



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**BIOREMOCIÓN DE CONTAMINANTES ORGÁNICOS DE MEDIO ACUOSO  
CON SISTEMAS ALGALES**

**TESIS**

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA

**I.Q.I. MAYRA LEÓN SANTIAGO**

TUTOR

**DRA. MARTHA PATRICIA GARCÍA CAMACHO**  
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

MÉXICO, Cd. Mx., 2016



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**

**BIOREMOCIÓN DE CONTAMINANTES ORGÁNICOS DE MEDIO ACUOSO  
CON SISTEMAS ALGALES**

TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
**MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA

I.Q.I. MAYRA LEON SANTIAGO



México, Cd. Mx.

2016

## JURADO ASIGNADO

Presidente	Dra. María del Pilar Cañizares Macías.
Vocal	Dr. Víctor Manuel Luna Pabello.
Vocal	Dra. Josefina Barrera Cortés.
Vocal	Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez.
Secretario	Dr. Eduardo Rodríguez de San Miguel Guerrero.

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

---

Dra. Martha Patricia García Camacho  
Tutor

Parte de este trabajo se presentó en el XXVIII Congreso Nacional de Química Analítica en Ixtapa, Guerrero, México (Junio 2015) y en la Jornada de la Investigación de la Facultad de Química (Octubre 2015)

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, por volverse mi segunda casa. Muchas gracias por permitirme seguir mi formación académica. Ser parte de la comunidad universitaria ha sido una experiencia increíble y muy grata.

Al programa del Posgrado de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas, por preocuparse en tener docentes de calidad y brindarnos un excelente programa.

A la Dirección General de Asuntos de Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México DGAPA-UNAM, proyecto PAPIIT IT203214.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACyT, por el apoyo en el proyecto de Ciencia Básica 166389 y la beca otorgada para la realización de los estudios de maestría (No. de becario 336019).

A mi tutora, la Dra. Martha Patricia García Camacho, por compartirme su conocimiento, experiencia, confianza y su gran paciencia. Le agradezco infinitamente haberme permitido ser parte de su equipo de trabajo.

A los miembros del jurado, por las valiosas aportaciones realizadas a este trabajo.

A la M. en C. María del Rosario Covarrubias Herrera por su amistad, su valioso apoyo y consejos, han sido una guía en este camino.

A mis padres, la Sra. María Gloria de Santiago Jiménez y el Sr. Silvestre Alejandro León Muñoz, les agradezco su cariño y confianza, todo su esfuerzo para brindarme siempre lo necesario y por educarme de la mejor manera que les fue posible, ¡¡Mil gracias queridos padres!!

A mi compañero de vida, Gerardo Ahmed Cruz Moreno, querido esposo mío, gracias por tu amor incondicional, la confianza, el apoyo, por las risas y la sinceridad de tus palabras. Estos dos años han sido geniales, sigamos trabajando por nuestro futuro.

A mis hermanas, Nora Elva y Dalia. Gracias por todo hermanitas, por la confianza, las risas, los momentos buenos o malos, siempre se aprende algo. Alejandrita, mi niña, gracias por dejarme ser tu amiga y compañera de juegos, te amo de aquí al sol y de regreso; Saritah y Teyita, las amo mis niñas y aunque el tiempo para convivir no siempre es suficiente, siempre están conmigo en pensamiento.

A mi familia política, la familia Cruz Moreno. Gracias por todo su apoyo, confianza y cariño, muchísimas gracias Sr. Gerardo, Sra. Tere, Nina y Adrián.

A mis compañeros de laboratorio Fernando Blanco, Enrique García, Fernando Villeda, Eduardo Loera y Jorge Castro, chicos gracias por su amistad y buenos momentos, he aprendido mucho de ustedes, sigan alcanzando sus metas. Everardo Tapia, gracias por tu amistad, apoyo y confianza, por compartirme tu conocimiento y ser un excelente compañero de trabajo y amigo.

A mis grandes amigos del Politécnico: Nallely Oropeza, Viridiana Díaz, Marco Muñoz, Susana Monroy y mi hermanito Rey Francisco, sigamos conservando esta amistad; y por supuesto un agradecimiento especial a la Ing. Lilia Palacios, por su amistad y apoyo.

A mi tía Consuelo de Santiago, Xochitl Hernández, Jorge Ruiz, Clementina Alvarado, Ing. Germán Espinosa Chavarría (Bufete Químico), familia Gómez-Valentínez y a todos aquellos que han sido parte de mi vida (familiares, compañeros de estudio y de trabajo), ¡¡muchas gracias!!

	<b>Página</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	10
<b>INDICE DE TABLAS</b>	11
<b>INDICE DE FIGURAS</b>	12
<b>RESUMEN</b>	14
<b>INTRODUCCIÓN</b>	15
<b>OBJETIVOS</b>	17
<b>CAPITULO 1 ANTECEDENTES</b>	18
<b>1.1 Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos</b>	18
1.1.1 Estructura y propiedades fisicoquímicas	18
1.1.2 Fuentes de producción	20
1.1.3 Toxicología de los HAPs	21
1.1.4 Límites Máximos Permisibles de los HAPs	22
<b>1.2 Análisis de HAPs en muestras acuosas</b>	24
1.2.1 Técnicas de Extracción	24
1.2.2 Extracción en Fase sólida (EFS)	24
1.2.3 Métodos de análisis de HAPs en muestras acuosas	28
<b>1.3 Contaminación en agua por HAPs</b>	31
1.3.1. Aguas superficiales	31
1.3.2 Aguas subterráneas	31
1.3.3 Agua potable	32
<b>1.4 Bioremediación</b>	32
<b>1.5 Bioreactores</b>	34
<b>1.6 Generalidades sobre las algas</b>	38
1.6.1 Microalga <i>Selenastrum capricornutum</i>	40
1.6.2 Microalga <i>Scenedesmus acutus</i>	40
<b>1.7 La inmovilización de células</b>	41
1.7.1 Inmovilización pasiva	41
1.7.2 Inmovilización activa	42
1.7.3 La inmovilización de microalgas	42
<b>1.8 Alginato como matriz inmovilizadora</b>	44
1.8.1 Estructura química del alginato de Na	45
1.8.2 Preparación de la matriz alginato	46
1.8.3 Mecanismos de gelificación con alginato	48
<b>CAPITULO 2 DESARROLLO EXPERIMENTAL</b>	49
<b>2.1 Equipos, materiales, disolventes y reactivos</b>	49
2.1.1 Equipos	49
2.1.2 Material	50
2.1.3 Reactivos y disolventes	50
2.1.4 Microorganismos	51
<b>2.2 Experimentación</b>	51
<b>2.2.1 Metodología analítica</b>	51
2.2.1.1 Optimización de la separación cromatográfica y detección	52
2.2.1.1.1 Selección de la longitud de onda	52
2.2.1.1.2 Selección de la fase móvil	52
2.2.1.2 Validación del sistema cromatográfico	53
2.2.1.2.1 Linealidad del sistema	53
2.2.1.2.2 Límites de detección (L.D.) y cuantificación (L.C.) instrumentales	53



2.2.1.2.3	Precisión	53
2.2.1.3	Optimización de la Extracción en Fase sólida (EFS)	54
2.2.1.4	Validación del método de EFS-CLAR-UV	54
2.2.1.4.1	Linealidad	55
2.2.1.4.2	Límites de detección (L.D.) y cuantificación (L.C.) del método	55
2.2.1.4.3	Precisión	56
<b>2.2.2</b>	<b>Manejo de microalgas</b>	57
2.2.2.1	Cultivo de microalgas	57
2.2.2.2	Inmovilización de microalgas en las cuentas de alginato y supervivencia	58
2.2.2.3	Bioensayos de exposición	60
2.2.2.3.1	Evaluación de la remoción en diferentes tiempos	61
2.2.2.3.2	Evaluación de la remoción variando las características biológicas en la perla	62
2.2.2.4	HAPs en la biomasa	65
<b>2.2.3</b>	<b>Bioreactores</b>	66
2.2.3.1	Diseño y evaluación de los diseños	66
2.2.3.2	Optimización de los parámetros de operación	68
2.2.3.2.1	Modificación del flujo	68
2.2.3.2.2	Modificación del tiempo de contacto estático	70
2.2.3.2.3	Recirculación del medio	70
2.2.3.2.4	Cambio de la proporción volumen muestra acuosa-perlas	73
<b>CAPITULO 3</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	77
<b>3.1</b>	<b>Metodología analítica</b>	77
3.1.1	Optimización de la separación cromatográfica y detección	77
3.1.1.1	Selección de la longitud de onda	77
3.1.1.2	Selección de la fase móvil	77
3.1.2	Validación del sistema cromatográfico	79
3.1.2.1	Linealidad	79
3.1.2.2	Límites de detección (L.D.) y cuantificación (L.C.) instrumentales	79
3.1.2.3	Precisión	80
3.1.3	Optimización de la Extracción en Fase sólida (EFS)	80
3.1.4	Validación del método de EFS-CLAR-UV	81
3.1.4.1	Linealidad	81
3.1.4.2	Límites de detección (L.D.) y cuantificación (L.C.) del método	82
3.1.4.3	Precisión	83
<b>3.2.</b>	<b>Manejo de microalgas</b>	83
3.2.1	Cultivo de microalgas	83
3.2.2	Inmovilización de microalgas en las cuentas de alginato y supervivencia	83
3.2.3	Bioensayos de exposición	85
3.2.3.1	Evaluación de la remoción en diferentes tiempos	85
3.2.3.2	Evaluación de la remoción variando las características biológicas en la perla	88
3.2.4	HAPs en la biomasa	91

3.2.5 Comparación de la remoción entre microalgas inmovilizadas y microalgas libres	92
<b>3.3 Bioreactores</b>	93
3.3.1 Diseño y evaluación de los diseños	93
3.3.2 Optimización de los parámetros de operación	95
3.3.2.1 Modificación del flujo	95
3.3.2.2 Modificación al tiempo de contacto	97
3.3.2.3 Recirculación del medio	98
3.3.2.4 Cambio de la proporción volumen muestra acuosa-perlas	98
<b>CAPITULO 4 CONCLUSIONES</b>	102
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	104

## LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
ACE	Acenafteno
ACF	Acenaftileno
ACN	Acetonitrilo
ANT	Antraceno
AP	Agua potable
BaA	Benzo[a]antraceno
BaP	Benzo[a]pireno
BCO	Perlas de alginato de calcio, sin microalgas
BTEX	Benceno, Tolueno, Etilbenceno y Xilenos
BbF	Benzo[b]fluoranteno
BkF	Benzo[k]fluoranteno
B(g,h,i)P	Benzo(g,h,i)perileno
C18	Fase Octadecilsilano
CONAGUA	Comisión Nacional del Agua
CLAR-UV	Cromatografía de líquidos de alta resolución con detección UV
CG	Cromatografía de gases
CRIS	Criseno
DAD	Detector de arreglo de diodos
DIF	Detector de Ionización de Flama
DCM	Dibenzoantraceno
DBA	Dibenzoantraceno
EFS	Extracción en Fase Sólida
ELL	Extracción líquido-líquido
EM	Espectrómetro de masas
EPA	Environmental Protection Agency
FLD	Detector de Fluorescencia
F (1, 2, 3, 4)	Flujo
FLU	Fluoreno
FE	Fenantreno
FLUA	Fluoranteno
HAP	Hidrocarburo Aromático Policíclico
HXN	Hexano
I(c,d)P	Indeno[c,d]pireno
IPA	Alcohol isopropílico, 2-propanol, isopropanol
LMP	Límites máximos permisivos
MWNCT	Nanotubos de carbono
NOM	Norma Oficial Mexicana
NAF	Naftaleno
PIR	Pireno
R (1, 2, 3)	Volumen recolectado de 15 mL por ciclo de operación del bioreactor
SAC	Perlas de alginato- <i>S. acutus</i>
SCAP	Perlas de alginato- <i>S. capricornutum</i>
SSA	Secretaría de Salud
SEMARNAT	Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales
TE (1, 2)	Tiempo estático
TD (1, 2, 3)	Tiempo dinámico

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Descripción</b>	<b>Página</b>
1.1	Propiedades fisicoquímicas de los 16 HAPs prioritarios	19
1.2	Límites máximos permisibles para hidrocarburos específicos en suelo	23
1.3	Lineamientos de calidad del agua (fragmento)	23
1.4	Mecanismos de interacción de los adsorbentes para EFS y analitos	25
1.5	Ejemplos de técnicas de extracción y análisis para la determinación de HAPs en diferentes tipos de agua.	30
1.6	Clasificación de las algas	39
1.7	Bioremediación de contaminantes en agua, utilizando microalgas inmovilizadas en alginato de calcio	44
2.1	Concentraciones presentes en el medio y su concentración equivalente en el extracto	55
2.2	Composición del medio Bristol	58
2.3	Identificación de los bioensayos realizados, variando las características de la perla de alginato	65
3.1	Evaluación de los parámetros cromatográficos	78
3.2	Validación del sistema cromatográfico para la determinación de HAPs.	80
3.3	Validación del método de EFS-CLAR-UVS para la determinación de HAPs	83
3.4	Porcentaje de HAP removido a los diferentes tiempos de exposición	88
3.5	Porcentaje de HAP removido variando las características de las perlas	90
3.6	Cantidades de HAPs, encontradas en medio acuoso y biomasa	92
3.7	Parámetros para la evaluación de los reactores propuestos.	94
3.8	Comparación del % de remoción de los HAPs, utilizando diferentes bioreactores.	95
3.9	Microgramos recuperados ( $\pm$ desviación estándar) y % de remoción de los HAPs, con dos bioreactores de diferente volumen (n=3)	101

## INDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
1.1	Fuentes de emisión de HAPs y posibles destinos en el ambiente.	21
1.2	Procedimiento general para la elección del tipo de fase en la EFS, de acuerdo al tipo de muestra y analito	26
1.3	Cartuchos de Extracción en Fase Sólida.	27
1.4	Procedimiento para llevar a cabo la extracción en Fase Sólida.	28
1.5	Reactor de agitación continua.	35
1.6	Reactor de lecho fijo.	36
1.7	Reactor de lecho fluidizado	37
1.8	Reactor de membrana	37
1.9	Muestra de un cultivo de <i>S. capricornutum</i>	40
1.10	Muestra de un cultivo de <i>S. acutus</i>	40
1.11	Estructuras del ácido b-D Manurónico (izquierda) y a-L Gulurónico (derecha)	45
1.12	Estructura química del alginato de sodio	46
1.13	Modelo caja de huevo del alginato de Ca	46
1.14	Diferentes diseños de equipos para producir grandes cantidades de perlas de alginato-microorganismos	47
2.1	Elementos que constituyen la experimentación	51
2.2	Cromatógrafo Knauer	53
2.3	Cultivos de las microalgas. Medio sólido (izquierda) y medio líquido (derecha).	58
2.4	Esterilización del alginato de sodio, a través de un sistema de filtración.	59
2.5	Procedimiento seguido para inmovilizar las microalgas	60
2.6	Perlas de alginato-microalga obtenidas de la inmovilización.	60
2.7	Procedimiento general para llevar a cabo los ensayos de exposición y el posterior tratamiento de la muestra, previo al análisis cromatográfico	61
2.8	Procedimiento general para evaluar los diferentes diseños del bioreactor	68
2.9	Procedimiento seguido al modificar el flujo	70
2.10	Procedimiento seguido al modificar el tiempo de contacto estático	72
2.11	Procedimiento seguido al realizar la recirculación del medio	73
2.12	Procedimiento seguido al cambiar la proporción de volumen muestra acuosa-perlas	76
3.1	Espectros UV de los HAPs estudiados. A) Benzo[a]Antraceno, B) Benzo[a]Pireno.	77
3.2	Cromatogramas obtenidos utilizando diferente fase móvil. 100% Metanol (azul) 95:5 Metanol:Agua (rojo). Leídos a A) $\lambda=263$ nm B) $\lambda=287$ nm.	78
3.3	Curvas de calibración de B[a]A y B[a]P	79

3.4	Cromatogramas obtenidos de los extractos utilizando el método de EFS .	81
3.5	Curvas de calibración de B[a]A y B[a]P para el método EFS-CLAR-UV.	82
3.6	Linealidad del método de EFS-CLAR-UV.	82
3.7	Comparación del crecimiento de <i>S. acutus</i> durante un mes.	84
3.8	Comparación de microalgas antes y después de ser inmovilizadas y liberadas del alginato un mes después.	84
3.9	<b>a)</b> Microfotografía por microscopía electrónica de barrido de la superficie de una perla de alginato (que contiene inmovilizada conjuntamente a <i>Chlorella sorokiniana</i> y <i>Azospirillum brasilense</i> ) después de la incubación durante 48 h en agua residual regular. <b>b)</b> Ampliación de la perla, las flechas negras indican protuberancias y las flechas blancas indica poros. <b>c)</b> Corte de la perla, las flechas muestran las cavidades internas típicas de perlas de alginato. <b>d)</b> Típica cavidad de poro de la superficie de las perlas.	85
3.10	Agitador orbital con controlador de temperatura.	87
3.11	Porcentajes de remoción de los ensayos de exposición de los diferentes sistemas a distintos tiempos.	87
3.12	Comparación del BaA y BaP removidos del medio, con las modificaciones propuestas.	89
3.13	Reactor de tubo recto	93
3.14	Reactor en espiral	93
3.15	Reactor de "S"	93
3.16	Comparación de los % de remoción entre blancos y perlas con microalgas, variando flujos	96
3.17	Remoción con dos tiempos de contacto estático	97
3.18	Comparación de la remoción entre las perlas con microalgas y el blanco, en el reactor de 50 mL.	99
3.19	Comparación de la Remoción en los dos tamaños del reactor, proporciones 4:1 vs 2:1 y 6:1 vs 2:1	100

## RESUMEN

Se desarrolló una propuesta para el tratamiento de un medio acuoso contaminado con Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs), tomando como modelo el Benzo[a]Antraceno (BaA) y Benzo[a]Pireno (BaP), compuestos de 4 y 5 anillos, contaminantes considerados como persistentes y peligrosos por su toxicidad y carcinogenicidad. Esta propuesta consistió en evaluar la remoción de los HAPs a través del uso de alginato de calcio, que sirvió para inmovilizar a las microalgas *Selenastrum capricornutum* y *Scenedesmus acutus* (microorganismos que han demostrado su capacidad para biodegradar estos contaminantes), en forma de perlas. Dichas perlas sirvieron como empaque para un pequeño bioreactor, que operó de forma semicontinua, utilizando una bomba peristáltica.

Para cuantificar a los HAPs residuales y así evaluar su remoción del medio acuoso por las microalgas, se utilizó en el tratamiento de la muestra la técnica de Extracción en Fase Sólida (EFS) y el análisis de extractos se efectuó por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) y detección espectrofotométrica UV. Previamente se validó la metodología para verificar la linealidad, precisión, límites de detección y cuantificación y el % de recuperación. Se obtuvieron coeficientes  $r^2 > 0.99$ , coeficientes de variación  $< 10\%$ , límites de detección 0.0069 mg/L y de cuantificación de 0.021 mg/L para el BaA; en cuanto al BaP, se obtuvieron límites de detección 0.0083 mg/L y de cuantificación de 0.025 mg/L y recobros cercanos al 75%.

Una vez que se validó el método EFS-CLAR-UV, se procedió a optimizar las condiciones en que las algas, inmovilizadas en perlas, removieran mayor porcentaje los HAPs; se hicieron pruebas del tiempo de exposición, cantidad de microalgas por perla y número de perlas. Una vez que se observaron las condiciones de las perlas en donde se obtenía una mayor recuperación, se hicieron pruebas acerca de la forma en la cual el bioreactor tuviera una buena distribución de las perlas, un buen porcentaje de remoción, entre otros aspectos. Después se buscó diseñar un bioreactor y optimizar su operación haciendo modificaciones en los flujos con los cuales se renovaba el medio a tratar (lo que implica modificar también el tiempo de operación), la recirculación del medio a tratar y el cambio en la proporción de volumen del medio acuoso con respecto al volumen de las microalgas inmovilizadas en las perlas. Con el uso de un bioreactor en forma de S, se obtuvo alrededor del 80% de remoción para ambos HAPs, en ciclos de tratamiento de 4.5 horas, con una etapa estática y una dinámica (a flujo constante).

## INTRODUCCIÓN

La preservación del medio ambiente es algo que debe preocuparnos como sociedad, y uno de los temas de mayor importancia es la calidad del agua, debido al aumento de la población, y por lo tanto a la demanda de este servicio. Sin embargo, la contaminación del agua derivada de la industria y la agricultura se está convirtiendo en un problema importante en los países en desarrollo, donde cerca de 500 millones de personas no tienen acceso a agua segura (Brayner et al. 2011).

El uso de la biotecnología ambiental que consiste en la aplicación de procesos biológicos para la remediación de ambientes contaminados como agua, suelo y aire, (Brenner & Abeliovich 2013) puede utilizar a las microalgas en aplicaciones potenciales como: 1) captura de CO<sub>2</sub> de los gases de combustión industrial, 2) la producción de bioenergía (biocombustibles), 3) la eliminación de contaminantes de las aguas residuales y 4) producción de biomasa para obtener complementos y aditivos alimenticios. Sin embargo, ninguna de las aplicaciones es económicamente viable, debido principalmente a las necesidades de agua, nutrientes y energía; y por otra parte, porque el proceso de recolección de microalgas resulta costoso, ya que representa aproximadamente el 30% de los costos totales (Pires et al. 2013). Para reducir estos inconvenientes, la tecnología de inmovilización de algas ha sido útil en la recolección, cultivo, tratamiento de aguas residuales y para el diseño de reactores (Mallick 2002), y más allá de estas aplicaciones, la variedad de los materiales y técnicas de inmovilización, han sido utilizadas tanto a nivel laboratorio como industrial en un amplio rango de industrias como la alimenticia, producción biomédica, textil, detergentes y producción de biodisel (Eş et al. 2015).

Es bien sabido que la bioremediación de medios acuosos contaminados puede realizarse con ayuda de microorganismos. Tradicionalmente, los estudios de biodegradación de contaminantes iniciaron con el aislamiento de uno o más microorganismos capaces de degradar contaminantes, sin embargo, algunos autores han determinado que la cinética de degradación difiere de lo que se observa entre el laboratorio y el medio ambiente, por lo que concluyen que los estudios de bioremediación deben ser llevados a cabo en ambientes no estériles y que contengan una variedad de organismos (Watanabe 2001). De todas formas, el primer paso en los estudios de degradación siempre debe de realizarse en medios sintéticos controlados antes de pasar a evaluar lo que sucede en los medios ambientales.

Las microalgas son un buen modelo para estudiar la remoción y degradación de contaminantes ya que se sabe que pueden biodegradar contaminantes orgánicos



peligrosos. Por ejemplo, organismos del género *Chlorella*, *Ankistrodesmus* o *Scenedesmus* se han utilizado con éxito para el tratamiento de aguas residuales de la industria papelera y del aceite de oliva. Se ha reportado la remoción de 50 mg/L por día de p-nitrofenol con la unión de *Chlorella vulgaris* y *Chlorella pyrenoidosa* (Muñoz & Guieysse 2006). También se conoce que algunas especies pueden remover y degradar a los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) (Lindquist & Warshawsky 1985; Semple et al. 1999; Chan et al. 2006; Lei et al. 2007; Olmos-Espejel et al. 2012; García de Llasera et al. 2016). La presencia de los HAPs en aguas superficiales o subterráneas indica que existe una fuente de contaminación, aunque usualmente los HAPs no se encuentran en concentraciones notables. Los HAPs son contaminantes lentamente biodegradables bajo condiciones aeróbicas en cuerpos acuosos, su velocidad de biodegradación disminuye drásticamente al incrementarse el número de anillos aromáticos (World Health Organization 1998). Sin embargo, la bioremediación con microorganismos representa el medio más económico y amigable para el ambiente comparado con la remediación física o química. Por lo tanto, dado el problema que representa un medio acuoso contaminado con HAPs y las ventajas que conlleva el uso de microalgas para la remediación, en este trabajo se propone utilizar las especies: *Scenedesmus acutus* y *Selenastrum capricornutum*, que han demostrado ser capaces de remover y degradar contaminantes aromáticos. Las microalgas se manejaron inmovilizadas en cuentas de alginato para empacar un pequeño reactor en donde se evaluó la bioremoción de dos HAPs pesados: Benzo[a]Antraceno y Benzo[a]Pireno, en agua potable, con apoyo de la extracción en fase sólida (EFS) y la cromatografía de líquidos de alta resolución con detección espectrofotométrica ultravioleta (CLAR-UV).

