eltis, and W. W. Mohn, "Phenylacetate Catabolism in *Rhodococcus* sp. strain RHA1: A Central Pathway for Degradation of Aromatic Compounds," *Journal of Bacteriology* 187, no. 13 (2005): 4497–504. doi:10.1128/JB.187.13.4497-4504.2005
26. S. Krivobok, S. Kuony, C. Meyer, M. Louwagie, J. C. Willison, and Y. Jouanneau, "Identification of Pyrene-Induced Proteins in *Mycobacterium* sp. strain 6PY1: Evidence for Two Ring-Hydroxylating Dioxygenases," *Journal of Bacteriology* 185, no. 13 (2003): 3828–41. doi:10.1128/JB.185.13.3828-3841.2003
27. B. Brezna, O. Kweon, R. L. Stingley, J. P. Freeman, A. A. Khan, B. Polek, R. C. Jones, and C. E. Cerniglia, "Molecular Characterization of Cytochrome P450 Genes in the Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degrading *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1," *Applied Microbiology and Biotechnology* 71, no. 4 (2006): 522–32. doi:10.1007/s00253-005-0190-8
28. S. J. Kim, R. C. Jones, C. J. Cha, O. Kweon, R. D. Edmondson, and C. E. Cerniglia, "Identification of Proteins Induced by Polycyclic Aromatic Hydrocarbon in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 Using Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis and de Novo Sequencing Methods," *Proteomics* 4, no. 12 (2004): 3899–908. doi:10.1002/PMIC.200400872
29. C. E. Cerniglia, G. L. White, and R. H. Heflich, "Fungal Metabolism and Detoxification of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons," *Archives of Microbiology* 143, no. 2 (1985): 105–10. doi:10.1007/BF00411031
30. J. F. Masfaraud, A. Pfohl-Leszkowic, C. Malaveille, G. Keith, and G. Monod, "7-ethylresorufin O-Deethylase Activity and Level of DNA-Adducts in Trout Treated with Benzo(a)Pyrene," *Marine Environmental Research* 34, no. 1–4 (1992): 351–4. doi:10.1016/0141-1136(92)90133-7
31. H. Mehdi, A. Moslem, and C. Simone, "Biodegradation of Aromatic Compounds," in *Biodegradation and Bioremediation of Polluted Systems – New Advances and Technologies* (London: Intech Open, 2015). 109–23. doi:10.5772/60894

32. P. Kumar Agrawal, R. Shrivastava, and Ji. Verma, "Bioremediation Approaches for Degradation and Detoxification of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons," in *Emerging and Eco-Friendly Approaches for Waste Management* (Berlin, Germany: Springer, 2018), 99–119. doi:10.1007/978-981-10-8669-4_6
33. M. Mohtashami, J. Fooladi, A. Haddad-Mashadrizeh, and M. Housaindokht, "Molecular Cloning, Expression, and Characterization of *poxa1b* Gene from *Pleurotus ostreatus*," *Molecular Biology Reports* 46, no. 1 (2019): 981–90. doi:10.1007/S11033-018-4555-3
34. S. Ben Younes, and S. Sayadi, "Purification and Characterization of a Novel Trimeric and Thermotolerant Laccase Produced from the Ascomycete *Scytalidium Thermophilum* Strain," *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 73, no. 1–4 (2011): 35–42. doi:10.1016/j.molcatb.2011.07.014
35. S. R. Subashchandrabose, P. Logeshwaran, K. Venkateswarlu, R. Naidu, and M. Megharaj, "Pyrene Degradation by *Chlorella* sp.MM3 in Liquid Medium and Soil Slurry: Possible Role of Dihydrolipoamide Acetyltransferase in Pyrene Biodegradation," *Algal Research* 23 (2017): 223–32. doi:10.1016/j.algal.2017.02.010