## OBJETIVOS

### General

Diseñar y evaluar un mini bio-reactor de flujo continuo o semicontinuo para la remoción de Benzo(a)Antraceno y Benzo(a)Pireno, por las microalgas *Selenastrum capricornutum* y *Scenedesmus acutus* inmovilizadas en perlas de alginato.

### Específicos

1. Establecer las condiciones cromatográficas óptimas para efectuar la cuantificación de Benzo(a)Antraceno y Benzo(a)Pireno por CLAR-UV y la validación del sistema.
2. Optimizar un método de extracción de Benzo(a)Antraceno y Benzo(a)Pireno del medio líquido de cultivo, utilizando la técnica de Extracción en Fase sólida.
3. Validación del método de extracción y análisis por EFS-CLAR-UV de los compuestos seleccionados evaluando la linealidad, exactitud, precisión y límites de detección y cuantificación.
4. Obtener condiciones de mantenimiento de la viabilidad de las dos especies de microalgas inmovilizadas por separado, *S. capricornutum* y *S. acutus*.
5. Evaluar la capacidad de estas dos especies para remover de un medio acuoso Benzo[a]Antraceno y Benzo[a]Pireno de modo individual y de modo conjunto.
6. Establecer la viabilidad de una mezcla de perlas con estas dos especies de microalgas, así como la proporción y medios óptimos para llevar a cabo esta mezcla.
7. Establecer las condiciones de operación (características del empaque, cantidad de empaque, flujo, tiempo de contacto, volumen del medio acuoso, cantidad de contaminante, porcentaje de remoción) del mini bio-reactor que contenga a las microalgas expuestas a los HAPs en estudio.

## CAPITULO 1 ANTECEDENTES

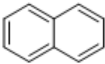
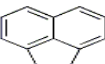

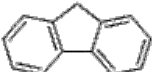
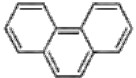
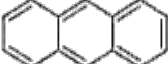
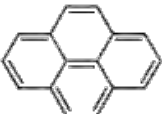
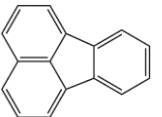
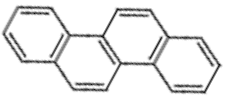
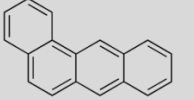
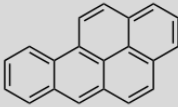
### 1.1 Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos

#### 1.1.1 Estructura y propiedades fisicoquímicas

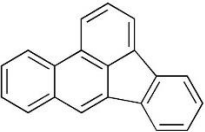
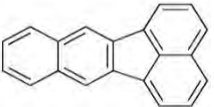
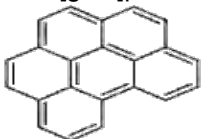
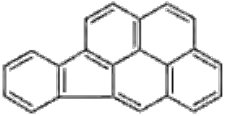
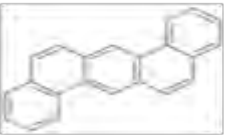
Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) constituyen una clase de compuestos químicos orgánicos de dos o más anillos de benceno fusionados, en arreglos lineares y en racimo (Hu et al. 2014; Juhasz & Naidu 2000; Cerniglia 1992) que pueden tener, o no, moléculas pentacíclicas (Rubio-Clemente et al. 2014) . Son compuestos hidrofóbicos con baja solubilidad en agua, por lo cual son persistentes; al incrementarse a más de 4 anillos fusionados los HAPS aumentan su hidrofobicidad, su persistencia ambiental y genotoxicidad. Hay 16 HAPs que están considerados como contaminantes prioritarios de la lista de la Agencia de Protección del Medio Ambiente (EPA, por sus siglas en Inglés *Environmental Protection Agency*) de los Estados Unidos, desde que se conocen que algunos son tóxicos, cancerígenos y mutagénicos (Cerniglia 1992; Manoli & Samara 1999).

A temperatura ambiente los HAPs son sólidos incoloros de color amarillo. Las características generales comunes son altos puntos de fusión y ebullición, bajas presiones de vapor y escasa solubilidad en agua (World Health Organization 1998). El valor de la solubilidad en agua es muy pequeño a temperatura ambiente, pero puede aumentar al incrementar la temperatura. La bioacumulación de compuestos orgánicos muestra correlación con el coeficiente  $K_{ow}$  (Wang & Wang 2007). El parámetro  $\log K_{ow}$  es el coeficiente de reparto octanol-agua, tiene valores en el rango de 3 a 8 para los HAPs (Manoli & Samara 1999). Los valores de  $K_{ow}$  exhiben un aumento general de valor al aumentar el peso molecular (Wang & Wang 2007). Este coeficiente indica la afinidad de un compuesto a una fase no acuosa (Juhasz & Naidu 2000). La tabla 1.1, adaptada de Manoli & Samara (1999) se le agregó el número CAS, el peso molecular y los puntos de ebullición y fusión de cada HAP, para complementar la información de los 16 HAPs prioritarios. Los compuestos resaltados en la tabla, son los que se estudiaron en este trabajo, como puede apreciarse el Benzo[a]Antraceno y el Benzo[a]Pireno son compuestos muy lipofílicos y muy poco volátiles.

**Tabla 1.1** Propiedades fisicoquímicas de los 16 HAPs prioritarios

Compuesto	No. CAS	Peso Molecular	Punto de fusión (°C)	Punto de ebullición (°C)	Solubilidad agua (mg/L)	Presión de vapor (mm Hg)	log K <sub>ow</sub>
Naftaleno 	[91-20-3]	128	80	218	32 <sup>A</sup>	0.0492	3.3
Acenafteno 	[83-32-9]	154	95	279	3.4 <sup>A</sup>	10 <sup>-2</sup> -10 <sup>-3</sup> <sup>B</sup>	3.98
Acenaftileno 	[208-96-8]	152	78	280	3.93	10 <sup>-2</sup> -10 <sup>-3</sup> <sup>B</sup>	4.07
Fluoreno 	[86-73-7]	166	116	295	1.98	10 <sup>-2</sup> -10 <sup>-3</sup> <sup>B</sup>	4.18
Fenantreno 	[85-01-8]	178	99	336	1.0 – 1.3 <sup>A</sup>	6.8x10 <sup>-4</sup> <sup>B</sup>	4.45
Antraceno 	[120-12-7]	178	218	342	0.05-0.07 <sup>A</sup>	2x10 <sup>-4</sup> <sup>B</sup>	4.45
Pireno 	[129-00-0]	202	156	404	0.14 <sup>A</sup>	6.9x10 <sup>-9</sup> <sup>B</sup>	4.88
Fluoranteno 	[206-44-0]	202	107	384	0.26 <sup>A</sup>	10 <sup>-5</sup> -10 <sup>-6</sup> <sup>B</sup>	4.9
Criseno 	[218-01-9]	228	252	448	2.8x10 <sup>-3</sup> <sup>A</sup>	10 <sup>-11</sup> -10 <sup>-7</sup> <sup>B</sup>	5.56
<b>Benzo[a]antraceno</b> 	<b>[56-55-3]</b>	<b>228</b>	<b>155</b>	<b>438</b>	<b>0.01<sup>A</sup></b>	<b>5x10<sup>-9</sup><sup>B</sup></b>	<b>5.61</b>
<b>Benzo[a]pireno</b> 	<b>[50-32-8]</b>	<b>252</b>	<b>179</b>	<b>310</b>	<b>3.8x10<sup>-3</sup><sup>A</sup></b>	<b>5x10<sup>-9</sup><sup>B</sup></b>	<b>6.05</b>

**Tabla 1.1** Propiedades fisicoquímicas de los 16 HAPs prioritarios (Continuación)

Compuesto	CAS	Peso Molecular	Punto de fusión (°C)	Punto de ebullición (°C)	Solubilidad agua (mg/L)	Presión de vapor (mmHg)	log K <sub>ow</sub>
Benzo[b]fluoranteno 	[205-99-2]	252	165	480	7.6x10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-11</sup> -10 <sup>-6</sup> <sup>A</sup>	6.06
Benzo[k]fluoranteno 	[207-08-9]	252	215	480	7.6x10 <sup>-4</sup>	9.6x10 <sup>-7</sup> <sup>A</sup>	6.84
Benzo[g,h,i]perileno 	[191-24-2]	276	273	550	2.68x10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-10</sup>	6.5
Indeno[c,d]pireno 	[193-39-5]	276	164	530	0.062	10 <sup>-10</sup>	6.58
1,2:5,6-dibenzoantraceno 	[53-70-3]	278	267	524	5x10 <sup>-4</sup> <sup>A</sup>	10 <sup>-10</sup>	6.84

<sup>A</sup> 25 °C

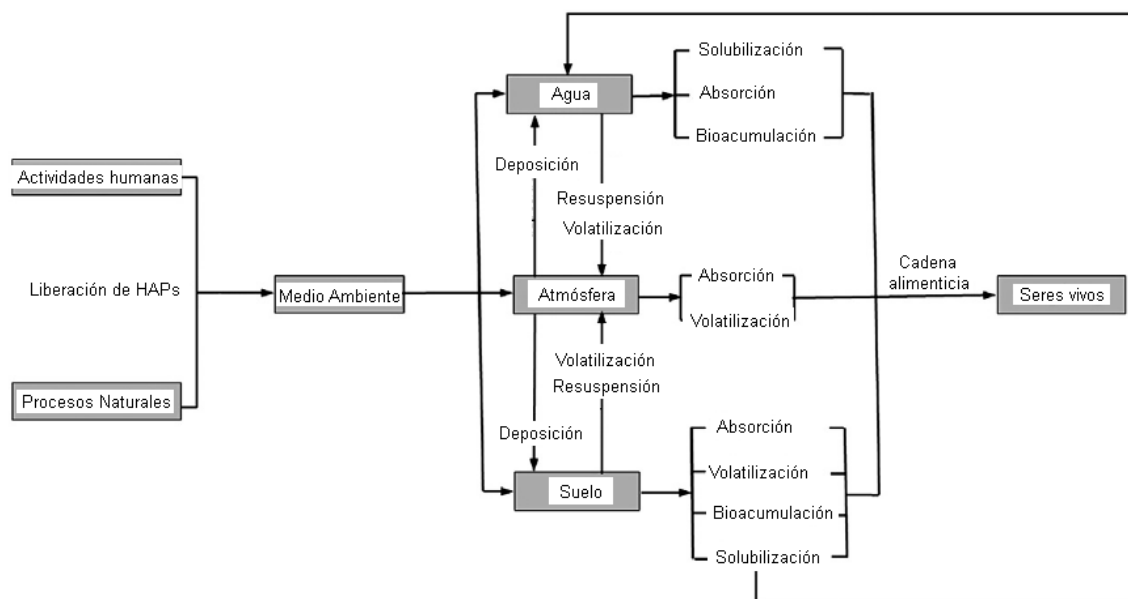
<sup>B</sup> 20 °C

Adaptación de la tabla (Manoli & Samara 1999).

### 1.1.2 Fuentes de producción

Se forman naturalmente durante las erupciones volcánicas y durante la quema de vegetación en incendios forestales (Juhasz & Naidu 2000; Manoli & Samara 1999); las fuentes antropogénicas incluyen la combustión de combustible fósil, derrame de productos de petróleo, incineración de basura y al cocinar los alimentos (Johnsen et al. 2005; Cerniglia 1992). Entran al medio ambiente desde múltiples fuentes como: consecuencia aérea directa, fuga crónica de efluentes industriales (procesos de gasificación y licuefacción del carbón, incineración de basura, coque, carbón negro) o de aguas residuales, descargas accidentales durante el transporte (Cerniglia 1992). Su lanzamiento en el aire, el suelo o el agua sería un problema grave desde el punto de vista de la protección del medio ambiente y la salud humana. Los posibles destinos de los

HAPs incluyen la volatilización, foto-oxidación, oxidación química, bioacumulación, adsorción a partículas de suelo, lixiviación y degradación microbiana (Cerniglia 1992). En la figura 1.1 se muestra un esquema de los posibles destinos que pueden tener los HAPs, una vez liberados al ambiente.



**Figura 1.1** Fuentes de emisión de HAPs y posibles destinos en el ambiente. (Rubio-Clemente et al. 2014)

### 1.1.3 Toxicología de los HAPs

Se informó que entre el 70-90% de enfermedades de cáncer en seres humanos y animales son causadas por productos químicos altamente tóxicos en el medio ambiente (Hu et al. 2014).

Los HAPs son una preocupación porque algunos de ellos pueden causar cáncer en los seres humanos y son perjudiciales para los peces y otros organismos acuáticos. La mayor parte de la información sobre la toxicología de los HAPs se derivó de experimentación en animales expuestos a los HAPs en condiciones controladas. Los estudios relacionados con los efectos sobre los seres humanos a la exposición de HAPs, por separado o en conjunto, son raros. Debido a la compleja naturaleza de las mezclas es difícil evaluar la contribución de un solo HAP a la carcinogenicidad total de estas mezclas. Los seres humanos pueden estar expuestos a HAPs a través del aire, el agua y los alimentos. En la comparación de las vías de inhalación e ingestión, algunos investigadores encontraron que la ingesta potencial podría ser similar en cada medio. Los

estudios epidemiológicos han demostrado aumento de la mortalidad por cáncer de pulmón en los seres humanos expuestos a emisiones de hornos de coque, emisiones de material para techos de alquitrán y al humo del cigarrillo (García-Falcón et al. 2004). En 1933 se demostró que un HAP aislado del alquitrán de hulla era cancerígeno, el compuesto resultó ser el BaP (Mastandrea et al. 2005). Además los HAPs se han asociado con otros tipos de cáncer como el de vejiga, laringe, escroto, mama, esófago, próstata, riñón, piel y páncreas. También son capaces de suprimir el sistema inmunológico y son sospechosos de ser disruptores endócrinos (Rubio-Clemente et al. 2014). Una ruta general propuesta para la carcinogenicidad por exposición ambiental considera las siguientes etapas: exposición, activación metabólica, formación de aductos entre HAPs y ADN y mutación en genes (Mastandrea et al. 2005).

#### **1.1.4 Límites Máximos Permisibles de los HAPs**

Los límites máximos permisibles de un compuesto dependerán del tipo de ambiente en el que se pretenda regular. Por ejemplo para 1997, la *Occupational Safety and Health Administration* (OSHA) de Estados Unidos estableció un límite de exposición permitido de 0.2 mg/m<sup>3</sup> en el ambiente de trabajo, para el BaP. La EPA, contempla sólo al BaP para muestras de agua potable con un límite máximo de 0.0002 mg/L (US-EPA 2009).

En México, la regulación de HAPs para suelos se encuentran en la Norma Oficial Mexicana 138, NOM-138-SEMARNAT/SS-2003, la cual establece los Límites Máximos Permisibles (LMP) para 6 HAPs dependiendo el uso del suelo, como puede verse en la tabla 1.2 (SEMARNAT 2013). Para el tipo de uso del agua se cuenta con la Ley Federal de Derecho/Disposiciones aplicables en materia de Aguas Nacionales, que establece en la tabla de lineamientos de calidad del agua, el contenido de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos, dependiendo del uso del agua (CONAGUA 2014), un extracto de esta tabla se puede apreciar en la tabla 1.3.

Hace 5 años salió un proyecto para la modificación de la NOM-127-SSA1-1994, el cual se ha nombrado "Proyecto de Norma Oficial Mexicana NOM-000-SSA1-2010, Agua para uso y consumo humano. Límites máximos permisibles de la calidad del agua y requisitos sanitarios que deben cumplir los sistemas de abastecimiento de agua públicos y privados, su control y vigilancia. Procedimiento sanitario de muestreo". En este proyecto se contempla el monitoreo de una amplia variedad de contaminantes, entre los cuales aparece el BaP, donde se establece que su LMP es de 0.70 µg/L. Sin embargo todavía no ha entrado en vigor.

**Tabla 1.2** Límites máximos permisibles para hidrocarburos específicos en suelo

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

**Tabla 1.3** Lineamientos de calidad del agua (fragmento)

Parámetros	Usos			
	1	2	3	4
Unidades en mg/L si no se indican otras				
Fenol	0.001	-	0.1	0.06
<b>Fluoranteno</b>	0.04	-	-	0.0004
Halometanos	0.002	-	0.1	-
Heptacloro	0.0001	-	0.0005	0.0005
Hexaclorobenceno	0.00005	-	0.0025	0.0016
Hexaclorobutadieno	0.004	-	0.0009	0.0003
Hexaclorociclopentadieno	0.001	-	0.0001	0.0001
Hexacloroetano	0.02	-	0.01	0.009
<b>Hidrocarburos aromáticos Polinucleares</b>	0.0001	-	-	0.1

Uso 1: Fuente de abastecimiento para uso público urbano.

Uso 2: Riego agrícola.

Uso 3: Protección a la vida acuática: Agua dulce, incluye humedales.

Uso 4: Protección a la vida acuática: Aguas costeras y estuarios.



## **1.2 Análisis de HAPs en muestras acuosas**

En la actualidad existen métodos para el análisis de HAPs en agua y en lodos. Los HAPs generalmente son analizados por cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas como detector (Método EPA 8100) o por cromatografía de líquidos acoplada con detector de UV-arreglo de diodos y/o fluorescencia (Método EPA 8310); sin embargo la confirmación de los HAPs en muestras ambientales suele ser difícil (Buseti et al. 2006). Por ello se han desarrollado métodos de extracción para esta tarea, buscando la separación selectiva de estos compuestos presentes en las muestras. Las técnicas de extracción utilizadas para el aislamiento de HAPs en muestras acuosas se describen a continuación.

### **1.2.1 Técnicas de Extracción**

Para la extracción de HAPs del agua la extracción Líquido-Líquido (ELL) es probablemente de las técnicas más ampliamente utilizadas (Ozcan et al. 2010). Esta técnica consiste en utilizar un disolvente no polar, los analitos se distribuyen entre ambas fases inmiscibles (agua – disolvente), colocadas en un embudo de separación (Smith 2003). Esta técnica aplicada en su modo tradicional requiere utilizar grandes volúmenes de disolventes orgánicos y tiempo de análisis. Además de no ser una técnica automatizada (Marce & Borrull 2000). En años recientes, microtécnicas de extracción líquido-líquido como la microextracción en una gota suspendida (SDME), la microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) y la microextracción con emulsificación asistida por ultrasonido (USAEME) han sido desarrolladas para poder establecer métodos miniaturizados eficientes y económicos en la preparación de muestras (Ozcan et al. 2010). Una alternativa a las técnicas de extracción líquido-líquido, es la extracción con adsorbentes, la más utilizada es la extracción en fase sólida que se explica a continuación.

### **1.2.2 Extracción en Fase sólida (EFS)**

Es una técnica ampliamente utilizada en la preparación de muestras para separar analitos seleccionados (Poole 2003). Se utiliza un cartucho desechable empacado (en la actualidad se cuenta con una amplia variedad de fases sólidas) que hace posible analizar compuestos de interés en disolución. Una vez atrapado el analito, puede ser liberado en un pequeño volumen de un disolvente de extracción (Smith 2003). La EFS introdujo características importantes como: Disminución del volumen de disolvente utilizado,

analizar compuestos polares en muestras acuosas, mejorar los porcentajes de recuperación de los analitos de interés y su posible automatización (Hennion 1999).

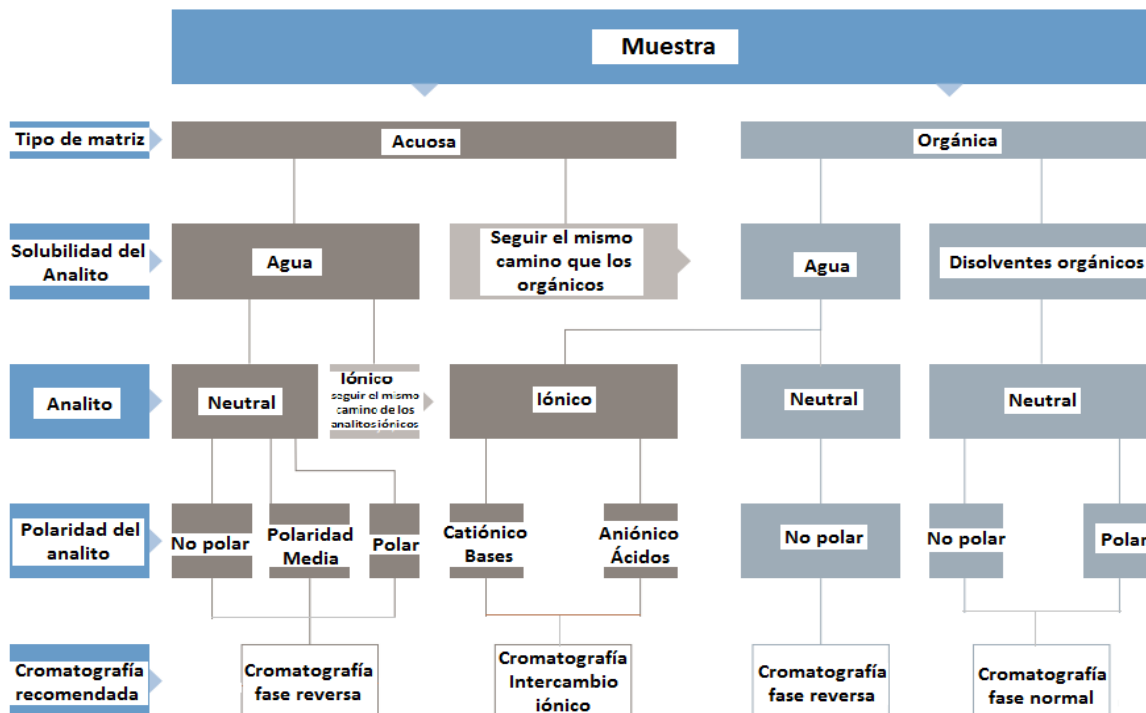
El principio se basa en las interacciones adsorbente-analito (Marce & Borrull 2000). Varios tipos de adsorbentes utilizados para la EFS se pueden agrupar de acuerdo con el mecanismo principal de interacción entre el adsorbente y el analito. En la tabla 1.4, se muestran los mecanismos de interacción que pueden presentarse entre el analito y el adsorbente (Wells 2003). La selección del adsorbente depende de las consideraciones teóricas como: analitos no polares pueden ser retenidos en adsorbentes no polares (Cserhádi 2010).

**Tabla 1.4** Mecanismos de interacción de los adsorbentes para EFS y analitos

Mecanismo de interacción	Adsorbente
Fuerzas de Van der Waals	Octadesil (C18), octil (C8), etil (C2), fenil (PH), ciclohexil (CH), poliestirenodivinilbenzeno (PSDVB), carbono grafitizado
Dipolo-dipolo	Ciano (CN), silica, alúmina, Florisil
Puentes de hidrógeno	Amino (NH <sub>2</sub> ), diol
Electrostático	Intercambio catiónico (CX), intercambio aniónico (AX)

La EFS puede ser aplicada para la pre-concentración y purificación de extractos de muestras líquidas o sólidas (Cserhádi 2010). Sin embargo el concepto de utilizar una columna corta para la limpieza de muestras ha sido empleado por varios años, donde se empacaban a mano materiales como la sílice o Florisil cuya principal función fue retener impurezas (Smith 2003).

La figura 1.2, muestra un esquema general acerca de como se elige el tipo de adsorbente o fase estacionaria de acuerdo a las características de la muestra y los analitos. Es de notarse que la EFS puede considerarse como un sistema de cromatografía de líquidos simple, de allí la similitud en la selección de fase estacionaria de acuerdo a la polaridad y solubilidad del analito. Por ejemplo, para muestras acuosas tales como agua, orina o sangre, se deben conocer características del analito como: solubilidad en agua y si tiene carácter iónico, polar o neutro, para ver el tipo de cromatografía recomendada para llevar a cabo el análisis. De acuerdo al tipo de cromatografía seleccionada se elige la fase del adsorbente adecuado para realizar la EFS.



**Figura 1.2** Procedimiento general para la elección del tipo de fase en la EFS, de acuerdo al tipo de muestra y analito (PerkinElmer 2012).

El proceso de EFS consiste regularmente en una serie de cuatro pasos que son:

1.- Preparación del cartucho o columna (acondicionamiento)

El acondicionamiento se refiere a dejar en óptimas condiciones la fase estacionaria o adsorbente para recibir la muestra. Los adsorbentes disponibles comercialmente, se pueden encontrar en tres formatos: contenidos en los cartuchos (columnas semejantes a jeringas, como pueden apreciarse en la figura 1.3), en discos o las fases adsorbentes se pueden comprar a granel. La típica columna se fabrica de polipropileno o de vidrio y el adsorbente está contenido en la columna mediante el uso de “frits” porosos de polietileno, acero inoxidable, o de teflón.

La adsorción del analito depende tanto del volumen de la muestra como de la masa de adsorbente. Para una cantidad dada de adsorbente, el volumen de fuga es menor para un analito que interactúa con menos fuerza con el adsorbente. Para cualquier volumen de muestra dado e incluyendo el volumen de fuga, el analito que interactúa más fuertemente con el adsorbente requerirá una menor cantidad de adsorbente para lograr una recuperación cuantitativa (Wells 2003).



**Figura 1.3** Cartuchos de Extracción en Fase Sólida.

<http://www.capitalanalytical.com/index.php?c=products&m=view&category=98>

### 2.- Carga de la muestra (retención)

El volumen de la muestra puede estar entre 1 mL a 1 L. La muestra puede ser pasada por gravedad, aplicando presión o aspirando con vacío. La velocidad a la cual fluye la muestra debe permitir la retención de los analitos (Camel 2003). El adsorbente aísla los analitos aunque también son retenidos elementos indeseables de la muestra (Wells 2003).

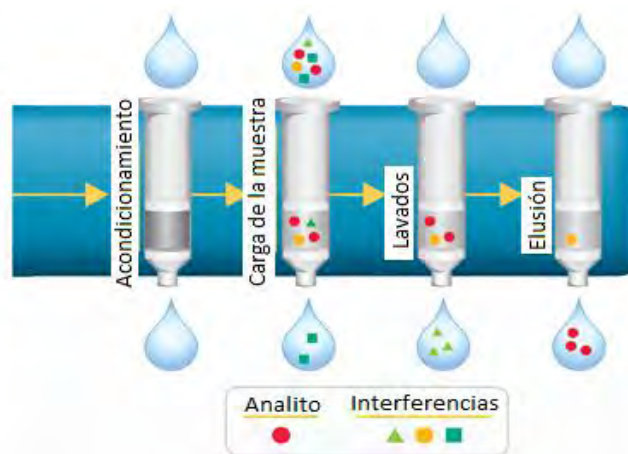
### 3.- Lavados del cartucho

Se enjuaga la columna para remover los componentes indeseables de la matriz (Wells 2003). Este paso puede ser opcional. Se lava el cartucho con un disolvente con fuerza débil de elución para eliminar los componentes de la matriz que pudieron haber sido retenidos sin desplazar los analitos. Una etapa de secado también puede ser aconsejable, especialmente para matrices acuosas, para eliminar trazas de agua del adsorbente sólido (Camel 2003).

### 4.- Desorción de la muestra (elución)

El analito es concentrado y aislado, listo para el análisis (Wells 2003). Este paso final consiste en la elución de los analitos de interés por un disolvente apropiado, sin la eliminación de componentes de la matriz retenidos. El volumen de disolvente debe ajustarse de modo que sea una recuperación cuantitativa y eficiente de los analitos (Camel 2003).

La figura 1.4 muestra de manera gráfica los pasos anteriormente descritos. Los disolventes y los enjuagues pueden ser pasados aplicando presión positiva, gravedad o utilizando vacío.



**Figura 1.4** Procedimiento para llevar a cabo la extracción en Fase Sólida.  
[http://www.johnmorris.com.au/files/images/gilson/ASPEC\\_SPE\\_header2.jpg](http://www.johnmorris.com.au/files/images/gilson/ASPEC_SPE_header2.jpg)

En el caso de la EFS de los HAPs se presenta un importante problema que es la adsorción en el muestreo y almacenamiento debido a su alta hidrofobicidad, pero este inconveniente puede ser superado al agregar algún porcentaje de un modificador a la muestra (Marce & Borrull 2000).

### 1.2.3 Métodos de análisis de HAPs en muestras acuosas

En la tabla 1.5 se muestran ejemplos del uso de la extracción en fase sólida (EFS) así como las técnicas utilizadas para su identificación y cuantificación; de manera general se observa que se usa la Cromatografía, ya sea de Gases o Líquidos para la determinación de HAPs en matriz agua de diferentes tipos, como son agua de mar, agua potable, agua de río, agua residual, entre otras.

Al observar la tabla vemos el uso frecuente de la EFS para el tratamiento de muestras de distintos tipos de agua; el desarrollo de este método ha permitido el uso de una menor cantidad de muestra, en la mayoría de los casos se utilizan menos de 50 mL, aunque todavía se siguen desarrollando métodos que utilizan entre 500 - 1000 mL de muestra. El adsorbente más comúnmente utilizado en la EFS es C18, aunque también se han utilizado fases como los nanotubos de carbono (MWCNT *multi-walled carbon nanotubes*). En cuanto a los disolventes utilizados, el uso de hexano, acetonitrilo y disolventes clorados es común para realizar las extracciones.

Los métodos de análisis utilizando la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) comúnmente emplean columnas con fase C18 como fase móvil una mezcla de acetonitrilo:agua en diferentes proporciones y un gradiente para la separación de varios HAPs; (Busetti et al. 2006) utiliza una fase móvil isocrática pero en este caso fue

porque separó solo 4 HAPs; para los métodos que utilizan la CLAR el detector que suele utilizarse es el de Fluorescencia debido a que es más sensible que el detector UV.

Empleando la Cromatografía de Gases (CG), los métodos utilizan generalmente una columna que tiene por fase 5% difenil - 95% dimetilpolisiloxano (DB-5, HP-5 o RTx-5 el nombre está dado de acuerdo al fabricante), como gas acarreador al Helio, el uso de un programa de temperatura y como detector un espectrómetro de masas.

Utilizando ambas técnicas (CLAR y CG) se observa que se pueden alcanzar límites de detección y cuantificación (L.D. y L.C.) menores a 10 ng/L, observándose que ambas técnicas son sensibles. El resumen de lo anteriormente descrito puede observarse con mayor detalle en la tabla 1.5.

**Tabla 1.5** Ejemplos del uso de la EFS con análisis cromatográfico para la determinación de HAPs en diferentes tipos de agua.

Matriz	HAPs a determinar	Concentración	EFS	Técnica de análisis	Recuperación	L.D.	L.C.	Referencia
Agua potable	B[b]F, B[k]F, B[a]P, B[ghi]P, I[1,2,3]P, FI, B[a]A, DB[ah]A, B[e]P	100 ng/L BaP-10 ng/L	EFS - 250 mL muestra + 75 mL ACN, se adiciona Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> . 360 mg C18, elución 5 mL HXN reconstituir en 0.5 mL ACN.	CLAR-FLD Columna LC-PAH 250x4.6 mm 5µm Gradiente 80:20 ACN:H <sub>2</sub> O hasta 97:03 hasta 100 ACN 1 mL/min 33°C	EFS 95-104%	0.05-0.7 ng/L	0.15-1.5 ng/L	(García-Falcón et al. 2004)
Agua de río, agua de mar, agua potable, agua de manantial	NAF, ACE, ANT, PIR	5 mg/L	EFS - 20 mL de muestra. FPS empacado en columna de 8 mm largo, 3 mm diámetro. Elución con disolución 75% ACN	On line-EFS-CLAR-UV Columna RP-18 250x4.6 mm 4µm Isocrático 75:25 ACN:H <sub>2</sub> O 1 mL/min 25°C	N.R.	7- 40 ng/L	N.R.	(Oliferova et al. 2005)
Agua residual	16 HAPs	100 ng/L	EFS - 1000 mL muestra +10% IPA. 1g, Envi-18, 6 mL, elución 12 mL de 90:5:5 HXN:ACN:IPA. Evaporar y reconstituir a 1mL IPA	CLAR- FLD DAD Columna Envirosep-C18 125x3.2 mm 3µm Gradiente 40:60 ACN:H <sub>2</sub> O hasta 99:01 hasta 100 ACN 0.7 mL/min 13°C	70-95%	0.52- 1.2 ng/L	1.73 – 4 ng/L	(Buseti et al. 2006)
Agua potable, agua de río, agua de mar	16 HAPs	0.2 µg/L	EFS - 500 mL muestra. 150 mg MWCNTs, elución 15 mL HXN	CG-EM Columna DB-5MS 30mx0.25mmx0.25mm Inyector 280°C Programa temperatura 70°C 2 min 10°C/min 240°C 3°C/min 290°C Helio 1mL/min	Agua potable 80.5-127% Agua de río 80.2-125.5% Agua de mar 66.5-122%	2.1-8.5 ng/L	N.R.	(Ma et al. 2010)
Agua de lago	16 HAPs	N.R.	EFS - 1 L de muestra + 80 mg de Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , filtrar. Discos C18, elución con 5 mL de acetato de etilo. Evaporar y reconstituir con 5 mL de DCM	CG-EM Columna HP-5 30mx0.25mmx0.25mm Inyector 250°C Programa temperatura 100°C 2 min 10°C/min 200°C 5 min 8°C/min 250°C 250°C 7 min 5°C/min 310°C Helio 1 mL/min	N.R.	N.R.	N.R.	(Romo-Gómez et al. 2010)

HAPs Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos, B[b]F Benzo[b]fluoranteno, B[k]F Benzo[k]fluoranteno, B[a]P Benzo[a]pireno, B[ghi]P Benzo[ghi]perileno, I[1,2,3]P Indeno[123]pireno, FI Fluoranteno, B[a]A Benzo[a]antraceno, DB[ah]A Dibenzo[ah]antraceno, B[e]P Benzo[e]perileno, ACE Acefnateno, NAF Naftaleno, ANT Antraceno, PIR Pireno, BTEX Benceno, Tolueno, Etilbenceno, Xilenos, EFS Extracción en Fase Sólida, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Tiosulfato de Sodio, HXN Hexano, ACN Acetonitrilo, IPA Isopropanol, DCM Diclorometano, C18 fase octadecilsilano, FPS Polivinilidenofluoruro, MWCNTs nanotubos de carbono, CLAR-FLD-DAD Cromatografía de Líquidos de alta resolución con detector de Fluorescencia – Detector de arreglo de diodos, CG-DIF Cromatografía de Gases con detector de Ionización de flama, CG-EM Cromatografía de Gases acoplado a un espectrómetro de masas, N.R. no reportado.

### **1.3 Contaminación en agua por HAPs**

En los contaminantes del agua por lo general se incluyen tanto los contaminantes orgánicos (detergentes, insecticidas, compuestos volátiles, no volátiles) e inorgánicos (metales pesados, residuos químicos) (Brayner et al. 2011). Los compuestos orgánicos, muchos de los cuales se sabe que son tóxicos o cancerígenos, han causado considerable preocupación en todo el mundo. La costa y aguas interiores suelen actuar como receptores de efluentes industriales y la escorrentía urbana y rural. Como los arroyos, ríos, lagos y lagunas se utilizan con frecuencia, para el suministro de agua potable, la contaminación de los cursos de agua, donde se practica la reutilización del agua, es particularmente indeseable.

Después de entrar en el medio ambiente acuático, el comportamiento y el destino de los HAP dependen de sus propiedades físico-químicas. La volatilización, disolución, adsorción en sólidos en suspensión y posterior sedimentación y degradación biótica y abiótica, la absorción y la acumulación por los organismos acuáticos, son los principales procesos a los que están sujetos los HAPs en agua (Manoli & Samara 1999).

#### **1.3.1. Aguas superficiales**

Los HAPs entran en las aguas superficiales principalmente por las aguas pluviales de las zonas impermeables, tales como carreteras, autopistas, estacionamientos. Como consecuencia, la escorrentía urbana contiene HAPs depositados en superficies, productos de escape, partículas de neumáticos, y el asfalto de superficies de carretera. Otra fuente de HAPs son los efluentes de refinерías, efluentes industriales, de industrias dedicadas a la fabricación de productos químicos (disolventes, lubricantes, colorantes, insecticidas), donde se utiliza el petróleo o el carbón como materia prima, en la fabricación de neumáticos; en efluentes industriales analizados, se observó una mayor frecuencia de ocurrencia de HAPs de los efluentes de industrias productoras de compuestos orgánicos y plásticos, y de las fábricas de hierro y acero (Manoli & Samara 1999).

#### **1.3.2 Aguas subterráneas**

Los HAPs en las aguas subterráneas pueden proceder de los cuerpos de agua superficiales contaminados, riego agrícola con aguas residuales, los lixiviados de vertederos de desechos sólidos o suelos contaminados. Sin embargo, el movimiento y transporte de hidrocarburos aromáticos policíclicos en los sistemas de suelo, así como



sus mecanismos de penetración en las aguas subterráneas siguen siendo poco claros (Manoli & Samara 1999).

### **1.3.3 Agua potable**

La presencia de HAPs en el agua potable puede ser por las aguas subterráneas, utilizadas como fuentes de agua bruta, o por el uso de tuberías de alquitrán de carbón recubierto en sistemas de abastecimiento público de agua, como se permite en ciertos países. Se ha informado que niveles altos de HAPs pueden esperarse en el agua potable, si el agua proviene de fuentes tales como plantas de tratamiento de agua y cuencas de agua de lluvia (Manoli & Samara 1999). Es imperativo que las aguas primarias que pueden ser utilizadas por industrias de procesamiento de alimentos y bebidas sean potables y cumplan con los criterios de calidad del agua potable (García-Falcón et al. 2004). En cuanto a la cloración de agua potable, se ha encontrado que esta técnica de desinfección puede dar lugar a la formación de compuestos oxigenados y clorados de los HAPs, que son más tóxicos que los HAPs originales (Manoli & Samara 1999; Ohura 2007).

### **1.4 Bioremediación**

La bioremediación se describe como un proceso que mediante microorganismos, hongos, plantas o enzimas derivadas de ellos, degrada y desintoxica el medio ambiente de contaminantes (Watanabe 2001), que dependerá de las condiciones ambientales, número y tipo de microorganismos, naturaleza y estructura del compuesto a ser degradado (Haritash & Kaushik 2009). Transforma los contaminantes a formas menos o no peligrosas. Microorganismos como las microalgas son capaces de remover contaminantes orgánicos tóxicos por crecimiento autotrófico o contribuir a la degradación, ya sea por la transformación directa del contaminante o mejorando el potencial de degradación de la comunidad microbiana (Semple et al. 1999).

Los peligros asociados con los HAPs pueden ser superados por el uso de métodos convencionales como la remoción, alteración o asilamiento del contaminante; en suelos, estas técnicas conllevan la excavación de suelos contaminados y su incineración o confinamiento, pero estas tecnologías son caras y en varios casos transportan el contaminante de una fase a otra (Haritash & Kaushik 2009).

En cuanto a la actividad microbiana, ésta disminuye si incrementa la masa molecular del HAP; sin embargo deben considerarse factores ambientales como la biodisponibilidad del contaminante (Johnsen et al. 2005; Juhasz & Naidu 2000).

El uso de microalgas para la purificación de aguas residuales se propone como una alternativa que ofrece la ventaja simultánea de generar biomasa. La bioremediación por microalgas es un procedimiento adecuado, siempre y cuando la absorción de los nutrientes de las aguas residuales sea suficientemente eficiente y la biomasa producida pueda, adicionalmente, ser utilizada (por ejemplo en la producción de biocombustible). Las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus* son actualmente de las más estudiadas para la remediación de aguas residuales (Ale et al. 2014).

De hecho, los efluentes industriales son tratados usando una variedad de productos químicos peligrosos a fin de corregir el pH y reducir la turbidez de lodos y el olor. La tecnología de algas evita el uso de productos químicos y el tratamiento de efluentes es relativamente simple. Además el uso de microalgas para la remediación de aguas residuales tiene la ventaja adicional de la fijación de CO<sub>2</sub> creando así un ciclo neutral de carbono cuando se queman los biocombustibles derivados (Doria et al. 2011). Se requiere un tratamiento cuidadoso de las aguas residuales que contienen compuestos tóxicos antes de su vertido final a cuerpos de agua receptores, y las técnicas de biodegradación tienen el potencial para mineralizar completamente compuestos tóxicos a costos relativamente bajos (Tziotziou et al. 2007).

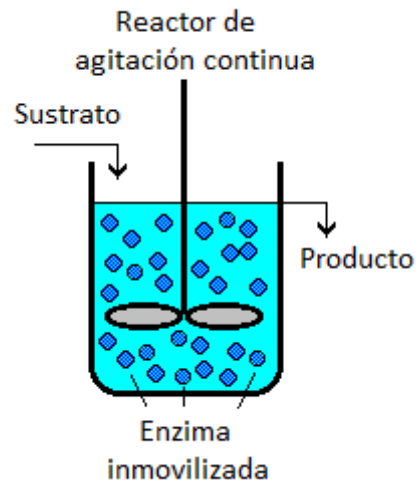
Las microalgas han demostrado ser capaces de remover contaminantes orgánicos tóxicos por crecimiento autotrófico; en el trabajo de (Lei et al. 2007), se probaron 4 especies de microalgas para la remoción de fluoranteno y pireno en una concentración de 1 mg/L. Las especies utilizadas fueron *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus platydiscus*, *Scenedesmus quadricauda* y *Selenastrum capricornutum*. Se hicieron pruebas removiendo los HAPs solos y en conjunto, monitoreando 1, 4 y 7 días los cultivos. Se observó que la cantidad de HAPs que se consume por las células de microalgas varió entre especies, siendo la *S. capricornutum* la especie más efectiva en metabolizar los HAPS. En el caso de la *S. capricornutum* la remoción del pireno fue significativamente más alta cuando se encontraba en mezcla que solo, por lo que se sugiere que la presencia del fluoranteno puede aumentar la remoción del pireno en esta especie, entre el primer y cuarto día se había removido entre un 88-98% de los HAPs (Lei et al. 2007).

## 1.5 Bioreactores

Un bioreactor es un reactor que sostiene y soporta la vida de células y cultivos de tejidos. Las células, llamadas en conjunto biomasa, consumen nutrientes para crecer, así como para producir más células y productos. Internamente la célula usa sus nutrientes para producir energía y más células. Tal transformación se logra porque la célula emplea varias enzimas distintas en una serie de reacciones para dar lugar a productos metabólicos. Dichos productos llegan a permanecer dentro de la célula o ser secretados al exterior de la célula. Prácticamente todas las reacciones celulares necesarias para mantener la vida son mediadas por enzimas que catalizan diversos aspectos del metabolismo celular, como la transformación de energía química y la construcción, la descomposición y la digestión de componentes celulares. La importancia del uso de células vivas para sintetizar productos químicos comerciales va en aumento, se emplean tanto microorganismos como células de mamíferos para sintetizar productos como la insulina, antibióticos y polímeros. La ventaja de las bio-conversiones es que las condiciones de reacción son suaves, el rendimiento es alto y actúan de forma específica. Las bacterias pueden modificarse para transformarse en fábricas vivas de productos químicos. Por ejemplo, usando ADN recombinado, *Biotechnic International* obtuvo bacterias para producir fertilizante por conversión de nitrógeno a nitratos (Fogler 2008). Aunque es dependiente de su aplicación específica, diversos bioreactores que utilizan células inmovilizadas han sido propuestos. A continuación se presenta una breve descripción de los modelos más comunes y algunas aplicaciones que tienen:

- **Reactor de agitación continua (CSTR, continuous stirred-tank reactor).** Consiste en un tanque con buena agitación, en donde los reactivos fluyen continuamente en un estado estacionario. El reactor CSTR se puede conectar en serie, dándole la ventaja de tener buena mezcla en cada recipiente, y por lo tanto garantizar que el volumen en el reactor es completamente utilizado para la reacción, sin tener espacio muerto. Es ampliamente utilizado para la producción a escala industrial; sin embargo, se prefiere para una mejor producción de operaciones a pequeña escala. En la figura 1.5 se observa un esquema de este tipo de reactor.  
En un estudio comparativo, para la producción de biohidrógeno se evaluaron las ventajas entre bioreactores CSTR, uno utilizando células inmovilizadas en bolas de cerámica y el otro utilizando células en suspensión. La mayor producción de

hidrógeno lo mostró el CSTR con células inmobilizadas, mientras que el CSTR con células en suspensión perdió gran cantidad de biomasa. Se generó cinco veces la producción volumétrica de hidrógeno, en un bioreactor 8 veces más pequeño con un sistema de inmobilización (Eş et al. 2015).



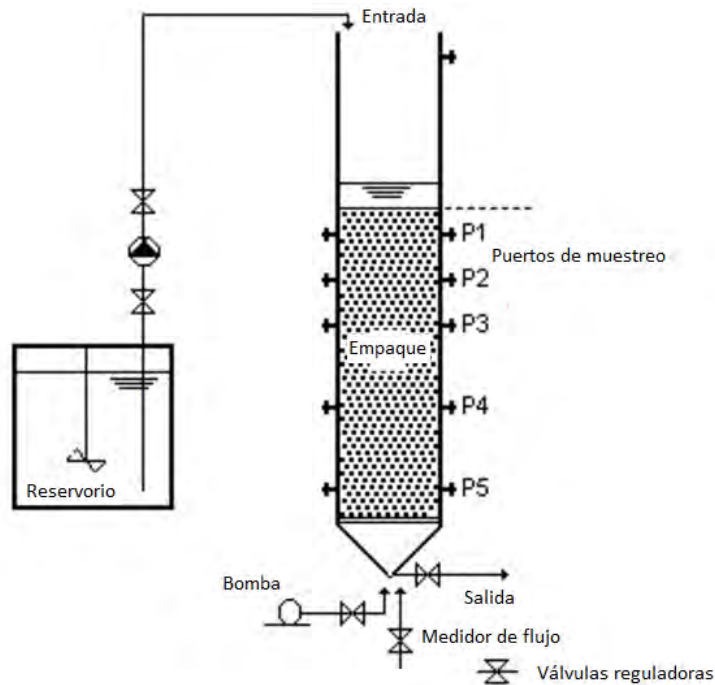
**Figura 1.5** Reactor de agitación continua.

[www.rpi.edu/dept/chem-eng/BiotechEnviron/IMMOB/stirredt.htm](http://www.rpi.edu/dept/chem-eng/BiotechEnviron/IMMOB/stirredt.htm)

- **Reactor de lecho fijo (PBR, packed bed reactor).** Un reactor de lecho fijo es un modelo simple, robusto y alcanza altas conversiones espacio-tiempo; puede utilizar microorganismos inmobilizados como empaque (Maria et al. 2013). Se están estudiando para los procesos celulares inmobilizados más que cualquier otra configuración de bioreactor. En general estos sistemas son apropiados cuando se requieren tiempos de retención relativamente largos (Mallick 2002; Eş et al. 2015). El reactor de lecho fijo es muy utilizado en la industria. Estos reactores consisten en una columna con biocatalizadores donde se hace pasar lenta y continuamente la fase líquida; muchos materiales, incluso los que son frágiles, se pueden utilizar en reactores de lecho fijo (ver figura 1.6).

Un ejemplo del uso de este tipo de reactor es la producción de lactosa con  $\beta$ -galactosidasa, en el cual se utilizaron células de levadura inmobilizadas en alginato de calcio. Se observó que la inmobilización ayudó a superar el problema de la mala permeabilidad de la membrana celular a la lactosa. El sistema de diseño del bioreactor era económicamente viable y permitió alta hidrólisis de la lactosa de la leche.