36. J. Luo, J. Deng, L. Cui, P. Chang, X. Dai, C. Yang, N. Li, Z. Ren, and X. Zhang, "The Potential Assessment of Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii* CC-503 in the Biodegradation of Benz(a)Anthracene and the Related Mechanism Analysis," *Chemosphere* 249 (2020): 126097–9. doi:10.1016/j.chemosphere.2020.126097
37. J. J. Olmos-Espejel, M. P. García de Llasera, and M. Velasco-Cruz, "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, no. 2 (2012): 138–47. doi:10.1016/j.chroma.2012.09.015
38. F. J. Hernández Blanco, and M. P. García de Llasera, "Monitoring Dihydrodiol Polyaromatic Hydrocarbon Metabolites Produced by the Freshwater Microalgae *Selenastrum Capricornutum*," *Chemosphere* 158 (2016): 80–90. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.05.065
39. D. Warshawsky, T. Cody, M. Radike, R. Reilman, B. Schumann, K. LaDow, and J. Schneider, "Biotransformation of Benzo[a]Pyrene and Other Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Heterocyclic Analogs by Several Green Algae and Other Algal Species under Gold and White Light," *Chemico-Biological Interactions* 97, no. 2 (1995): 131–48. doi:10.1016/0009-2797(95)03610-X
40. L. Ke, L. Luo, P. Wang, T. Luan, and N. F. Y. Tam, "Effects of Metals on Biosorption and Biodegradation of Mixed Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by a Freshwater Green Alga *Selenastrum Capricornutum*," *Bioresource Technology* 101, no. 18 (2010): 6950–61. doi:10.1016/j.biortech.2010.04.011
41. M. A. Heitkamp, and C. E. Cerniglia, "Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation by a *Mycobacterium* sp. in Microcosms Containing Sediment and Water from a Pristine Ecosystem," *Applied and Environmental Microbiology* 55, no. 8 (1989): 1968–73. doi:10.1128/aem.55.8.1968-1973.1989
42. Y. Wen, L. Chen, J. Li, D. Liu, and L. Chen, "Recent Advances in Solid-Phase Sorbents for Sample Preparation Prior to Chromatographic Analysis," *Trac Trends in Analytical Chemistry* 59 (2014): 26–41. doi:10.1016/j.trac.2014.03.011
43. B. Hans-Ulrich, and K. Gawehn, "Determination of Concentration of Metabolites (End-Point Methods)," in *Methods of Enzymatic Analysis*, edited by Hans Ulrich Bergmeyer and Karlfried Gawehn, vol. 1, 2nd ed. (Weinheim: Academic Press, Inc, 1974), 103–21. doi:10.1016/B978-0-12-091304-6.X5001-0
44. K. S. Khoo, K. W. Chew, G. Y. Yew, S. Manickam, C. W. Ooi, and P. L. Show, "Integrated Ultrasound-Assisted Liquid Biphasic Flotation for Efficient Extraction of Astaxanthin from *Haematococcus Pluvialis*," *Ultrasonics Sonochemistry* 67 (2020): 105052–9. doi:10.1016/j.ultsonch.2020.105052
45. Y. Li, N. Sun, X. Hu, Y. Li, and C. Deng, "Recent Advances in Nanoporous Materials as Sample Preparation Techniques for Peptidome Research," *Trends in Analytical Chemistry* 120 (2019): 115658–13. doi:10.1016/j.trac.2019.115658
46. K. Brezinski, and B. Gorczyca, "An Overview of the Uses of High-Performance Size Exclusion Chromatography (HPSEC) in the Characterization of Natural Organic Matter (NOM) in Potable Water, and Ion-Exchange Applications," *Chemosphere* 217 (2019): 122–39. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.10.028
47. Daniel C. "Harries "Quality Assurance and Calibrations Methods (Standard Addition)," in *Quantitative Chemical Analysis*, 8th ed. (New York, NY: W.H. Freeman and Company, 2010), 106–8.