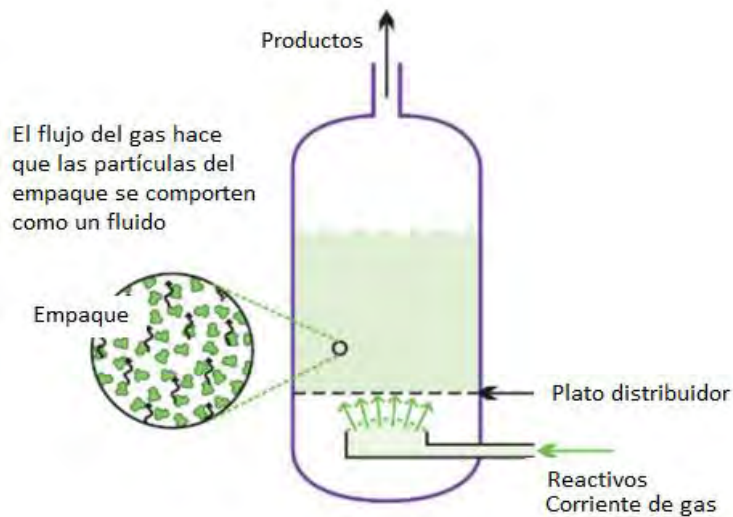
Un bioreactor de lecho fijo horizontal con un espacio libre por encima del lecho fue diseñado para reducir el gas  $\text{CO}_2$  en la producción continua de etanol por células de levadura inmovilizadas. Se concluyó que el reactor de lecho empacado horizontal fue 1.5 veces más productivo que uno vertical, mostrando que podría ser un sistema muy prometedor para la producción económica de etanol (Eş et al. 2015).



**Figura 1.6** Reactor de lecho fijo.

[http://www.uc.pt/uid/lcm/projects/pastProjects/biological\\_packed\\_bed](http://www.uc.pt/uid/lcm/projects/pastProjects/biological_packed_bed)

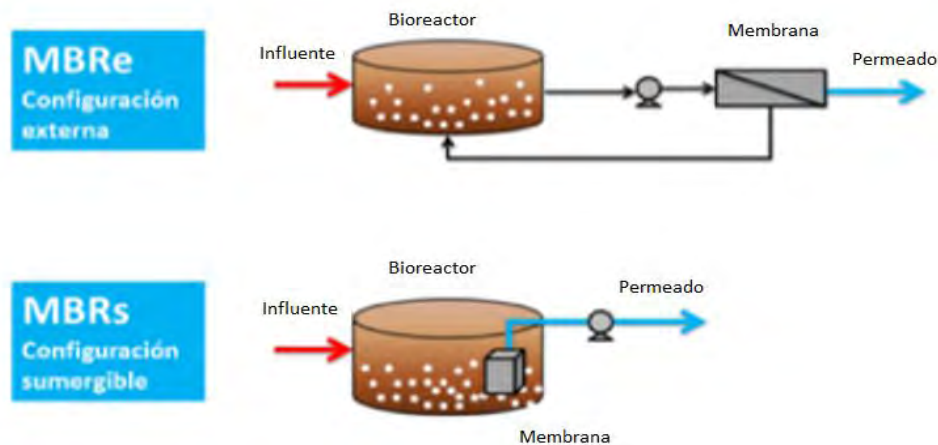
- **Reactor de lecho fluidizado (FBR, fluidized bed reactor).** Este diseño tiene aplicaciones comerciales mayormente en sistemas gas-sólido (Mallick 2002). En estos reactores los catalizadores se colocan en un recipiente que tiene una placa porosa en la parte inferior, por la que pasan los gases reactivos. A medida que aumenta la velocidad del gas, el empaque se va fluidizando. A diferencia de los reactores de lecho fijo, los reactores de lecho fluidizado permiten la alimentación de catalizador adicional en la parte superior del reactor, además de tener una excelente transferencia de calor (Eş et al. 2015). Procesos que requieren tiempos de residencia relativamente cortos se utilizan de manera efectiva en este sistema (Mallick 2002). La figura 1.7 muestra un esquema de un reactor de lecho fluidizado.



**Figura 1.7** Reactor de lecho fluidizado.

<http://www.essentialchemicalindustry.org/processes/chemical-reactors.html>

- Reactores de membrana (MBR, membrane biological reactor).** Las membranas sintéticas son soportes ideales para la inmovilización de biocatalizadores debido a su mayor superficie por relación de volumen. Las enzimas inmovilizadas se han utilizado principalmente en reactores de lecho fijo. Los reactores de membrana tienen una gran utilidad con enzimas inmovilizadas, porque el sistema tiene una membrana semipermeable que separa físicamente la enzima del sustrato y el producto. Estos sistemas permiten el paso del producto a través de la membrana mientras se mantiene la enzima con el sustrato el suficiente tiempo en el recipiente de reacción (Eş et al. 2015). En la figura 1.8 se muestran los tipos de MBR que existen.



**Figura 1.8** Reactor de membrana

<http://www.hipro.com.mx/content/mbr-reactor-biológico-de-membrana>

En el caso del tratamiento de aguas, el objetivo de todos los procesos de tratamiento es eliminar los contaminantes existentes o por lo menos reducir su concentración para que el agua se convierta en apta para su uso final deseado (Brayner et al. 2011). Para ello se han utilizado microalgas, cuya biomasa consiste en pequeñas partículas de baja densidad, pobre rigidez y resistencia mecánica; por tanto se presentan serias limitantes operacionales para el tratamiento de efluentes industriales con las células dispersas libres en los bioreactores, como es la obstrucción de las líneas de flujo y filtros, que representan altos costos. Por eso surge el interés de encapsular las células de las microalgas en materiales, como los hidrogeles, que tengan el tamaño, resistencia mecánica, rigidez y porosidad adecuadas.

Las desventajas asociadas al encapsulamiento en gel son la velocidad de difusión, resistencia mecánica insuficiente (capaz de permitir la ruptura del gel) que permita la dispersión de la biomasa y fugas por el crecimiento de las células (Saeed & Iqbal 2006).

### **1.6 Generalidades sobre las algas**

Las algas son organismos fotosintéticos liberadores de oxígeno, las características propias que las identifican como grupo son:

- 1) Se consideran plantas talófilas (no poseen raíz, tallo y hojas)
- 2) No desarrollan embrión
- 3) Son organismos autótrofos (tienen la capacidad de sintetizar su propio alimento)

Son fundamentalmente acuáticas y pueden vivir tanto en agua dulce como en agua de mar. También pueden ocupar otros ambientes como el suelo, las rocas, cortezas de árboles e incluso la nieve (Andersen 2013).

Las algas verdes poseen una gran variedad de formas que incluyen algas unicelulares, multicelulares y filamentosas. Almacenan sustancias de reserva en forma de almidón y el compuesto de su pared celular es la celulosa. Además las algas contribuyen aproximadamente a la mitad de la producción fotosintética en la Tierra debido a que gran parte de esta producción ocurre en los océanos (Andersen 2013).

Existe una gran diversidad de algas con características propias como se puede apreciar en la tabla 1.6. Su nombre común se les da por el color que tienen, que se debe al tipo de pigmentos que poseen como las clorofilas o carotenoides.

**Tabla 1.6** Clasificación de las algas (Peña et. al. 2005).

División celular	Tipo de pigmento	Hábitat	Nombre común
Clorofita	Clorofila a y b Carotenos	Agua dulce, marina, salobre, terrestre	Algas verdes
Euglenofitas	Clorofila a y b Carotenos	Agua dulce, marina, salobre, terrestre	Euglenas
Crisofitas	Clorofila a y c Xantofilas	Agua dulce, marina, salobre, terrestre	Algas amarillas, doradas
Feofitas	Clorofila a y c fucoxantina	Agua dulce, marina, salobre, terrestre	Algas pardas
Rodofitas	Clorofila a, d ficoeritrina, fucoxantina, carotenos	Agua dulce, marina, salobre, terrestre	Algas rojas

Generalmente las algas están agrupadas en dos categorías, microalgas y macroalgas, con base en la morfología y tamaño. Las microalgas son organismos no visibles sin un microscopio, muchos de los cuales son unicelulares, con tamaños entre 3 - 10  $\mu\text{m}$ . Por el contrario, las macroalgas son visibles a simple vista, están compuestas de múltiples células, alcanzan tamaños de hasta 70 m y crecen hasta 50 cm por día; las macroalgas se organizan en estructuras que se asemejan a raíces, tallos y hojas de plantas superiores (John et al. 2011; El Gamal 2010).

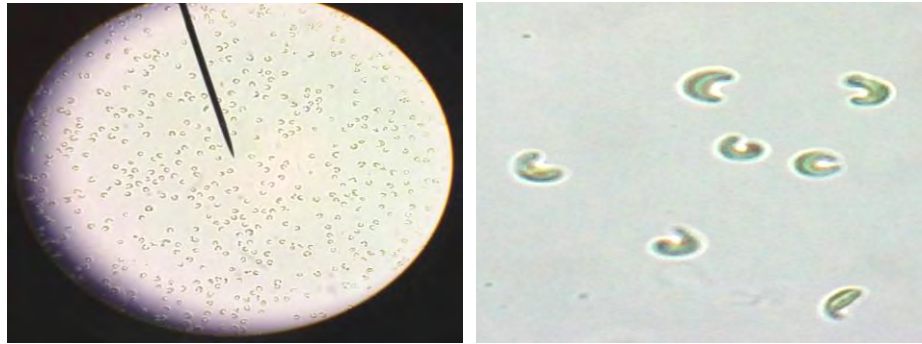
El crecimiento de las microalgas requiere varios elementos importantes regulados como: nutrientes, fuente de nitrógeno (amonio, nitrito, nitrato), fósforo, dióxido de carbono, así como la disponibilidad de la energía de la luz sobre un período diario de fotosíntesis. Aguas residuales provenientes de origen agrícola, doméstico o industrial pueden conducir al crecimiento de microalgas.

Las células de las microalgas son fisiológicamente capaces de consumir formas inorgánicas de nitrógeno o fósforo mucho más rápido de lo que ellas pueden asimilar en su biomasa celular. Cuando las células de las microalgas son temporalmente privadas de uno o más elementos claves con nitrógeno o fósforo, su proceso metabólico puede resultar en acumulación de nutrientes disponibles durante la exposición al medio, este fenómeno se conoce como consumo de lujo (Kaya & Picard 1995).



### 1.6.1 Microalga *Selenastrum capricornutum*

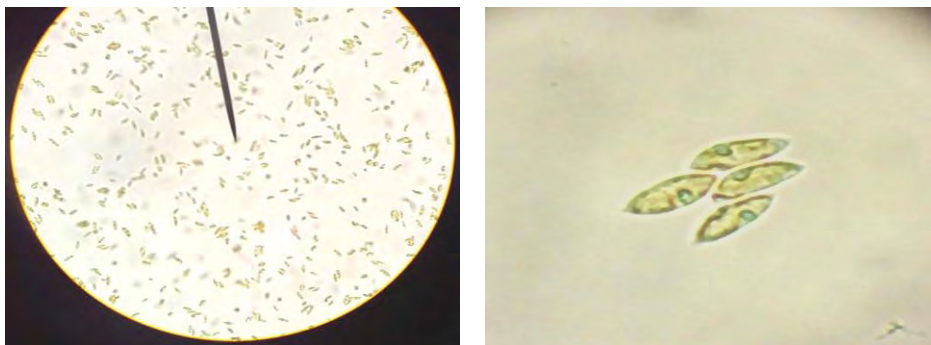
Microalga verde (clorofita) unicelular con forma de media luna (como se puede ver en la figura 1.9) y de volumen aproximado de 40-60  $\mu\text{m}^3$ . Es común en ecosistemas acuáticos de agua dulce, tanto en sistemas eutróficos como oligotróficos (Castillo Morales et al. 2004). Los nombres con los que también se le puede encontrar son: *Monraphidium capricornutum*, *Raphidocelis subcapitata*, *Pseudokirchneriella subcapitata*.



**Figura 1.9** Muestra de un cultivo de *S. capricornutum*. Aumento 40X (Imagen propia).

### 1.6.2 Microalga *Scenedesmus acutus*

Es un alga verde, común de agua dulce. Las especies del género *Scenedesmus* exhiben una extensa variabilidad morfológica impulsada por nutrientes y temperatura (Lürling & Van Donk 1999). El género *Scenedesmus* Meyen se divide en dos grupos: el *Desmodesmus* (grupo con espinas) y el *Scenedesmus* (grupo sin espinas), forma colonias planas que constan de 2, 4, 8 o 16 células linealmente dispuestas. El tamaño de las células está entre 17.5 - 15  $\mu\text{m}$  de largo y entre 7 - 4  $\mu\text{m}$  de ancho. La microalga *Scenedesmus acutus* también es conocida como *Scenedesmus obliquus* (Lürling 2003). En la figura 1.10 se aprecia la forma alargada de la microalga *Scenedesmus acutus*.



**Figura 1.10** Muestra de un cultivo de *S. acutus* (Imagen propia). Aumento 40X (Imagen propia).

De manera general la microalga *Selenastrum capricornutum* y la *Scenedesmus* se han usado en ensayos de toxicidad. La *Selenastrum capricornutum* es una de las especies más sensibles entre las algas verdes unicelulares y un buen indicador como organismo de ensayo a la exposición de hidrocarburos del petróleo. El género *Scenedesmus* ha sido empleado por el Instituto Colombiano del Petróleo (ICP) como bioindicador en bioensayos con efluentes y derivados del petróleo (Gómez Luna & Ramírez Carmenate 2004).

### **1.7 La inmovilización de células**

Una célula inmovilizada se define como una célula viva que, por medios naturales o artificiales, está impedida de movimiento independientemente de su ubicación original a todas las partes de una fase acuosa de un sistema (de-Bashan & Bashan 2010).

La inmovilización de microorganismos proporciona varias ventajas sobre los que viven en estado libre, como son:

- Tener una ininterrumpida fuente de nutrientes sin competir con otros organismos.
- Protección contra el estrés ambiental, toxinas, radiación UV, contaminantes.
- Evitar un posible pastoreo del zooplancton (Covarrubias et al. 2012).

De manera general las técnicas de inmovilización se dividen en dos grupos: Pasiva y activa.

#### **1.7.1 Inmovilización pasiva**

Este método aprovecha la habilidad natural que tienen muchos microorganismos a unirse a superficies y crecer en ellas, por ello se han desarrollado materiales adsorbentes (acarreadores), que pueden ser:

##### Naturales

Ejemplo: *Espanja Loofa*, que se obtiene de la planta del mismo nombre. Es un soporte fibroso, no tóxico, barato y estable. Presenta como desventajas la falta de repetibilidad en los resultados debido a que la estructura varía de una planta a otra dependiendo de las condiciones de cultivo.

Se ha utilizado para remover Ni, por el alga *Chlorella sorokiniana*; tratamiento de agua, por el hongo *Phanerochaete chrysosporium*; en la degradación de pesticidas como la carbendazina y el 2-4D (Moreno-Garrido 2013).

### Sintéticos

Ejemplo: resinas de polivinilo y poliuretano. Se inmovilizó el alga *Scenedesmus acutus* para la remoción de nitratos en agua (Moreno-Garrido 2008).

#### **1.7.2 Inmovilización activa**

Son técnicas específicas desarrolladas para atrapar o encapsular, vivas o muertas, las células de los microorganismos (Moreno-Garrido 2013). Los materiales para llevarla a cabo son:

##### Agentes floculantes

Se utiliza comúnmente el quitosán, un polisacárido lineal obtenido de la deacetilación alcalina de la quitina. Es una sustancia biodegradable, con alta estabilidad química; sin embargo se debe utilizar con harina de Konjac para que sea estable en la inmovilización, si no, puede interferir con el crecimiento de las algas.

##### Encapsulamiento en Gel

Es el método más ampliamente utilizado en la inmovilización, se pueden utilizar polímeros de varios tipos como son:

###### *a) Polímeros sintéticos*

Se utilizan materiales como acrilamidas, poliuretanos, entre otros. Se ha demostrado que son inadecuados para encapsular células vivas. No se han utilizado para inmovilizar algas.

###### *b) Proteínas*

Clara de huevo, colágeno y gelatinas se han utilizado en la inmovilización pero no ampliamente.

###### *c) Polisacáridos naturales*

Entre ellos se encuentran el agar, la carragenina y el alginato, siendo este último el más utilizado. El alginato es barato, no tóxico, suficientemente transparente, estable y fácil de usar. La estabilidad dependerá de la especie inmovilizada, no es recomendable su uso en agua de mar (Moreno-Garrido 2008).

#### **1.7.3 La inmovilización de microalgas**

Las microalgas inmovilizadas se han utilizado en procesos de purificación de agua, remoción de metales, como biosensores para medir la toxicidad y recientemente en la producción de Hidrógeno para generar electricidad (Moreno-Garrido 2008).

La forma más común de inmovilización de microalgas es en cuentas esféricas, las cuales se han utilizado para tratamiento de aguas residuales basado en el principio de guardar células vivas dentro de una matriz de gel. La difusividad es alta en polímeros naturales, pero éstos pueden disolverse en aguas residuales altamente contaminadas, siendo más vulnerables a la degradación ambiental por microbios mientras que los polímeros sintéticos no (de-Bashan & Bashan 2010); sin embargo algunos estudios han demostrado que la inmovilización de células en hidrogeles como la poliacrilamida, reducen la viabilidad de un 50% hasta un 90%. El uso de polímeros naturales tales como el agar, alginato, carragenina o gelatina, permiten una alta viabilidad y el crecimiento de las células en el gel (Kaya & Picard 1995) Un ejemplo del uso de estos polímeros fue para la microalga *Chlorella vulgaris*, inmovilizada en carragenina y alginato, para el tratamiento primario de aguas residuales domésticas: el 99% de fosfatos y 95% de amonio fueron removidos en 3 días (de-Bashan & Bashan 2010).

Las microalgas inmovilizadas aumentan significativamente su rendimiento en clorofila, carotenoides, masa seca y lípidos. Su envejecimiento es retardado y muestran mejor crecimiento que los cultivos de células libres. Ha tenido aceptación la idea de que la combinación de más de un microorganismo es mejor; como ejemplo se tiene que ni el monocultivo de la *Rhodobacter sphaeroides*, ni el de la *Chlorella sorokianina*, pueden remover acetato, propionato, amonio, nitrato y fosfato de un agua residual sintética, mientras que en la mezcla de cultivos si lo consigue (de-Bashan & Bashan 2010).

Entre los beneficios que ofrece la técnica de inmovilización están:

- Posibilidad de trabajar con altas concentraciones de biomasa
- Separación fácil de biomasa y productos
- Operación en algunos procesos industriales
- Los estudios deben enfocarse a la factibilidad económica en gran escala, ver si es suficientemente estable/longevo, sin alterarse y sin ser tóxico el material de soporte (Kaya & Picard 1995)

En la tabla 1.7 se muestra el uso de diferentes especies de microalgas inmovilizadas en alginato de calcio para llevar a cabo el tratamiento de agua para la bioremediación de distintos tipos de contaminantes como son nitrógeno, fósforo, metales y compuestos orgánicos.

Como se puede observar en la tabla 1.7, especies como la *Chlorella vulgaris* se ha empleado en la bioremediación de N, P, metales como el Cu, Zn e incluso para contaminantes orgánicos como el TBT, un pesticida.

**Tabla 1.7** Bioremoción de contaminantes en agua, utilizando microalgas inmovilizadas en alginato de calcio.

Microalga	Contaminante	Concentración	% de Remoción	Tiempo de exposición	Referencia
<i>Scenedesmus bicelularis</i>	N, P	5.5 mg/L PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> 57.4 mg/L NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	99% de fosfatos 95% de amonio	90 minutos	(Kaya & Picard 1995)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Cu, Ni	30 mg/L Cu 30 mg/L Ni	97% Cu, 91% Ni	30 minutos	(Lau et al. 1998)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Cu	30 mg/L Cu	>95% Cu	5 ciclos de 2 horas	(Tam et al. 1998)
<i>Prothoteca zopfii</i>	C <sub>14</sub> , C <sub>15</sub> , C <sub>16</sub>	0.1% v/v	Remoción NR	14 días	(Suzuki et al. 1998)
<i>Chlorella vulgaris</i>	N, P	40 mg/L N 53 mg/L P	100% de amonio 95% de Fosfato	24 horas (1 día)	(Tam & Wong 2000)
<i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Chlorella sorokiniana</i> , <i>Azospirillum brasilense</i>	N, P	>55 mg/L N >5 mg/L P	100% de amonio 15% de Nitrato 36% Fósforo	144 horas (6 días)	(De-Bashan et al. 2004)
<i>Chlorella vulgaris</i>	TBT	24.4, 122, 244 µg/L	>90%	24 horas (1 día)	(Luan et al. 2006)
<i>Selenastrum capricornutum</i>	FE, FLA, PIR	1 mg/L FE 0.25 mg/L FLA 0.1 mg/L PIR	92% FE 100%FLUA y PIR	168 horas (7 días)	(Tam et al. 2009)
<i>Scenedesmus ubliquus</i> <i>Chlorella vulgaris</i>	N, P	34-48 mg/L NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> 15 mg/L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	>90% Amonio 60-80% Fosfato	48 horas (2 días)	(Ruiz-Marin et al. 2010)
<i>Pediastrum boriyanum</i>	Cr(VI)	100-400 mg/L	73%	2 horas	(Ozer et al. 2011)
<i>Selenastrum capricornutum</i>	FLU, FE, FLA, PIR, BaP, Cd, Cu, Zn, Ni	1 mg/L FLU y FE , 0.25 mg/L FLA, 0.15 mg/L PIR, 0.1 mg/L BAP	Remoción HAPs 70-90% 80-95%	1 día 7 días	(Wang et al. 2013)

C<sub>14</sub>: Tetradecano, C<sub>15</sub>: Pentadecano, C<sub>16</sub>: Hexadecano, TBT: Tributiltin, FE: Fenantreno, FLU: Fluoreno, PIR: Pireno, FLUA: Fluoranteno, BaP: Benzo[a]pireno.

### 1.8 Alginato como matriz inmovilizadora

El alginato es el polímero más comúnmente utilizado para la inmovilización de microorganismos dentro de las pequeñas cavidades de su matriz (Covarrubias et al. 2012). El éxito del encapsulamiento en gel de alginato se debe principalmente al ambiente gentil que provee al material encapsulado. Presenta propiedades como (Smidsrod & Skjåk-Braek 1990):

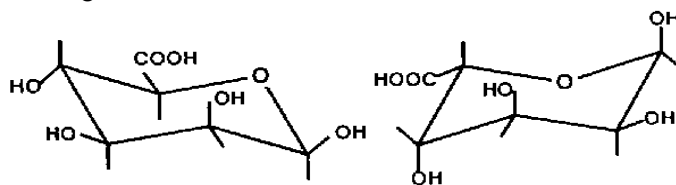
- Estabilidad mecánica y química alta
- Propiedades controlables de hinchazón
- Bajo contenido de sustancias tóxicas
- Poro de tamaño definido
- Distribución estrecha del tamaño de poro

Algunas limitaciones que tiene el alginato son (Smidsrod & Skjåk-Braek 1990):

- Baja estabilidad en presencia de fosfato o citrato, que tiene alta afinidad por el ion  $\text{Ca}^{2+}$ , el gel puede ser desestabilizado por altas concentraciones de iones como  $\text{Na}^+$  y  $\text{Mg}^{2+}$ .
- Alta porosidad que puede permitir la fuga de moléculas grandes como proteínas; sin embargo, también es una ventaja porque permite una alta velocidad de difusión de substratos y productos.

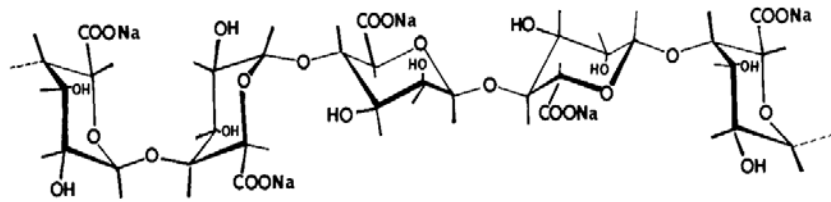
### 1.8.1 Estructura química del alginato de Na

El alginato, considerado como un hidrocoloide, tiene la capacidad para absorber agua, ser de fácil manipulación, inocuo, poseer propiedades gelificantes, estabilizantes y espesantes. Es un polisacárido lineal poliónico e hidrofílico proveniente de algas marinas conformado por dos monómeros en su estructura, el ácido  $\alpha$ -L gulurónico (G) y el ácido  $\beta$ -D manurónico (M), cuyas estructuras pueden verse en la figura 1.11. Estas estructuras se distribuyen en secciones, constituyendo homopolímeros tipo bloques-G (-GGG-), bloques-M (-MMM-) o heteropolímeros donde los bloques M y G se alternan (-MGMG-) como se aprecia en la figura 1.12. Tanto la distribución de sus monómeros en la cadena polimérica como la carga y volumen de los grupos carboxílicos confieren al gel formado características de flexibilidad o rigidez dependiendo del contenido en G. Si hay una mayor cantidad de bloques-G generalmente el gel es fuerte y frágil; si hay mayor proporción de bloques-M el gel es suave y elástico. El proceso de gelificación ocurre en presencia de cationes multivalentes, donde el ion calcio es el más empleado. La gelificación tiene lugar al producirse una zona de unión entre un bloque G de una molécula de alginato que se enlaza físicamente a otro bloque G a través del ion calcio. La visualización de la estructura física es denominada modelo “Caja de huevos” (Lupo et al. 2012), como se puede apreciar en la figura 1.13.

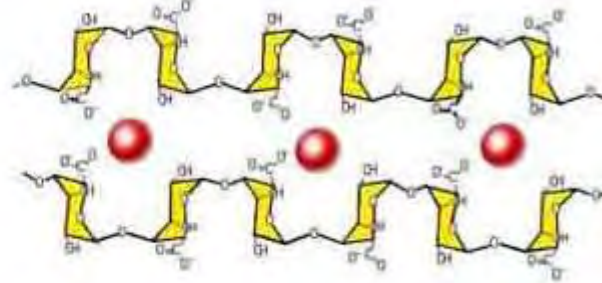


**Figura 1.11** Estructuras del ácido  $\beta$ -D Manurónico (izquierda) y  $\alpha$ -L Gulurónico(derecha).

<http://e-ciencia.com/recursos/monografias/quimica/alginatos.html>



**Figura 1.12** Estructura química del alginato de sodio (Smidsrod & Skjåk-Braek 1990).



**Figura 1.13** Modelo caja de huevo del alginato de Ca.

<http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/azucares/alginateo.html>

### 1.8.2 Preparación de la matriz alginato

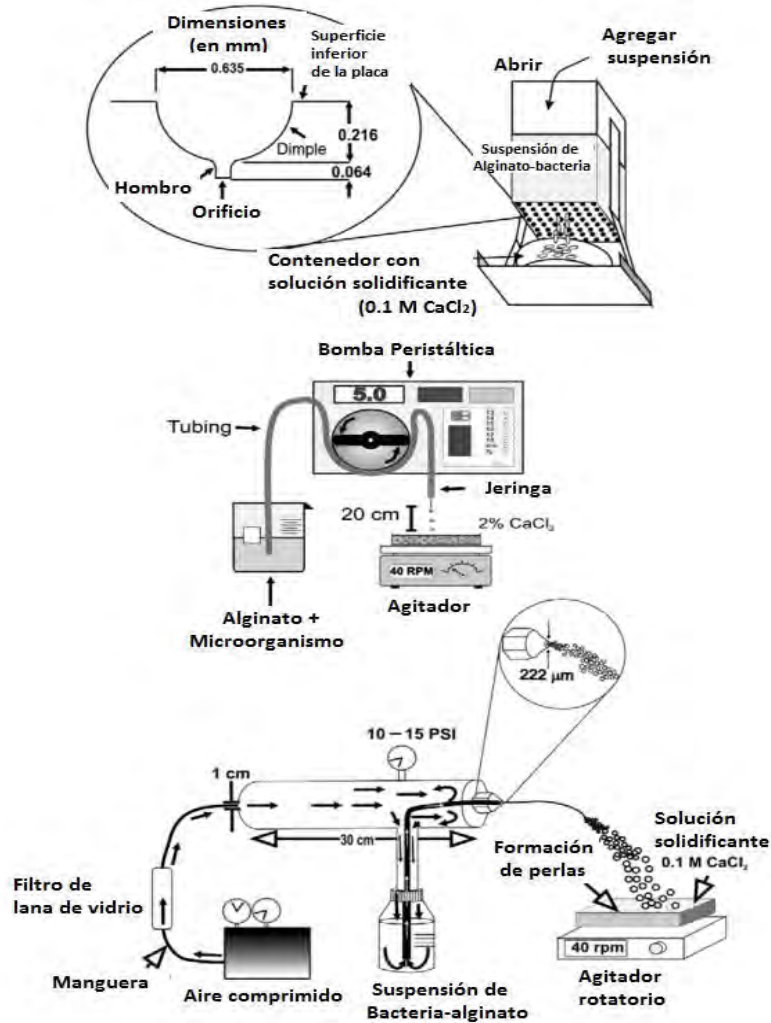
Para utilizar el alginato se prepara una disolución de alginato de sodio en concentración entre el 2-4%, la suspensión puede ser agitada por 6 h para disolver el alginato en el agua a temperatura ambiente. Para esterilizar, si se hace a altas temperaturas se pueden despolimerizar algunas cadenas, por lo que se recomienda la esterilización por filtración con una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  (Smidsrod & Skjåk-Braek 1990).

El proceso de inmovilización se lleva a cabo cuando se gotea la disolución de alginato-células en una disolución de  $\text{CaCl}_2$  (disolución solidificante). La disolución contiene entre 20–100 mM de iones Ca. Las cuentas deben dejarse endurecer en el  $\text{CaCl}_2$ , otros cationes divalentes pueden reemplazar al  $\text{Ca}^{2+}$ . La serie de afinidad de varios cationes divalentes al alginato es la siguiente:  $\text{Pb}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Co}^{2+} = \text{Ni}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Mn}^{2+}$  (Smidsrod & Skjåk-Braek 1990).

La mayoría de los experimentos se realizan manualmente utilizando jeringas para el goteo del alginato, pero la principal limitación de esto es una baja producción. Se han desarrollado procedimientos automatizados para reducir esfuerzo y tiempo, en donde se utilizan bombas peristálticas o maquinaria desarrollada especialmente para ello como se puede ver en la figura 1.14 (de-Bashan & Bashan 2010).

Las propiedades mecánicas y de hinchado dependen fuertemente de la composición monomérica. El tamaño y la esfericidad dependen principalmente de la

viscosidad de la disolución de alginato y la distancia entre la jeringa y la disolución de  $\text{CaCl}_2$  (Smidsrod & Skjæk-Braek 1990).



**Figura 1.14** Diferentes diseños de equipos para producir grandes cantidades de perlas de alginato-microorganismos (de-Bashan & Bashan 2010).

Si se requiere disolver las cuentas de alginato para recuperar las células inmovilizadas, éstas se sumergen en una disolución que contenga un secuestrante del ion Ca, como pueden ser el ion citrato o fosfato (Smidsrod & Skjæk-Braek 1990).



### **1.8.3 Mecanismos de gelificación con alginato**

El proceso de formación del gel se inicia a partir de una solución de sal de alginato y una fuente de calcio externa o interna desde donde el ion calcio se difunde hasta alcanzar la cadena polimérica, como consecuencia de esta unión se produce un reordenamiento estructural en el espacio resultando en un material sólido con las características de un gel.

El grado de gelificación depende de la hidratación del alginato, la concentración del ion calcio y el contenido de los bloques G. La transición sol-gel se ha visto controlada por la habilidad de introducir el ion vinculante al alginato. También se ha observado que la cinética de gelificación y las propiedades del gel pueden depender del tipo de catión, es decir, el ion monovalente de la sal de alginato (K o Na), y donde los mecanismos son fundamentalmente dos:

#### *Gelificación externa*

La difusión del ion calcio ocurre desde una fuente que rodea al hidrocoloide hacia la solución de alginato de pH neutro. La formación del gel se inicia en la interfase y avanza hacia el interior a medida que la superficie se encuentra saturada de iones calcio, de manera que el ion sodio es desplazado por el catión divalente solubilizado en el agua, éste interacciona con los bloque G de diferentes moléculas poliméricas, enlazándolas entre sí. La sal más comúnmente utilizada es el  $\text{CaCl}_2$  debido a su mayor porcentaje de calcio disponible.

#### *Gelificación interna*

Consiste en la liberación controlada del ion calcio desde una fuente interna de sal de calcio insoluble o parcialmente soluble dispersa (Lupo et al. 2012).

## CAPITULO 2      DESARROLLO EXPERIMENTAL

### 2.1 Equipos, materiales, disolventes y reactivos

#### 2.1.1 Equipos

- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (KNAUER, Alemania), con dos bombas modelo Smartline 1000.
- Detector espectrofotométrico UV de arreglo de diodos, modelo Smartline 2600 (KNAUER, Alemania).
- *Software* de control y procesamiento de datos Eurochrom, edición V 3.05.
- Bucle de inyección de 20 µL (KNAUER, Alemania).
- Calentador de columna TC-50 (EPPENDFORF, EUA).
- Precolumna de 20 x 2 mm, empacada con adsorbente Nucleosil 100-5 C18, 5 µm (MACHEREY-NAGEL, Alemania).
- Columna analítica Gemini de 150 x 4.6 mm empacada con fase inversa C18 tamaño de partícula 5 µm (PHENOMENEX, EUA).
- Baño de ultrasonido modelo 1510, para desgasificación de la fase móvil (BRANSON, EUA).
- Balanza analítica AV 114 C (OHAUS, EUA).
- Autoclave eléctrica 2540EL (TUTTNAUER, NL).
- Lámparas fluorescentes de 14 Watts (OSRAM, México).
- Agitador orbital (THERMO SCIENTIFIC, EUA).
- Espectrofotómetro Spectronic Genesys 5 (THERMO SCIENTIFIC, EUA).
- Microscopio óptico (NATIONAL OPTICAL, EUA).
- Parrilla con agitación magnética (DAIGGER, EUA).
- Centrifuga 225 (THERMOFISHER SCIENTIFIC, EUA).
- Campana de flujo laminar 11231 BBC86 (BIOBASE, China).
- Agitador con controlador de temperatura SI-600R (JEIOTECH, Corea).
- Lámpara con foco de luz amarilla 20 Watts (OSRAM, México).
- Bomba peristáltica Multiflow (LAMBDA Laboratory Instruments, República Checa).

### 2.1.2 Material

- Asa bacteriológica en anillo.
- Mecheros de Bunsen.
- Celdas de plástico para región visible, 10 mm paso óptico.
- Portaobjetos y cubreobjetos.
- Sistema de esterilización aséptico Sterifil (MILLIPORE, EUA).
- Filtros de nitrocelulosa estériles con tamaño de poro de 0.22  $\mu\text{m}$  y 47 mm de diámetro para el sistema Sterifil (MILLIPORE, Irlanda).
- Cartuchos de empaque para extracción en fase sólida de 6 mL (VARIAN, EUA).
- Micropipeta 100 – 1000  $\mu\text{L}$  (EPPENDFORF, EUA).
- Pipeta graduada de 5 mL.
- Frites de polietileno.
- Vaso de precipitados de 150 mL.
- Matraces volumétricos de 5 y 100 mL.
- Matraces Erlenmeyer de 50 y 125 mL.
- Probetas de 10 mL.
- Pipetas Pasteur de vidrio.
- Tubos de vidrio para centrífuga de 15 mL.
- Viales con tapón de rosca de 10 mL.
- Bulbos para pipeta.
- Propipeta.

### 2.1.3 Reactivos y disolventes

- Estándar de Benzo[a]antraceno y Benzo[a]pireno, pureza >99% (CHEMSERVICE, EUA).
- Nitrato de sodio ( $\text{NaNO}_3$ ) (MALLINCKRODT, Irlanda).
- Cloruro de calcio dihidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (SIGMA-ALDRICH, EUA).
- Sulfato de magnesio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) (J.T. BAKER, EUA).
- Fosfato dibásico de potasio ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) (J.T. BAKER, EUA).
- Fosfato monobásico de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) (J.T. BAKER, EUA).
- Cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ ) (J.T. BAKER, EUA).
- Peptona proteosa (MCD Lab, México).
- Agar bacteriológico (MCD Lab, México).

- Alginato de sodio (SIGMA ALDRICH, EUA).
- Cloruro de calcio (SIGMA ALDRICH, EUA).
- Citrato de sodio (SIGMA ALDRICH, EUA).
- Metanol grado HPLC (JT Baker, EUA).
- Acetonitrilo grado HPLC (JT Baker, EUA).
- Isopropanol grado HPLC (JT Baker, EUA)
- Agua desionizada obtenida de un equipo de purificación Simplicity UV (MILLIPORE, EUA)
- Agua destilada (CONQUIMEX, México).
- Alcohol etílico (CONQUIMEX, México).

#### 2.1.4 Microorganismos

- Cepas de las microalgas *Selenastrum capricornutum* y *Scenedesmus acutus*, adquiridas de la colección de cultivos de algas de la Universidad de Austin, Texas (UTEX, EUA).

## 2.2 Experimentación

La experimentación usada en el presente trabajo está constituida por tres elementos fundamentales 1) Metodología analítica, 2) Manejo de microalgas, 3) Bioreactores, como se aprecia en la figura 2.1.

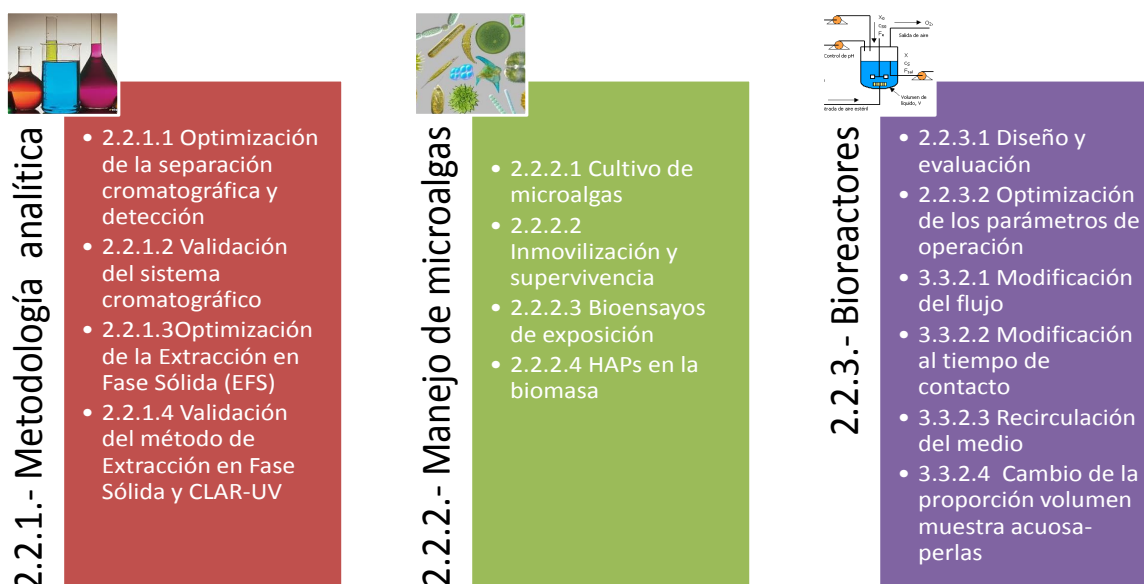


Figura 2.1 Elementos que constituyen la experimentación.

## 2.2.1 Metodología analítica

### 2.2.1.1 Optimización de la separación cromatográfica y detección

#### 2.2.1.1.1 Selección de la longitud de onda

A partir de una disolución de 1 mg/L de cada HAP, por separado, se hizo un barrido de 200 – 450 nm utilizando el espectrofotómetro de luz UV-Vis. Con el espectro obtenido se determinaron las longitudes de onda de máxima absorción ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) para cada compuesto.

#### 2.2.1.1.2 Selección de la fase móvil

Se utilizó una columna que presenta un carácter apolar para lograr una buena separación de la mezcla de los dos HAPs estudiados. Se probaron como fase móvil 100% Metanol y después 95:5 metanol:agua (v/v). Para ambas fases se calcularon los parámetros cromatográficos factor de capacidad, selectividad, eficiencia y resolución, utilizando las ecuaciones 2.1, 2.2, 2.3 y 2.4, respectivamente. Para la evaluación del tiempo muerto, se inyectaron 20  $\mu\text{L}$  de una disolución de  $\text{NaNO}_3$  (1 M).

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t'_R}{t_M} \quad \text{ec 2.1}$$

$k'$  - factor de capacidad

$t_R$ - tiempo de retención

$t_M$ - tiempo muerto

$t'_R$ - tiempo de retención corregido

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A} \quad \text{ec 2.2}$$

$\alpha$ - selectividad

$$N = 16 \left( \frac{t'_R}{w} \right)^2 \quad \text{ec 2.3}$$

$N$  - eficiencia

$w$  - ancho del pico a la base

$$RS = \frac{2(t'_{R1} - t'_{R2})}{w_1 + w_2} \quad \text{ec 2.4}$$

El equipo Knauer empleado, se puede ver en la figura 2.2.



**Figura 2.2** Cromatógrafo Knauer (Imagen Propia).

### **2.2.1.2 Validación del sistema cromatográfico**

#### **2.2.1.2.1 Linealidad del sistema**

Partiendo de una disolución “stock” de 100 mg/L de cada HAP en metanol, se preparó una disolución secundaria de 40 mg/L con ambos HAPs. De la disolución secundaria se preparó por triplicado la curva de calibración con 5 niveles de concentración. Las concentraciones de cada nivel de la curva fueron de 0.5, 1, 2.5, 5 y 10 mg/L. Se inyectaron al cromatógrafo, en las condiciones descritas; con las áreas obtenidas se construyeron las curvas de calibración graficando área vs concentración. Después se hizo la regresión lineal, para obtener el coeficiente  $r^2$  y así estimar la linealidad del sistema.

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

Se hicieron por triplicado 5 puntos de una curva de calibración con las siguientes concentraciones 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 y 1 mg/L; después se obtuvieron las áreas para cada analito, en su  $\lambda$  de detección correspondiente. Se calcularon los límites utilizando la desviación estándar de la regresión, con las siguientes ecuaciones:

$$L.D. = \frac{3.3 \times s_{y/x}}{b} \quad Ec. 2.5$$

$$L.C. = \frac{10 \times s_{y/x}}{b} \quad Ec. 2.6$$

Siendo  $s_{y/x}$  es la desviación estándar de la regresión lineal y  $b$  es la pendiente de la curva de calibración

### 2.2.1.2.3 Precisión

La precisión se evaluó preparando por quintuplicado dos disoluciones a diferentes concentraciones, 0.5 y 2.5 mg/L. Estas disoluciones fueron preparadas e inyectadas en tres días diferentes, dando un total de 15 réplicas para obtener la precisión intra e inter día, a través de calcular el porcentaje del coeficiente de variación (%C.V) o desviación estándar relativa (DER). El cálculo de este parámetro se obtiene a partir de la siguiente ecuación:

$$\%C.V. = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{Ec. 2.7}$$

Siendo  $s$  la desviación estándar del grupo de datos y  $\bar{x}$  el promedio del grupo de datos

### 2.2.1.3 Optimización de la Extracción en Fase sólida (EFS)

Para extraer el BaP de muestras de agua potable con microalgas inmovilizadas en cuentas de alginato se utilizó como referencia la metodología reportada por (Olmos Espejel 2013) para cultivo líquido proveniente de microalgas y adaptada por (Bernal Toris 2015) para cultivo con microalgas inmovilizadas. Para efectuar la optimización del método se tomó una muestra de 15 mL de agua potable, previamente en contacto por 24 h con las perlas de las microalgas inmovilizadas, la cual fue adicionada con los dos HAPs en estudio a una concentración de 0.266 mg/L de cada uno, utilizando un cartucho empacado con 300 mg de fase Supelclean LC18, previamente activada con metanol (1 g de LC18 / 1 mL metanol). Las disoluciones de acondicionamiento, carga y lavados, se pasaron a un flujo de 3 mL/min, utilizando vacío. El método seguido se describe a continuación:

#### Acondicionamiento

- 3 mL de ACN
- 10 mL de agua destilada

#### Carga de la muestra

- 15 mL de la muestra

## Lavados

- 10 mL de una disolución al 20% (v/v) de isopropanol-agua, proveniente del matraz que contiene las perlas. Este lavado se realiza debido a la adsorción de los HAPs al vidrio.
- 10 mL de agua:acetonitrilo 90:10
- 2.5 mL de agua:acetonitrilo 80:20
- 1 mL de agua:acetonitrilo 70:30
- 3 mL de agua:acetonitrilo 45:55

## Elución

- 6 mL de acetonitrilo a gravedad. Después evaporar el extracto a sequedad a 70°C, reconstituir en 1 mL de acetonitrilo y llevarlo a análisis por CLAR-UV.

### **2.2.1.4 Validación del método de EFS- CLAR-UV**

Toda la validación de la metodología se hizo utilizando agua potable en contacto con las perlas (con microalgas) por 24 horas.

Para fijar el intervalo de trabajo en los ensayos de exposición se consideró como base (100%) la concentración de 0.266 mg/L que fue la que se utilizó en la exposición y las demás concentraciones se refieren al % de remoción que representarían. La tabla 2.1, muestra la equivalencia de diferentes concentraciones de los HAPs en el medio de exposición y las esperadas en el extracto de 1 mL, obtenido a partir de 15 mL de muestra, así como el % removido correspondiente. Estas concentraciones se utilizaron para establecer el rango a manejar en la linealidad del método explicada en la siguiente sección.

**Tabla 2.1** Concentraciones en el medio y equivalentes en el extracto (factor de concentración = 15) así como % remoción esperado

Concentraciones (mg/L)		% Remoción
Medio	Extracto	
0.266	4	0
0.187	2.8	30
0.107	1.6	60
0.027	0.4	90
0.013	0.2	95
0.003	0.05	99



#### 2.2.1.4.1 Linealidad

Para validar la linealidad del método se prepararon muestras por triplicado. Se llevó a cabo la extracción por EFS para evaluar la recuperación de los HAPs, el extracto concentrado en 1 mL se inyectó al cromatógrafo; con las áreas obtenidas se construyeron las curvas de calibración, se graficó área vs concentración y cantidad adicionada vs cantidad recuperada. Después se hizo la regresión lineal, para obtener el coeficiente  $r^2$  y así estimar la linealidad del método.

Se calcularon los  $\mu\text{g}$  agregados al medio, en cada una de las concentraciones utilizadas, fijadas para el intervalo de trabajo (ver tabla 2.1) utilizando la ecuación 2.8.

$$\mu\text{g}_{\text{recuperados}} = \text{Concentración}_{\text{medio}} \left( \frac{\mu\text{g}}{\text{L}} \right) \times \text{Volumen}_{\text{medio}} (\text{L}) \quad \text{Ec. 2.8}$$

Ejemplo:

$$\mu\text{g}_{\text{recuperados}} = 266 \frac{\mu\text{g}}{\text{L}} \times 0.015\text{L} = 4 \mu\text{g}$$

Los  $\mu\text{g}$  recuperados se determinaron con la ecuación 2.9.

$$\mu\text{g recuperados} = \frac{\text{Área del extracto}}{\text{Área del estándar}} \times \mu\text{g adicionados} \quad \text{Ec. 2.9}$$

Ejemplo:

Se adicionaron 4  $\mu\text{g}$  del HAP a 15 mL de agua potable, esperando una recuperación del 100% en el extracto concentrado de 1 mL, la concentración sería de 4 mg/L. Para el BaA, el área de la concentración del estándar de 4 mg/L fue de 20.9363 unidades y el área media del extracto fue de 15.5489 unidades, por lo tanto se recuperaron 2.97  $\mu\text{g}$  de acuerdo al cálculo siguiente:

$$\mu\text{g recuperados} = \frac{15.5489}{20.9363} \times 4 \mu\text{g} = 2.97 \mu\text{g}$$

Así al graficar los  $\mu\text{g}$  agregados vs los  $\mu\text{g}$  recuperados, para cada compuesto, se obtuvo el coeficiente de determinación  $r^2$  para estimar la linealidad y también la recuperación global del método, que es el correspondiente al valor de la pendiente de cada curva, multiplicada por 100. Las 6 concentraciones utilizadas para las muestras fortificadas fueron 0.003, 0.013, 0.027, 0.107, 0.187 y 0.266 mg/L, equivalentes en los extractos a

0.05, 0.2, 0.4, 1.6, 2.8 y 4 mg/L respectivamente, una vez que ya se ha concentrado el extracto.