48. H. Cao, C. Wang, H. Liu, W. Jia, and H. Sun, "Enzyme Activities during Benzo[a]Pyrene Degradation by the Fungus *Lasiodiplodia Theobromae* Isolated from a Polluted Soil," *Scientific Reports* 10, no. 1 (2020): 1–11. doi:10.1038/s41598-020-57692-6
49. C. Xu, W. Yang, L. Wei, Z. Huang, W. Wei, and A. Lin, "Enhanced Phytoremediation of PAHs-Contaminated Soil from an Industrial Relocation Site by *Ochrobactrum* sp.," *Environmental Science and Pollution Research International* 27, no. 9 (2020): 8991–9. doi:10.1007/s11356-019-05830-7
50. A. C. Fuentes, "Metodología Analítica Para la Determinación de Metabolitos del Benzo(a)Pireno Formados Por Enzimas Intra- y Extra- Celulares de *Selenastrum capricornutum* [Analytical Methodology for the

- Determination of Benzo(a)Pyrene Metabolites Formed by Intra- and Extra- Cellular Enzymes of *Selenastrum capricornutum*” (Bche dissertation, Universidad Nacional Autónoma de México, 2019).
51. M. P. García de Llasera, A. C. Fuentes Pérez, G. Peralta Marín, and E. G. Beltrán Calva, “First Evidence of Extracellular Enzymatic Degradation of Benzo(a)Pyrene by the Phytoplankton Species *Selenastrum Capricornutum* and the Influence of Temperature,” *Environmental Advances* 8, no. 1–3 (2022): 100246–15. doi:10.1016/j.envadv.2022.100246
 52. M. Méndez García, and M. P. García de Llasera, “A Review on the Enzymes and Metabolites Identified by Mass Spectrometry from Bacteria and Microalgae Involved in the Degradation of High Molecular Weight PAHs,” *The Science of the Total Environment* 797 (2021): 149035–25. doi:10.1016/j.scitotenv.2021.149035
 53. A. Chemerys, E. Pelletier, C. Cruaud, F. Martin, F. Violet, and Y. Jouanneau, “Characterization of Novel Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Dioxygenases from the Bacterial Metagenomic DNA of a Contaminated Soil,” *Applied and Environmental Microbiology* 80, no. 21 (2014): 6591–600. doi:10.1128/AEM.01883-14
 54. A. Hunold, W. Escobedo-Hinojosa, E. Potoudis, D. Resende, T. Farr, P. O. Syrén, and B. Hauer, “Assembly of a Rieske Non-Heme Iron Oxygenase Multi-Component System from *Phenylobacterium immobile* E DSM 1986 Enables Pyrazon Cis-Dihydroxylation in *E. coli*,” *Applied Microbiology and Biotechnology* 105, no. 5 (2021): 2003–15. doi:10.1007/S00253-021-11129-W
 55. C. E. Cerniglia, “Recent Advances in the Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Mycobacterium Species,” in *The Utilization of Bioremediation to Reduce Soil Contamination: Problems and Solutions*, edited by Václav Sasek, John A. Glaser and Philippe Baveye, 1st ed. (Amsterdam, the Netherlands: Springer, 2003), 51–73. doi:10.1007/978-94-010-0131-1_4
 56. A. Luo, Y. Wu, Y. Xu, J. Kan, J. Qiao, L. Liang, T. Huang, and Z. Hu, “Characterization of a Cytochrome P450 Mono-Oxygenase Capable of High Molecular Weight PAHs Oxidization from *Rhodococcus* sp. P14,” *Process Biochemistry* 51, no. 12 (2016): 2127–33. doi:10.1016/j.procbio.2016.07.024
 57. S. R. Subashchandrabose, K. Venkateswarlu, R. Naidu, and M. Megharaj, “Biodegradation of High-Molecular Weight PAHs by *Rhodococcus wratislaviensis* Strain 9: Overexpression of Amidohydrolase Induced by Pyrene and BaP,” *The Science of the Total Environment* 651, no. Pt 1 (2019): 813–21. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.09.192
 58. Y. Jouanneau, C. Meyer, J. Jakoncic, V. Stojanoff, and J. Gaillard, “Characterization of a Naphthalene Dioxygenase Endowed with an Exceptionally Broad Substrate Specificity toward Polycyclic Aromatic Hydrocarbons,” *Biochemistry* 45, no. 40 (2006): 12380–91. doi:10.1021/bi0611311