#### **2.2.1.4.2 Límites de detección (L.D.) y cuantificación (L.C.) del método**

Los límites de detección y cuantificación del método se determinaron con base en la curva de calibración anterior de 6 puntos. Se inyectaron los extractos concentrados a 1 mL, obtenidos de muestras fortificadas y con las áreas resultantes, se calcularon los límites utilizando la desviación estándar de la regresión, aplicando las ecuaciones 2.5 y 2.6 de la página 52.

#### **2.2.1.4.3 Precisión**

La evaluación de la precisión se hizo preparando 3 muestras de agua potable fortificadas a dos diferentes concentraciones que fueron 0.027 y 0.266 mg/L, equivalentes a 0.4 y 4 mg/L en el extracto concentrado, respectivamente. Estas disoluciones fueron preparadas e inyectadas en 2 días diferentes, dando un total de 6 réplicas para obtener la precisión intra e inter día, a través de calcular el porcentaje del coeficiente de variación (%C.V) o desviación estándar relativa (DER). El cálculo de este parámetro se obtiene a partir de la ecuación 2.7 de la página 53.

### **2.2.2 Manejo de microalgas**

#### **2.2.2.1 Cultivo de microalgas**

Las dos especies de microalgas utilizadas, *S. acutus* y *S. capricornutum*, fueron crecidas bajo condiciones axénicas; los medios sólido y líquido utilizados para la siembra y crecimiento de las microalgas fueron esterilizados en autoclave eléctrica a 121 °C, 15 psi por 30 minutos. Los medios de cultivo líquido se preparan con medio Bristol (cuya composición se muestra en la tabla 2.2, el cual fue adicionado con peptona proteosa al 0.5% p/v para *S. acutus* y al 1% (p/v) para *S. capricornutum*. El medio de cultivo sólido se preparó al adicionar el equivalente a 1.5% (p/v) de agar al medio Bristol además de la peptona proteosa.

El crecimiento se realizó en volumen de 100 mL en una cámara a temperatura ambiente, con períodos de luz/oscuridad de 16/8 horas iluminadas con lámparas fluorescentes de 14 W en agitación constante. Su crecimiento fue monitoreado semanalmente tomando pequeñas alícuotas del cultivo para medir su absorbancia en el

espectrofotómetro UV-Vis. La longitud de onda de medición elegida fue a 685 nm por ser la longitud de máxima absorción de la clorofila. Se monitoreó la absorbancia porque se relaciona con el número de microalgas presentes en los medios de cultivo; un valor de absorbancia igual a uno corresponde aproximadamente a  $4.5 \times 10^6$  y  $4 \times 10^6$  células/mL, para *S. capricornutum* y *S. acutus* respectivamente.

**Tabla 2.2** Composición del medio Bristol.

Compuesto	Masa de los compuestos para preparar 400 mL de disolución stock (g)	Volumen a tomar de la disolución stock para 1 L de medio de cultivo (mL)	Concentración final, en 1 L de medio de cultivo (mM)
NaNO <sub>3</sub>	10	10	2.94
CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	1	10	0.17
MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	3	10	0.30
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3	10	0.43
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7	10	1.29
NaCl	1	10	0.43

En la figura 2.3 se muestran los cultivos (sólido y líquido) en donde fueron crecidas las microalgas. Los medios de cultivo sólido fueron utilizados para la preservación de las microalgas. Se utilizó el agitador orbital para tener en agitación constante los cultivos líquidos.



**Figura 2.3** Cultivos de las microalgas, Medio sólido (izquierda) y medio líquido (derecha). Imagen propia.

### 2.2.2.2 Inmovilización de microalgas en las cuentas de alginato y supervivencia

Se siguió el procedimiento desarrollado por Bernal Toris(2015). Todo el material de vidrio y las disoluciones de  $\text{CaCl}_2$  fueron esterilizados en autoclave eléctrica a 121 °C y 15 psi, por 30 minutos. La disolución de alginato de sodio se esterilizó con el sistema de filtración Sterifil (ver figura 2.4) en una zona aséptica.

Una vez que los cultivos alcanzaron una absorbancia igual a uno se tomaron alícuotas de 15 mL de cada cultivo. Cada especie fue inmovilizada en cuentas por separado realizando la siguiente secuencia: la alícuota tomada del cultivo, en absorbancia uno, se centrifugó a 3900 rpm por 15 minutos. Pasado ese tiempo, se separaron 13 mL del sobrenadante y se resuspendieron las microalgas en el medio restante (aprox. 2 mL). Las microalgas concentradas en los 2 mL del sobrenadante se mezclaron con 4 mL de una disolución estéril de alginato de sodio al 3% (p/v). Después en la campana de flujo laminar la mezcla alginato-microalgas fue goteada, con una pipeta graduada de 5 mL, en 25 mL de una disolución estéril de cloruro de calcio al 1% (p/v) para formar perlitás esféricas. Las perlas con microalgas se dejaron 2 min en la disolución de cloruro para endurecerlas; posteriormente se descartó la disolución de cloruro de calcio y se enjuagaron las cuentas con agua potable. La figura 2.5 muestra un esquema del procedimiento anteriormente descrito.

Siguiendo el procedimiento anterior se produjeron aproximadamente de 90 a 95 perlas uniformes translúcidas, con un diámetro aproximado de 4.0 mm, mismas que se dejaron en 15 mL de agua potable hasta el momento de ser utilizadas (ver figura 2.6).

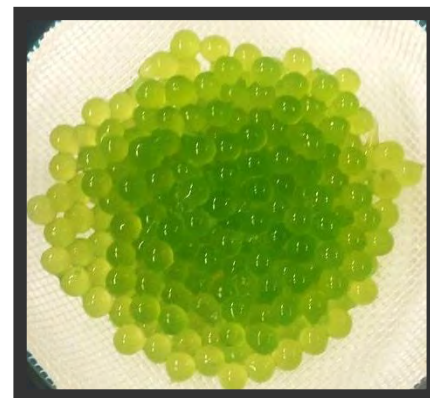


**Figura 2.4** Esterilización del alginato de sodio, a través de un sistema de filtración (Imagen propia).

## Inmovilización en alginato



**Figura 2.5** Procedimiento seguido para inmovilizar las microalgas.

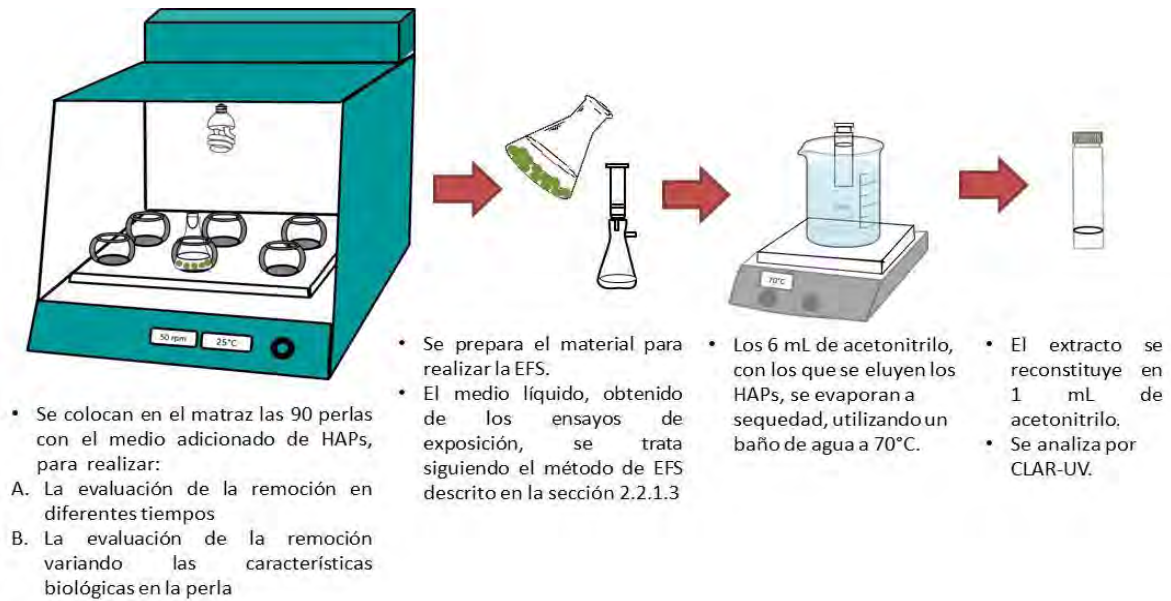


**Figura 2.6** Perlas de alginato-microalga obtenidas de la inmovilización. (Imagen propia).

Para evaluar si las microalgas se mantenían vivas, una vez inmovilizadas en alginato y suspendidas en agua potable, se hicieron observaciones acerca del cambio de color en la perla y después la observación al microscopio para comparar color y forma de las células pasado el período de un mes. Para comparación, primero se observaron las microalgas en estado libre y después las inmovilizadas, liberándolas del alginato con una disolución de citrato de sodio al 9% (p/v).

### 2.2.2.3 Bioensayos de exposición

Una vez que se validó el método de EFS-CLAR-UV, se expusieron las perlas de alginato-microalga (cada especie por separado) a la presencia de HAPs. Para estos ensayos se utilizó un agitador orbital SI-600R. Se evaluó la remoción de los HAPs de las perlas de alginato sin algas (blanco) y el efecto en la remoción de las perlas conteniendo cada especie de microalga, a diferentes tiempos de exposición y cambiando el número de microalgas por perlas (Ver sección 2.2.2.3.1 y 2.2.2.3.2). La figura 2.7 muestra el procedimiento general para llevar a cabo los bioensayos.



**Figura 2.7** Procedimiento general para llevar a cabo los ensayos de exposición y el posterior tratamiento de la muestra, previo al análisis cromatográfico.

A continuación se describen las condiciones de los bioensayos con cada una de las variables estudiadas.

### 2.2.2.3.1 Evaluación de la remoción en diferentes tiempos

Las exposiciones se realizaron colocando 90 perlas en 15 mL de agua potable fortificada a 0.266 mg/L, con agitación constante de 50 rpm, a 25°C y luz amarilla (foco de 20 W), variando el tiempo de exposición (3, 6 y 15 h). Para realizar estos bioensayos primero se calculó el número de microalgas por perla de acuerdo a la ecuación 2.10.

$$\frac{\text{microalgas}}{\text{perla}} = \frac{\text{Núm. de microalgas}}{\text{mL}} \times \frac{\text{Vol. alícuota (mL)}}{\text{Núm. de perlas}} \quad \text{Ec 2.10}$$

Para las perlas de alginato-*S. capricornutum*, se calculó:

$$\frac{\text{microalgas de } S. \text{ capricornutum}}{\text{perla}} = \frac{4.5 \times 10^6}{\text{mL}} \times \frac{15 \text{ mL}}{90 \text{ perlas}} = 7.5 \times 10^5 \frac{\text{microalgas}}{\text{perla}}$$

Para las perlas de alginato-*S. acutus*, se calculó:

$$\frac{\text{microalgas de } S. \text{ acutus}}{\text{perla}} = \frac{4 \times 10^6}{\text{mL}} \times \frac{15 \text{ mL}}{90 \text{ perlas}} = 6.6 \times 10^5 \frac{\text{microalgas}}{\text{perla}}$$

Los sistemas evaluados fueron los siguientes:

- 1) **HAPs**: 15 mL de agua potable adicionados con HAPs. Se hizo con la finalidad de evaluar el efecto de la luz en la remoción.
- 2) **BCO+HAPs**: 15 mL de agua potable con 90 perlas de alginato de calcio (ALG), adicionados con HAPs. Se hizo para evaluar la remoción de la matriz alginato sin contener las microalgas.
- 3) **SCAP+HAPs**: 15 mL de agua potable con 90 perlas de alginato de calcio - *S. capricornutum* (SCAP), adicionados con HAPs. Se hizo para evaluar la remoción del sistema alginato-*S. capricornutum*.
- 4) **SAC+HAPs**: 15 mL de agua potable con 90 perlas de alginato de calcio - *S. acutus* (SAC), adicionados con HAPs. Se hizo para evaluar la remoción del sistema alginato-*S. acutus*.

El porcentaje de remoción se calculó a partir de la ec. 2.11

$$\% \text{ Remoción} = \frac{\text{Cantidad inicial} - \text{Cantidad remanente}}{\text{Cantidad inicial}} \times 100 \quad \text{Ec. 2.11}$$

#### 2.2.2.3.2 Evaluación de la remoción variando las características biológicas en la perla

Estas exposiciones se realizaron colocando 90 perlas en 15 mL de agua potable fortificada a 0.266 mg/L, con agitación constante de 50 rpm, a 25°C y luz amarilla (foco de 20 W), durante 6 horas, variando las características biológicas de las cuentas de alginato-microalga.

Las variaciones consistieron en modificar la cantidad de microalgas por cuenta, el número de cuentas utilizadas y hacer una mezcla de las perlas con cada especie en diferentes proporciones. Se comparó si era mayor, menor o igual el % de remoción, haciendo las modificaciones siguientes, además de comparar con los respectivos blancos de alginato (BCO+HAPs).

- 1) 90 perlas con el doble de microalgas por cuenta (lo doble que el usado en la sección 2.2.2.3.1).

Para lograr esto se tomaron dos alícuotas de 15 mL del mismo cultivo en absorbancia 1, se centrifugaron por separado durante 15 min a 3900 rpm, y los botones de microalgas se resuspendieron en 1 mL del sobrenadante. Se mezclaron en un solo tubo los dos botones de microalgas y para la inmovilización se siguió el mismo procedimiento descrito en 2.2.2.2 (pág. 57). El número de microalgas por perla se calculó siguiendo la ec. 2.10, pero multiplicando por dos el volumen de la alícuota tomada.

Para las perlas de alginato-*S. capricornutum*, se calculó:

$$\frac{\text{microalgas de } S. \text{ cap}}{\text{perla}} = \frac{4.5 \times 10^6}{\text{mL}} \times \frac{2(15 \text{ mL})}{90 \text{ perlas}} = 1.5 \times 10^6 \frac{\text{microalgas}}{\text{perla}}$$

Para las perlas de alginato-*Scenedesmus acutus*, se calculó:

$$\frac{\text{microalgas de } S. \text{ acutus}}{\text{perla}} = \frac{4 \times 10^6}{\text{mL}} \times \frac{2(15 \text{ mL})}{90 \text{ perlas}} = 1.3 \times 10^6 \frac{\text{microalgas}}{\text{perla}}$$

El resultado del número de microalgas por perla para la *S. capricornutum* es de  $1.5 \times 10^6$  y para *S. acutus*  $1.3 \times 10^6$ , el doble de la concentración obtenida en los experimentos realizados previamente.

- 2) 180 perlas con el mismo número de microalgas iniciales (lo mismo que la sección 2.2.2.3.1, pág. 60). En este caso se tiene el doble de cuentas de alginato y cada cuenta tiene la mitad de células que en los experimentos previos.

En este caso se tomó solo una alícuota de 15 mL de un cultivo en absorbancia 1, se centrifugó por 15 min a 3900 rpm, pero se dejó un sobrenadante de 4 mL para su resuspensión. Las microalgas concentradas en los 4 mL del sobrenadante, se mezclaron con 8 mL de una disolución de alginato de sodio al 3% (p/v). Se continuó realizando el procedimiento de inmovilización descrito en 2.2.2.2. El número de microalgas por perla en este punto se calculó utilizando la ec. 2.10, pero ahora dividiendo entre las 180 perlas obtenidas con este procedimiento.



Para las perlas de alginato-*S. capricornutum*, se calculó:

$$\frac{\text{microalgas de } S. \text{ cap}}{\text{perla}} = \frac{4.5 \times 10^6}{\text{mL}} \times \frac{15 \text{ mL}}{180 \text{ perlas}} = 3.7 \times 10^5 \frac{\text{microalgas}}{\text{perla}}$$

Para las perlas de alginato-*S. acutus*, se calculó:

$$\frac{\text{microalgas de } S. \text{ acutus}}{\text{perla}} = \frac{4 \times 10^6}{\text{mL}} \times \frac{15 \text{ mL}}{180 \text{ perlas}} = 3.3 \times 10^5 \frac{\text{microalgas}}{\text{perla}}$$

La concentración de microalgas/perla obtenida corresponde a la mitad de la concentración que se tiene en los experimentos inicialmente realizados.

- 3) 90 perlas totales, pero haciendo mezclas que contenían a las dos especies de microalgas (inmovilizadas por separado) con *S. acutus* - *S. capricornutum* en las siguientes proporciones 25:75, 50:50 y 75:25. Se manejó el mismo número de células que en 2.2.2.3.1.

Para realizar las mezclas propuestas se siguió el mismo procedimiento descrito en 2.2.2.2 hasta la preparación de la disolución de alginato-microalgas. Por lo tanto cada cuenta, por separado tenía aproximadamente el mismo número de células,  $7.7 \times 10^5$  y  $6.6 \times 10^5$  microalgas de *S. capricornutum* y *S. acutus* respectivamente.

En el caso de las mezclas 25:75 y 75:25, se sacó la proporción: si 25% de 90 perlas son 22 perlas por lo tanto 75% son 68 perlas, entonces se gotearon 22 perlas de un cultivo y luego 68 perlas del otro cultivo, en la disolución de  $\text{CaCl}_2$ , para que sumaran 90 perlas.

Para la mezcla de 50:50 se gotearon 45 perlas de cada cultivo preparado por separado, dando un total de 90 perlas.

Los sistemas evaluados, variando las características de la perla, se compilan en la tabla 2.3. Cada ensayo se realizó por triplicado y los resultados se muestran en la tabla 3.5 (pág. 89).

**Tabla 2.3** Identificación de los bioensayos realizados, variando las características de la perla de alginato

Bioensayo	Sistema	No. de perlas	No. de microalgas/perla	Finalidad
1	BCO 90 + HAPs (3)	90	0	Evaluar la remoción por sorción de las perlas de alginato de calcio, durante 3 horas
2	BCO 180 + HAPs (3)	180	0	Evaluar la remoción por sorción del doble de perlas de alginato de calcio por 3 horas
3	BCO 90 + HAPs (6)	90	0	Evaluar la remoción por sorción de las perlas de alginato de calcio por 6 horas
4	BCO 180 + HAPs (6)	180	0	Evaluar la remoción por sorción del doble de perlas de alginato de calcio por 6 horas
5	SCAP 90 + HAPs	90	$7.5 \times 10^5$	Evaluar la remoción del sistema alginato- <i>S. capricornutum</i>
6	SCAP 180 + HAPs	180	$3.7 \times 10^5$	Evaluar la remoción del sistema alginato- <i>S. capricornutum</i> con la mitad de células por perla
7	SCAP 2C + HAPs	90	$1.5 \times 10^6$	Evaluar la remoción del sistema alginato- <i>S. capricornutum</i> con el doble de células por perla
8	SAC 90 + HAPs	90	$6.6 \times 10^5$	Evaluar la remoción del sistema alginato- <i>S. acutus</i> .
9	SAC 180 + HAPs	180	$3.3 \times 10^5$	Evaluar la remoción del sistema alginato- <i>S. acutus</i> con la mitad de células por perlas
10	SAC 2C + HAPs	90	$1.3 \times 10^6$	Evaluar la remoción del sistema alginato- <i>S. acutus</i> con el doble de células por perlas
11	75:25 SCAP-SAC	90	$7.5 \times 10^5$ <i>S. capricornutum</i> $6.6 \times 10^5$ <i>S. acutus</i>	Evaluar la remoción haciendo una mezcla de perlas de ambas microalgas donde predominara la especie <i>S. capricornutum</i> .
12	50:50 SCAP-SAC	90	$7.5 \times 10^5$ <i>S. capricornutum</i> $6.6 \times 10^5$ <i>S. acutus</i>	Evaluar la remoción haciendo una mezcla de perlas de ambas microalgas en la misma proporción.
13	75:25 SAC-SCAP	90	$7.5 \times 10^5$ <i>S. capricornutum</i> $6.6 \times 10^5$ <i>S. acutus</i>	Evaluar la remoción haciendo una mezcla de perlas de ambas microalgas donde predominara la especie <i>S. acutus</i> .

Todos los bioensayos se realizaron con 15 mL de agua potable con 0.266 mg/L de cada HAP (4 µg)

Todos los bioensayos se hicieron en 6 h, menos 1 y 2, realizados en 3 h.

#### 2.2.2.4 HAPs en la biomasa

Un estudio complementario consistió en buscar la presencia de HAPs en la biomasa de las microalgas, después de incubar por 6 horas, en agitación orbital; el ensayo se hizo trabajando cada microalga por separado. La finalidad de este estudio, fue

ver la presencia de los HAPs en la biomasa y usar las cantidades totales (medio y biomasa) remanentes para calcular el porcentaje de degradación de acuerdo a la relación:

$$\mu g \text{ tot remanentes} = \mu g_{\text{medio líquido}} + \mu g_{\text{biomasa}} \quad \text{Ec. 2.12}$$

$$\% \text{ degradación} = \frac{\mu g \text{ iniciales} - \mu g \text{ tot remanentes}}{\mu g \text{ iniciales}} \times 100 \quad \text{Ec. 2.13}$$

La extracción se realizó por Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS) siguiendo la metodología validada por Bernal Toris (2015), que consistió en lo siguiente: Liberar las microalgas con 10 mL de una disolución de citrato de sodio al 9% (p/v), se agitaron las perlas en la disolución de citrato hasta formar una disolución homogénea; se centrifugó por 15 minutos a 3500 rpm para separar la biomasa. Una vez que se separó la biomasa se puso a secar. Se obtuvieron alrededor de 5 mg de biomasa seca y se mezclaron con 100 mg de sílice C18 en un mortero de ágata. Se obtuvo una mezcla homogénea, la cual se empacó entre dos frits en un cartucho de 1 mL. Se realizó la siguiente secuencia de lavados: 1) 10 mL de agua 2) 5 mL de una disolución 20% ACN en agua 3) 1.5 mL de una disolución 60% ACN en agua; finalmente se eluyeron los HAPs con 0.5 mL de una disolución al 90% ACN y este extracto es el que fue analizado por CLAR-UV.

### 2.2.3 Bioreactores

Las perlas de alginato-microalga fueron evaluadas para ser el empaque de un pequeño bioreactor de volumen de 15 mL de agua potable más las 90 perlas. De manera práctica se midió que el volumen que ocupan las perlas, vaciándolas en una probeta, era de aproximadamente 7 mL. Entonces, el volumen del reactor debía tener un volumen aproximado de 22 mL. A través del cálculo, considerando la forma del bioreactor, se determinó que el volumen debía ser de aproximadamente 25 mL.

#### Condiciones de operación

Las condiciones de operación se establecieron de acuerdo a los resultados óptimos obtenidos en los experimentos descritos en las secciones anteriores. Así, en un contenedor ámbar se preparó una disolución de 30 mL de agua potable (muestra a tratar) que tuviera 0.266 mg/L de BaA y BaP (4 µg de cada HAP en 15 mL y 8 µg totales). Cada bioreactor se empacó con 90 perlas de alginato-mezcla de cultivos 50:50 *S. capricornutum*-*S. acutus*, con una concentración del doble de células por perla ( $1.5 \times 10^6$  para las perlas de *S. capricornutum* y  $1.3 \times 10^6$  para las perlas de *S. acutus*). En un inicio, se les llenó con 15 mL de muestra acuosa adicionada con HAPs.

Así, el bioreactor operó en 2 ciclos de prueba, donde cada ciclo consistió en las dos etapas siguientes (una estática y una dinámica):

- 1) Dejar 15 mL de la muestra acuosa en contacto con las microalgas inmovilizadas durante 3 horas (TE1 = tiempo estático).
- 2) Activar la bomba peristáltica para recolectar 15 mL de la muestra acuosa en 3 horas (TD1= tiempo dinámico), a un flujo de 0.08 mL/min (F1). Al realizar 2 ciclos se recolectaron en cada uno un volumen de 15 mL (R1 y R2). Como el tiempo de operación por ciclo fue de 6 horas, el tiempo total de operación de cada bioreactor fue de 12 horas.

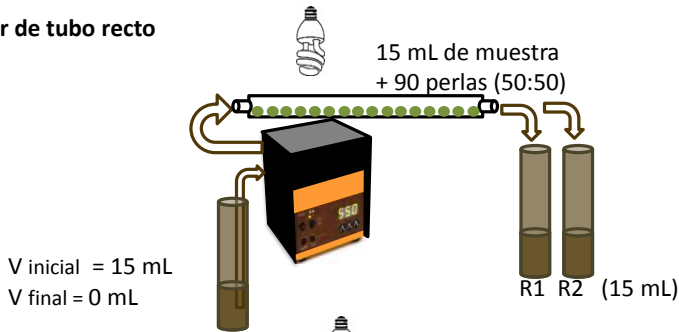
#### 2.2.3.1 Diseño y evaluación de los diseños

Los reactores fueron hechos de vidrio, por el taller de vidrio de la Facultad de Química de la UNAM. Se diseñaron tres modelos con formas diferentes de reactores, considerando que se manejarían en un sistema semicontínuo, se fijó una entrada y una salida.

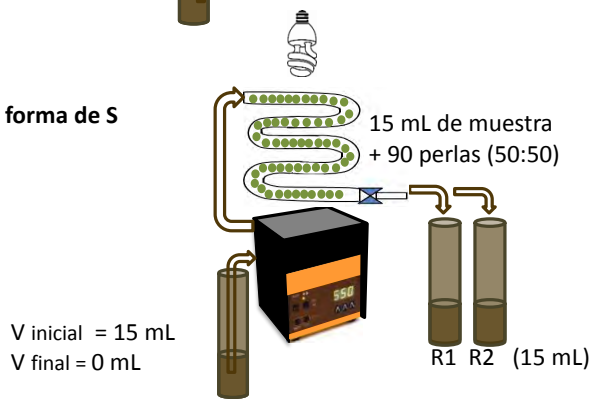
Los diseños consistieron en tubos con tres diferentes formas: 1) Reactor de tubo recto, 2) Reactor en forma de S y 3) Reactor en espiral. El medio acuoso se hizo pasar a través de los bioreactores con una bomba peristáltica, la cual ayudó en la regulación del flujo. Para cada diseño, se evaluaron aspectos como el % de remoción de los HAPs del

medio acuoso, ventajas como espacio y distribución del empaque, entre otros (Ver figura 2.8).

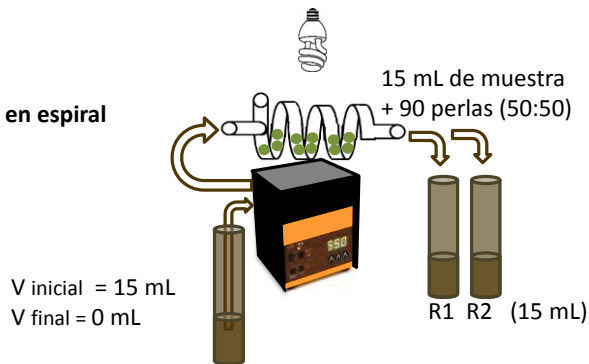
**1) Reactor de tubo recto**



**2) Reactor en forma de S**



**3) Reactor en espiral**



**Tiempo de operación de cada ciclo**  
Ciclo 1 (TE1+TD1)=6 h  
Ciclo 2 (TE1+TD1)=6 h

**Tiempo total de operación de cada bioreactor**  
Ciclo 1+ Ciclo 2=12 h

R1 y R2 se recolectan a un flujo F1, para después tratarse con el Método EFS-CLAR-UV

**Figura 2.8** Procedimiento general para evaluar los diferentes diseños del bioreactor.  
Concentración de la muestra= 0.266 mg/L, TE1= 3h, TD1= 3h, F1= 0.08 mL/min  
R1= 15 mL en el ciclo 1, R2= 15 mL en el ciclo 2.

### **2.2.3.2 Optimización de los parámetros de operación**

Se buscó optimizar las condiciones de operación del bioreactor elegido con la forma óptima. Se hicieron variaciones en la velocidad del flujo, tiempo de contacto estático del sistema muestra acuosa-perlas, recirculación del medio y aumento del volumen de la muestra. Con estas pruebas se observó la eficiencia de la remoción partiendo de un medio adicionado con 0.266 mg/L de cada HAP.

#### **2.2.3.2.1 Modificación del flujo**

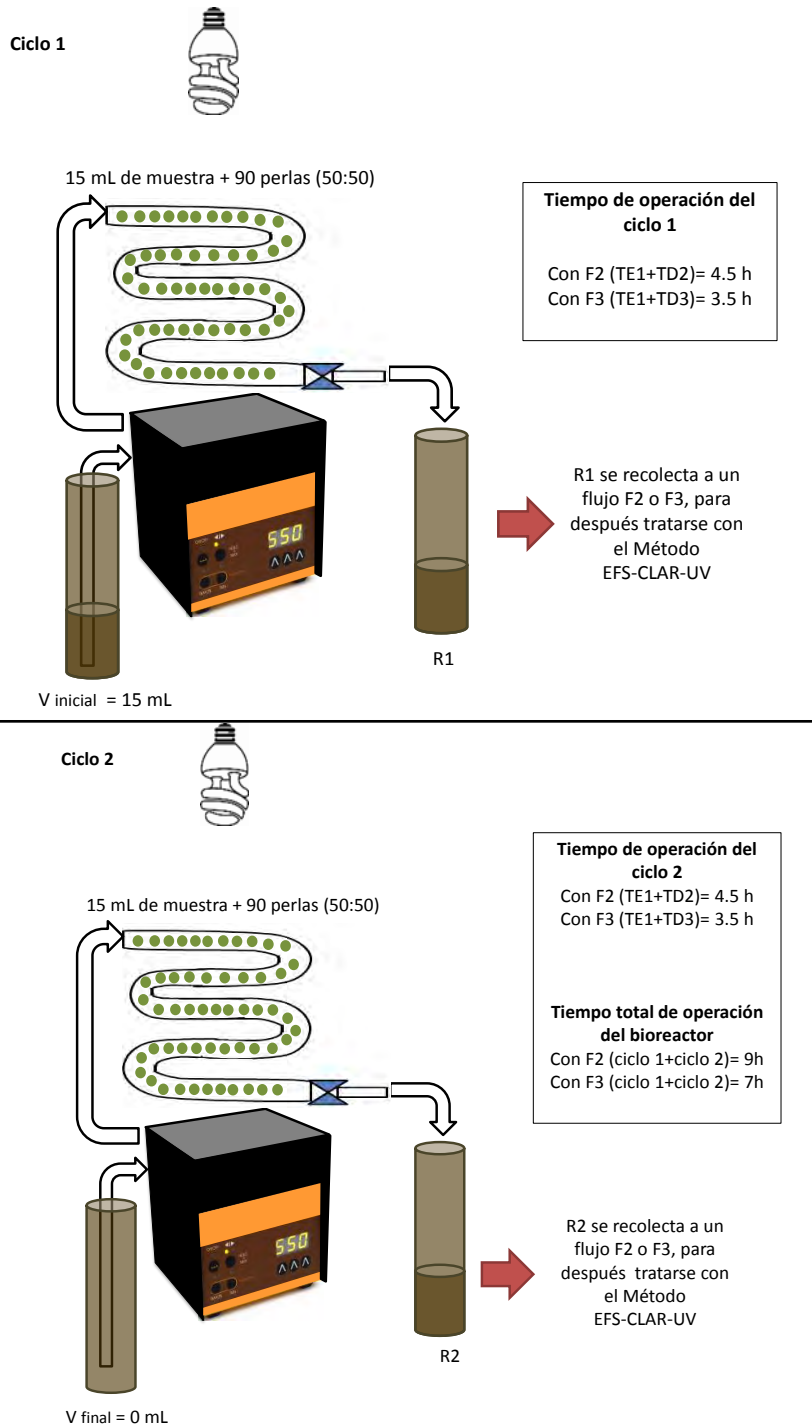
Estos ensayos se realizaron continuando con la evaluación de 2 ciclos de prueba, manteniendo el tiempo de contacto estático de 3 horas (TE1), pero cambiando el flujo inicial (F1) para cada ensayo con otros dos flujos más:

- a) Flujo de 0.16 mL/min (F2), para recolectar 15 mL del medio en 1.5 horas (TD2).
- b) Flujo de 0.5 mL/min (F3), para recolectar 15 mL del medio en 0.5 horas (TD3).

Al hacer estas variaciones del flujo se buscó reducir el tiempo de operación pero buscando mantener un alto % de remoción del HAP ( $\approx 80\%$ ). La figura 2.9 muestra un diagrama general del procedimiento seguido.

Al realizar 2 ciclos se recolectaron en cada uno el volumen de 15 mL (R1 y R2). El tiempo de operación para el ensayo con F2 fue de 4.5 horas por ciclo, dando un tiempo total de operación de 9 horas; para el ensayo con F3 el tiempo de operación por ciclo fue de 3.5 horas y un tiempo total de operación de 7 horas.

Estos ensayos también se hicieron con perlas de alginato solo (Blanco), e igualmente se midió el % de remoción de los HAPs.



**Figura 2.9** Procedimiento seguido al modificar el flujo.  
 Concentración de la muestra= 0.266 mg/L, TE1= 3h,  
 TD2= 1.5h, F2= 0.16 mL/min, TD3= 0.5h, F3= 0.5 mL/min  
 R1= 15 mL en el ciclo 1, R2= 15 mL en el ciclo 2.

#### **2.2.3.2.2 Modificación del tiempo de contacto estático**

Este ensayo consistió en modificar el tiempo de contacto estático de la muestra acuosa y las perlas. Para ello se hizo lo siguiente (ver Fig. 2.10):

- 1) Se dejó en contacto la muestra acuosa y las perlas por 4 horas (TE2)
- 2) Se recolectaron 15 mL de medio acuoso en un tiempo dinámico de 0.5 horas (TD3), con el flujo de 0.5 mL/min (F3), teniendo un tiempo de operación por cada ciclo de 4.5 horas y un tiempo total de operación de 9 horas por los dos ciclos, en cada ciclo se recolectaron R1 y R2.

Los resultados de esta modificación se compararon con el ensayo de tiempo estático de 3 horas (TE1), con tiempo dinámico de 1.5 horas (TD2), recolectando la muestra a un flujo de 0.16 mL/min (F2), donde el tiempo de operación total es también de 9 horas. La comparación también se efectuó con el sistema que contenía perlas de alginato sin microalgas (Blanco) y perlas de alginato-mezcla 50:50 de especies de microalgas.

#### **2.2.3.2.3 Recirculación del medio**

En la búsqueda de optimizar el % de remoción, se modificó la forma del bioreactor en S (cambio de sitio de la boquilla) para que pudiera haber recirculación del medio. También se evaluaron 2 ciclos, los cuales consistieron en adicionar 30 mL de agua potable con una concentración de 0.266 mg/L de BaA y BaP (8 µg totales de cada HAP). Este medio fue recirculado en el bioreactor empacado con 90 perlas de alginato. En el primer ciclo, se hizo recircular el agua por 3 horas con un flujo de 0.16 mL/min (F2). Después de recircular por ese tiempo, se recogió el primer volumen de 15 mL (R1) en un tiempo de TD2 de 1.5 horas con el mismo flujo (F2).

En el segundo ciclo, se continuó con la recirculación de los 15 mL restantes por 3 horas, a un flujo de 0.16 mL/min (F2). Pasado ese tiempo se recolectaron esos 15 mL (R2) en un tiempo de TD2 de 1.5 horas con el mismo flujo (F2).

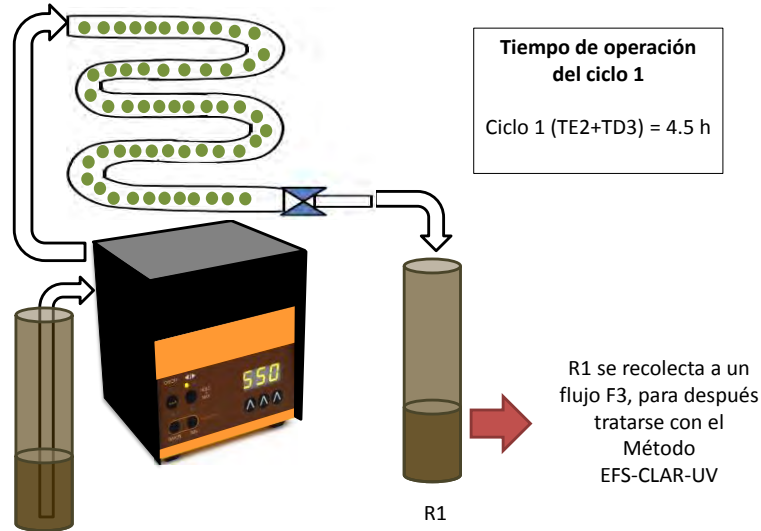
El tiempo de operación del bioreactor fue de 4.5 horas por cada ciclo. Por los dos ciclos el tiempo total de operación fueron 9 horas. Se planeó realizar este ensayo utilizando perlas de alginato sin microalgas (blanco) y con las perlas de alginato - mezcla 50:50 de especies de microalgas, este ensayo se ilustra en la figura 2.11.



Ciclo 1



15 mL de muestra + 90 perlas (50:50)

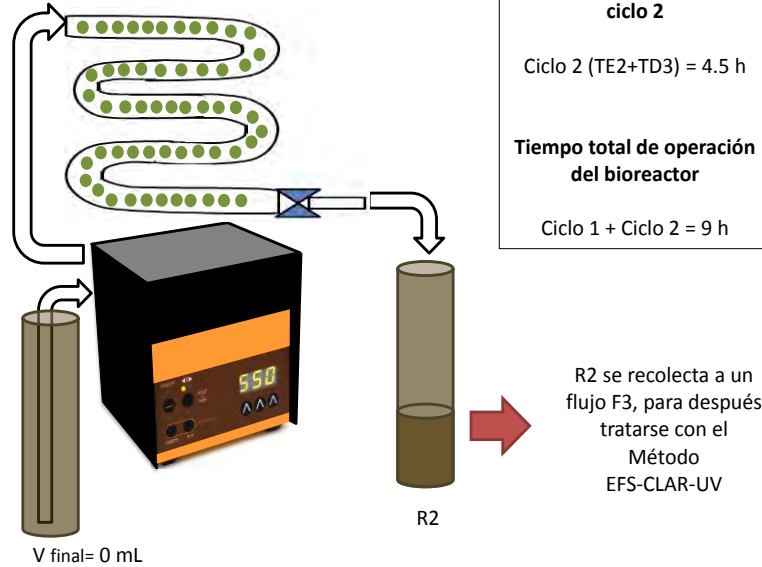


V inicial = 15 mL

Ciclo 2



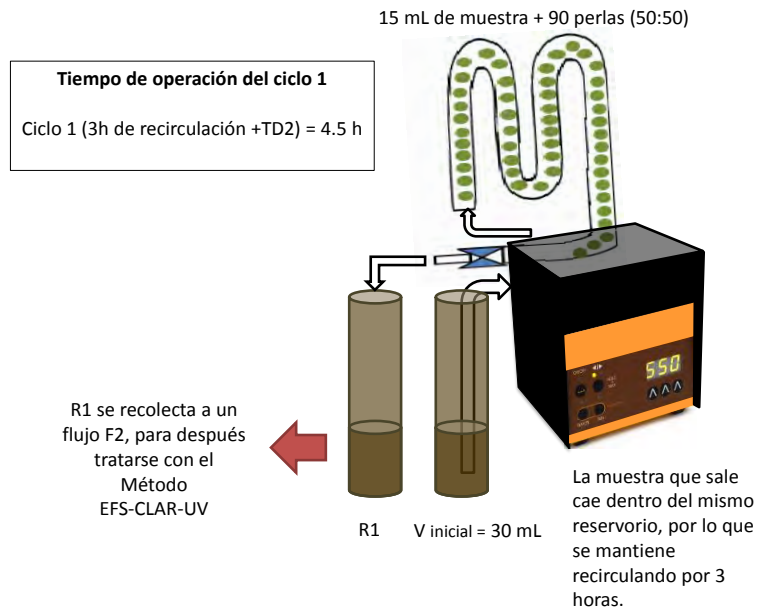
15 mL de muestra + 90 perlas (50:50)



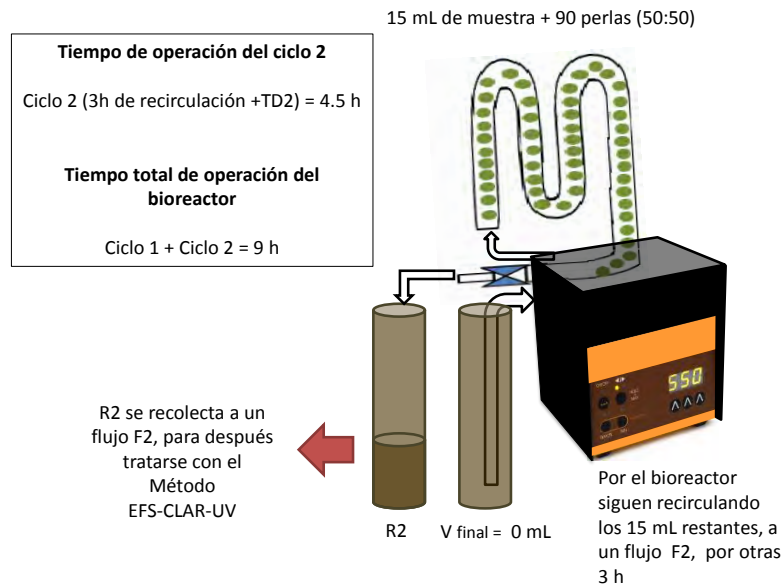
**Figura 2.10** Procedimiento seguido al modificar el tiempo de contacto estático.

Concentración de la muestra = 0.266 mg/L,  
TE2 = 4h, TD3 = 0.5h, F3 = 0.5 mL/min  
R1 = 15 mL en el ciclo 1, R2 = 15 mL en el ciclo 2.

### Ciclo 1



### Ciclo 2



**Figura 2.11** Procedimiento seguido al realizar la recirculación del medio.  
Concentración de la muestra= 0.266 mg/L,  
Tiempo de recirculación = 3 h, TD2= 1.5h, F2=1.5 mL/min  
R1= 15 mL en el ciclo 1, R2= 15 mL en el ciclo 2.

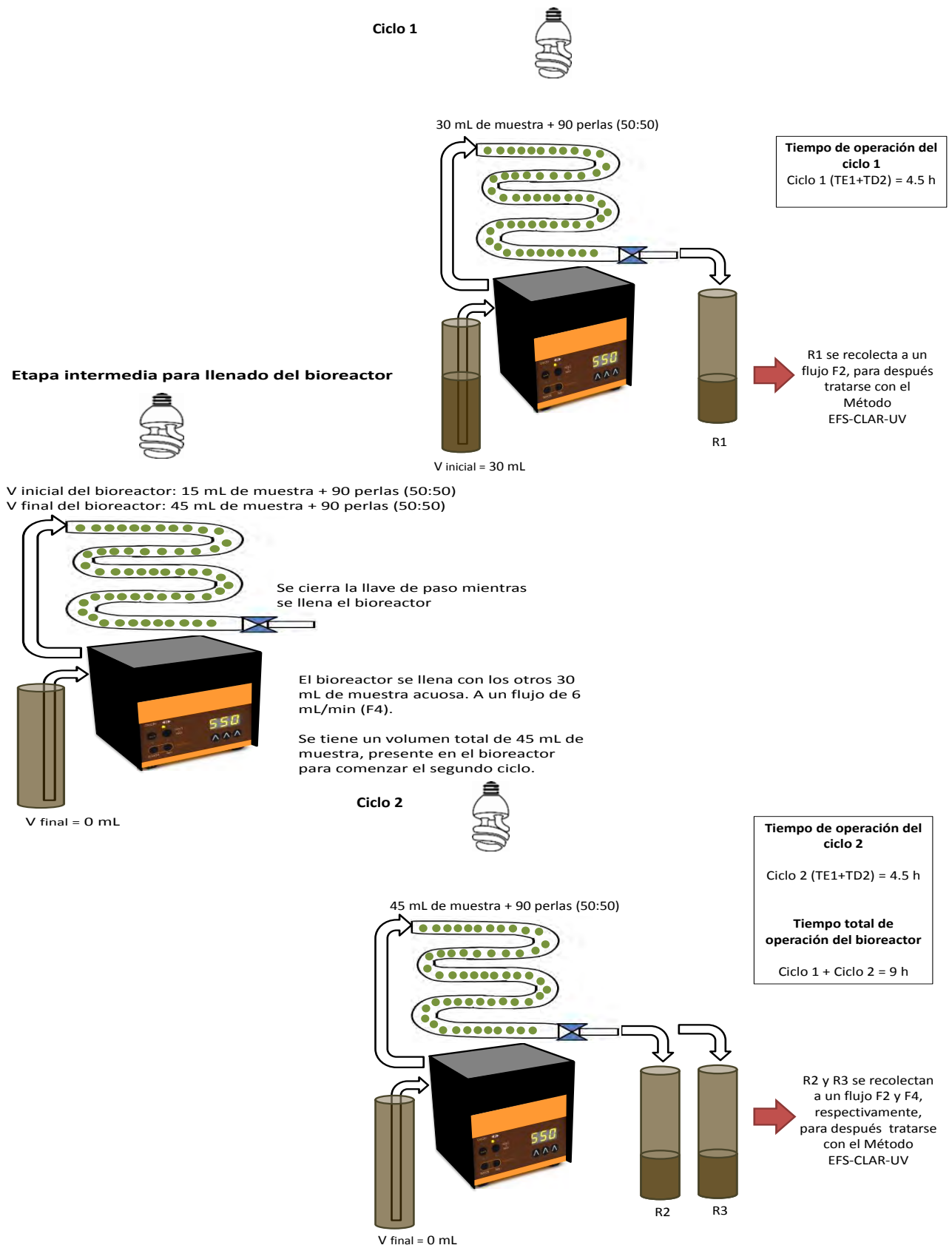
#### **2.2.3.2.4 Cambio de la proporción volumen muestra acuosa-perlas**

Para hacer el cambio de la proporción entre el volumen de la muestra acuosa y las perlas, se mandó hacer un bioreactor que tuviera un volumen de 50 mL en vez de 25 mL. Esta modificación se efectuó para poder aumentar al doble el volumen de la muestra acuosa dentro del reactor (30 mL en vez de 15 mL), que contuviera la misma cantidad de HAPs inicial (4 µg de cada HAP en 30 mL), pero conservando el mismo número de perlas (90) en todo el ensayo. Este cambio se hizo con la intención de observar si había una mejora en la remoción o si se mantenía la eficiencia del % de remoción al doblar el volumen de muestra cuando están en contacto con las perlas en el tiempo estático (TE1), pero conteniendo la misma masa de HAPs que en los ensayos previos con el bioreactor pequeño de 25 mL. Por tanto, estos ensayos fueron realizados con 60 mL totales de agua potable, es decir, el doble de volumen, a una concentración de 0.133 mg/L de BaA y BaP (8 µg totales).

En los ensayos previos, la proporción inicial en volumen que se tuvo de muestra acuosa-perlas fue de 2:1 (v/v) lo que equivale a decir que el volumen de muestra acuosa fue de 15 mL y el volumen de perlas de 7 mL. El cambio que se hizo aquí fue aumentar a una proporción 4:1 (v/v), equivalente a decir que el volumen de medio fue de 30 mL y el volumen de perlas de 7 mL.

Entonces, en el primer ciclo se dejaron de forma estática 30 mL del agua potable con HAPs en contacto 3 horas (TE1) con las perlas. Después se recogió el primer volumen de 15 mL (R1) en un tiempo de 1.5 horas (TD2) a un flujo de 0.16 mL/min (F2). Antes de comenzar el siguiente ciclo se enviaron al bioreactor los 30 mL restantes en el reservorio a un flujo rápido de 6 mL/min (F4). En el segundo ciclo se volvió a dejar el bioreactor en tiempo estático de 3 horas (TE1), en contacto con las perlas, pero ahora con 45 mL de muestra acuosa (30 enviados +15 restantes). De esta manera, la proporción de muestra acuosa-perlas fue de 6:1 (v/v), este cambio equivale a decir que hay un volumen de medio de 45 mL y un volumen de perlas de 7 mL. Pasado ese tiempo en estático se recogieron del bioreactor otros 15 mL (R2) en un tiempo de 1.5 horas (TD2) a un flujo de 0.16 mL/min (F2). Finalmente, en 5 minutos con la bomba marcando un flujo de 6 mL/min (F4), bombeando aire (con la misma bomba), se recolectaron 15 mL (R3) de los 30 mL restantes en el bioreactor (para verificar el % de remoción), los cuales también se llevaron a análisis como la toma R1 y la toma R2. El tiempo total por ciclo fue de 4.5 horas y de operación del bioreactor fue de 9 horas.

Se planeó realizar este ensayo utilizando perlas de alginato sin microalgas (blanco) y con las perlas de alginato-cultivo de microalgas. La descripción gráfica de este ensayo se muestra en la figura 2.12.



**Figura 2.12** Procedimiento seguido al cambiar la proporción de volumen muestra acuosa-perlas.  
 Concentración de la muestra= 0.133 mg/L, TE1= 3 h,  
 TD2= 1.5h, F2= 1.5 mL/min, F4= 6 mL/min  
 R1= 15 mL en el ciclo 1, R2= 15 mL en el ciclo 2, R3= 15 mL del ciclo 2

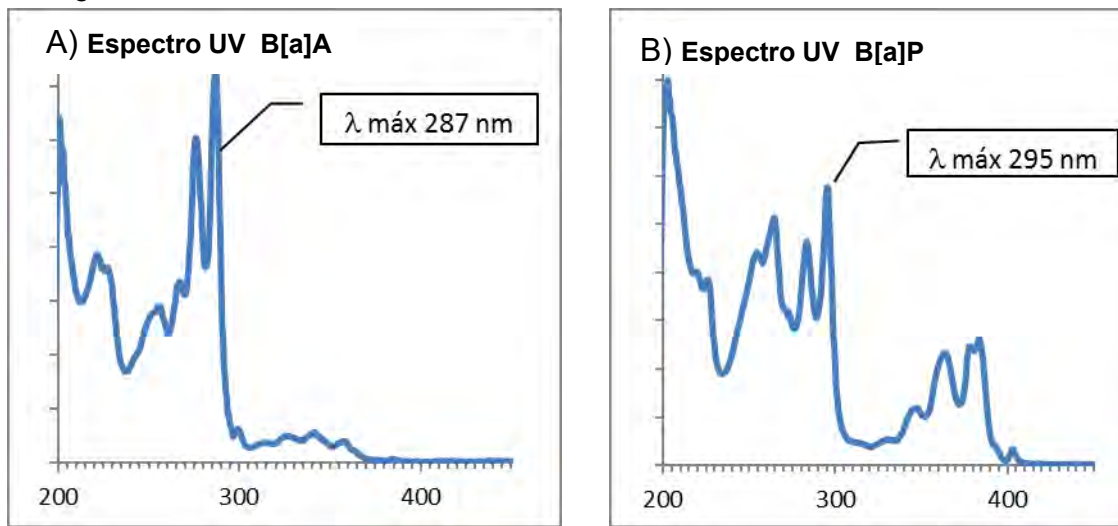
## CAPITULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1 Metodología analítica

#### 3.1.1 Optimización de la separación cromatográfica y detección

##### 3.1.1.1 Selección de la longitud de onda

Los espectros de absorción en la región ultravioleta para los HAP estudiados se muestran en la Figura 3.1

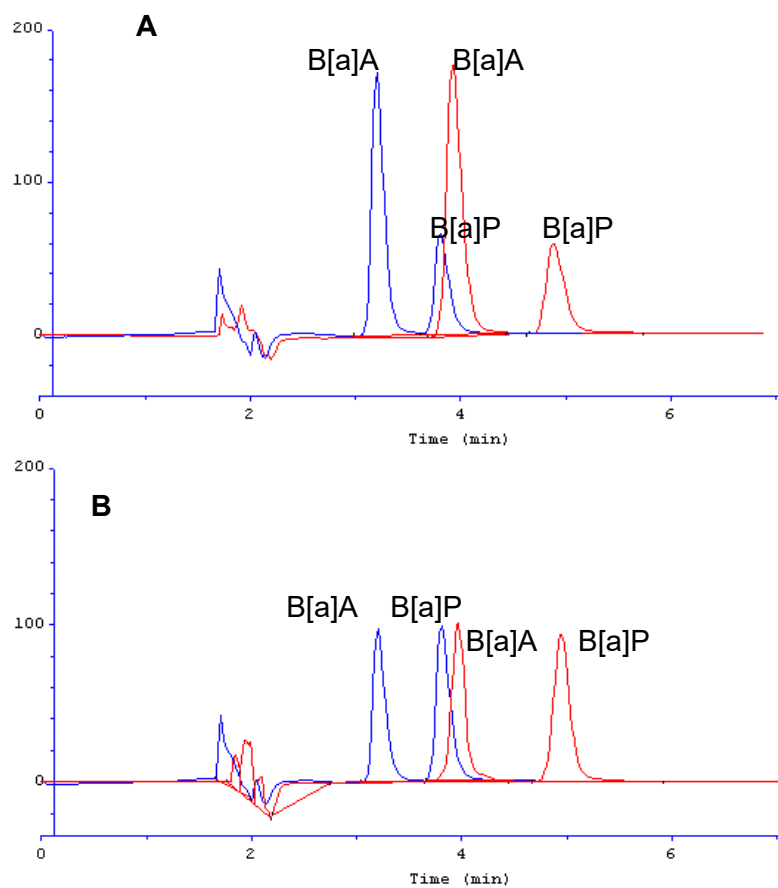


**Figura 3.1** Espectros UV de los HAPs estudiados.  
A) Benzo[a]Antraceno, B) Benzo[a]Pireno.

Para el BaA, se eligió como  $\lambda_{\text{máx}}$  287 nm y para el BaP 263 nm. En el caso del BaP su  $\lambda_{\text{máx}}$  es 295 nm, pero debido a que en trabajos anteriores del grupo de trabajo se ha utilizado la  $\lambda_{\text{máx}}$  de 263 nm, se optó por cuantificar en 263 nm para poder comparar resultados, además que entre estas dos longitudes de onda la respuesta no es muy diferente.

##### 3.1.1.2 Selección de la fase móvil

Como se mencionó en la sección 2.2.1.1.2 (pág. 51), se probaron como fase móvil 100% Metanol y después 95:5 metanol:agua (v/v), a un flujo de la fase móvil de 1 mL/min. El “software” del cromatógrafo permite que al seleccionar 2 longitudes de onda para detectar, por lo que se proporciona simultáneamente dos cromatogramas. En la figura 3.2 se muestran los cromatogramas obtenidos para cada fase móvil y longitudes de onda. Los parámetros cromatográficos se pueden ver en la tabla 3.1.



**Figura 3.2** Cromatogramas obtenidos utilizando diferente fase móvil. 100% Metanol (azul) 95:5 Metanol:Agua (rojo).  
Leídos a A)  $\lambda=263$  nm B)  $\lambda=287$  nm.

**Tabla 3.1** Parámetros cromatográficos

Fase Móvil	tr (min)		Ancho del pico a la base (min)		k'		$\alpha$	N (columna)		Resolución
	BaA	BaP	BaA	BaP	BaA	BaP		BaA	BaP	
100% MeOH	3.21	3.81	0.44	0.45	0.78	1.11	1.42	164	319	1.348
95:5 MeOH:H <sub>2</sub> O	3.92	4.89	0.48	0.45	1.18	1.72	1.46	312	754	2.086

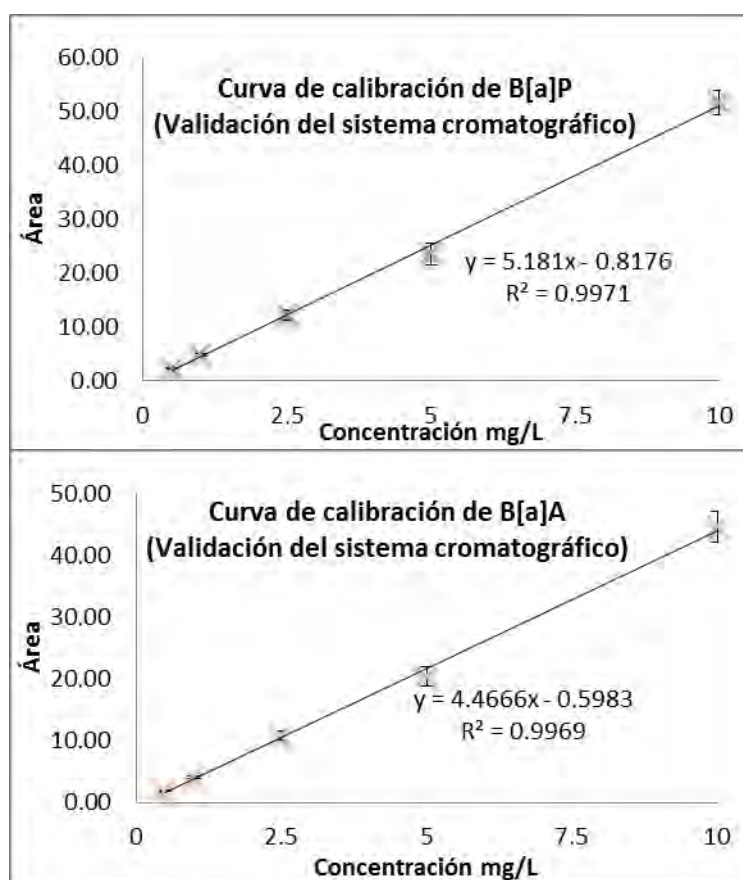
$t_M = 1.8$  min

En ambos casos, la columna mostró tener buena selectividad y eficiencia para los dos HAPs y el cambio de composición en la fase móvil no causó cambios drásticos en el factor de capacidad, selectividad y eficiencia; sin embargo observando los resultados, se optó por una fase móvil 95:5 metanol:agua, porque presenta una mejora en la resolución de los picos, suficiente para realizar integraciones de base a base y con ello asegurar una buena cuantificación. Aunque el tiempo de la corrida aumentó en un minuto, aún sigue siendo un tiempo de análisis corto.

### 3.1.2 Validación del sistema cromatográfico

#### 3.1.2.1 Linealidad

Las curvas para ambos analitos presentan un ajuste lineal con un coeficiente  $r^2 > 0.99$ , por lo que el intervalo de 0.5 a 10 mg/L, valor acorde con el método EPA 8000D “Separaciones cromatográficas determinantes” (Environmental Protection Agency 2014), guía que aborda las generalidades de un análisis por cromatografía, ya sea de Líquidos o gases. La figura 3.3 muestra las curvas de calibración donde se observan las ecuaciones para ambos analitos.



**Figura 3.3** Curvas de calibración de B[a]Ay B[a]P. (Resultado promedio  $\pm$  desviación estándar,  $n=3$ ).

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

Los límites de detección y cuantificación instrumentales para los analitos se pueden ver en la tabla 3.2; se aprecia que son valores pequeños, por lo cual es adecuado su uso en la cuantificación de concentraciones a nivel traza.



### 3.1.2.3 Precisión

La precisión del sistema cromatográfico se aprecia también en la tabla 3.2; los valores de los coeficientes de variación (C.V.) son menores a 9.3 %, mostrando que las mediciones son precisas.

**Tabla 3.2.** Validación del sistema cromatográfico para la determinación de HAPs.

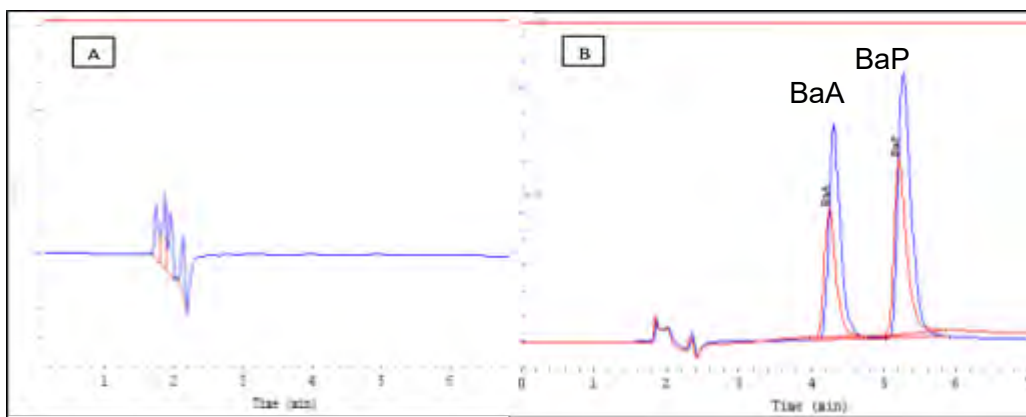
Compuesto	L.D.	L.C.	Coeficiente de correlación $r^2$	%C.V.	
	mg/L			0.5 mg/L	2.5 mg/L
Benzo(a)Antraceno <b>BaA</b>	0.099	0.301	0.9969	9.29	4.42
Benzo(a)Pireno <b>BaP</b>	0.087	0.265	0.9971	8.50	6.95

### 3.1.3 Optimización de la Extracción en Fase sólida (EFS)

Las modificaciones efectuadas para el método por la Extracción en Fase Sólida como se mencionó en el punto 2.2.1.3, de Olmos Espejel (2013) y Bernal Toris (2015), consistieron en cambiar la fase estacionaria CHROMABOND C18-PAH por la fase SUPELCO C18, y el medio acuoso de cultivo Bristol-proteosa/peptona por agua potable. El agua potable utilizada provenía de estar en contacto con las microalgas inmovilizadas en alginato.

Al aplicar el método original, se observó una disminución del recobro cuando se utilizaron sólo 4 mL de acetonitrilo para eluir a los analitos. Se hicieron 12 ensayos y el recobro promedio para BaA fue de 43% ( $\pm 4.2$ ) y para BaP fue de 35% ( $\pm 2.4$ ) por lo que se optó por aumentar a 6 mL el volumen del eluyente; también se aumentó un paso más en el protocolo de extracción, que consistió en evaporar el extracto a sequedad para reconstituirlo en 1 mL de acetonitrilo y así disminuir los límites de detección del método al tener un factor de concentración de 15.

La figura 3.4 muestra los cromatogramas de los extractos obtenidos al aplicar el método optimizado, se muestra de manera ilustrativa solo el cromatograma obtenido a  $\lambda=263$  nm. Para verificar que no había interferencias en los tiempos de retención de los analitos, se preparó un blanco de reactivos siguiendo el método descrito en 2.2.1.3 sólo que sin adicionar HAPs. Como se puede observar en la figura 3.4B los picos de los cromatogramas siguen mostrando picos simétricos, con buena resolución y el 3A que representa al blanco se presenta sin interferencias.



**Figura 3.4** Cromatogramas obtenidos de los extractos utilizando el método de EFS  
 (A) Cromatograma del blanco  
 (B) Comparación de la disolución estándar (azul)  
 vs extracto de muestra fortificada a 4 mg/L (rojo).

### 3.1.4 Validación del método de EFS- CLAR-UV

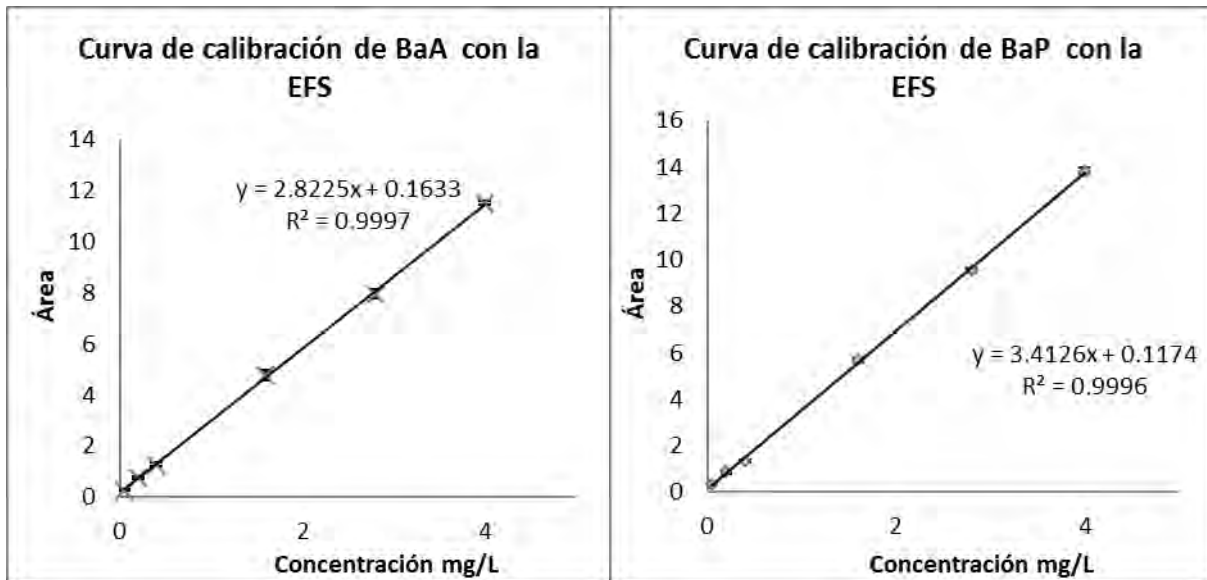
#### 3.1.4.1 Linealidad

Se graficó concentración vs área del pico, para ambos HAPs. Evaluando igualmente, con el criterio de la guía EPA 8000D, si los coeficientes  $r^2$  son mayores a 0.99 se considera lineal. En la figura 3.5 se muestran ambas gráficas así como la  $r^2$  en donde para cada compuesto se cumple este criterio, por lo tanto se estima que es un método lineal en ese intervalo de trabajo.

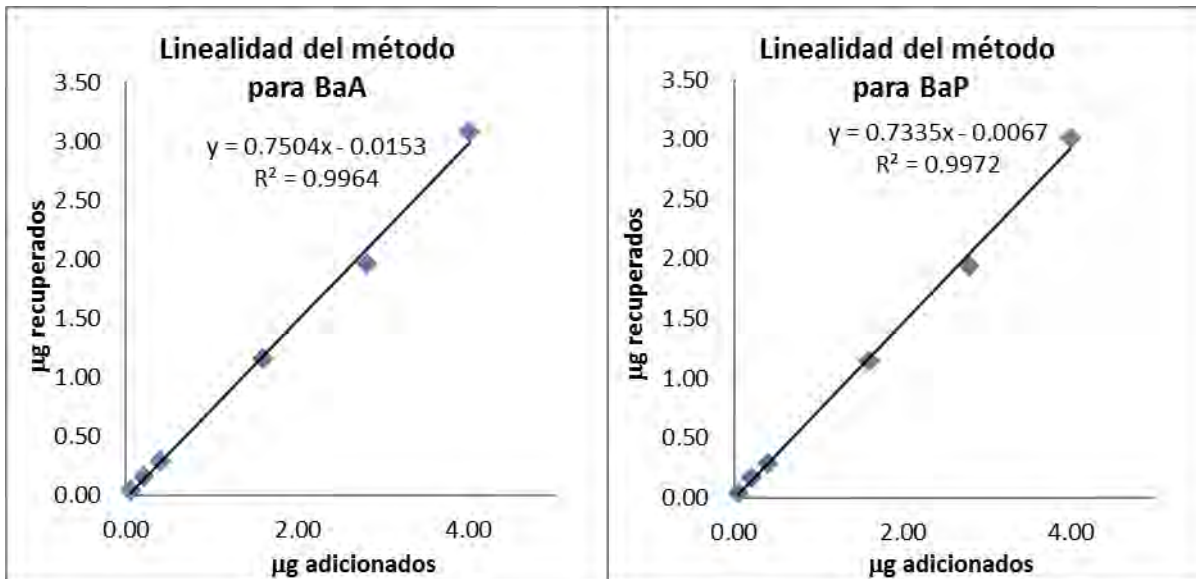
También se determinaron los  $\mu\text{g}$  agregados con la ecuación 2.8 (p. 54) y los  $\mu\text{g}$  recuperados se determinaron con la ecuación 2.9 (p.54). Al graficar los  $\mu\text{g}$  agregados vs  $\mu\text{g}$  recuperados, para cada compuesto (figura 3.6), se obtuvo la curva de linealidad del método dentro del intervalo de concentraciones utilizado donde el recobro promedio del método está representado por la pendiente.

La recuperación o recobro promedio del método, dentro del intervalo de concentraciones utilizado fue para el B[a]A de 75% ( $\pm 7.2$ ) y del 73% ( $\pm 6.6$ ) para B[a]P.

De acuerdo con la guía EPA 8000D, sugiere que los % de recuperación cuando se está desarrollando un método pueden fijarse entre un 70-130%, los % de recuperación obtenidos por el grupo de trabajo son: de un 74-80% para el BaA y de 70-75% para el BaP, acordes con lo recomendado por la EPA, además de demostrar reproducibilidad con respecto a los trabajos anteriores. El coeficiente de determinación lineal fue óptimo con valores mayores a 0.99.



**Figura 3.5** Curvas de calibración de B[a]A y B[a]P para el método EFS-CLAR-UV. (Resultado promedio  $\pm$  desviación estándar,  $n=3$ ).



**Figura 3.6** Linealidad del método de EFS-CLAR-UV, cuya pendiente representa el recobro global.

### 3.1.4.2 Límites de detección (L.D.) y cuantificación (L.C.) del método

Los límites del método se determinaron con base en la curva de calibración preparada como se describió en la sección 2.2.1.4.2. Se inyectaron los extractos y con las áreas resultantes se calcularon los límites utilizando la desviación estándar de la regresión y las ecuaciones 2.5 y 2.6 (pág 52). Al concentrar el extracto de 6 a 1 mL, los límites de detección y cuantificación disminuyeron. La tabla 3.3 muestra los límites de detección y cuantificación obtenidos.

### 3.1.4.3 Precisión

De igual forma, las muestras preparadas a dos concentraciones diferentes, con tres repeticiones cada una, muestran coeficientes de variación menores a 10%, lo cual indica que es un método preciso y está de acuerdo al criterio de control de calidad del método EPA 8000 D. La tabla 3.3 muestra el coeficiente de variación para cada HAP.

**Tabla 3.3.** Validación del método de EFS-CLAR-UV para la determinación de HAPs.

Compuesto	L.D.	L.C.	Coeficiente de correlación $r^2$	%C.V.	
	mg/L			0.027 mg/L	0.266 mg/L
Benzo(a)Antraceno BaA	0.0086	0.0260	0.9999	7.80	8.50
Benzo(a)Pireno BaP	0.0090	0.0274	0.9997	7.32	8.90

## 3.2. Manejo de microalgas

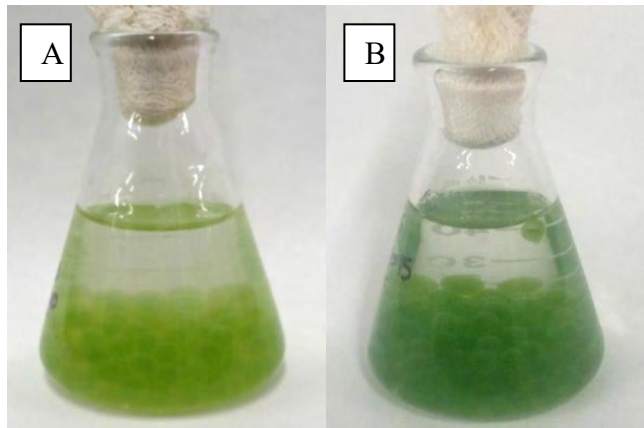
### 3.2.1 Cultivo de microalgas

Como se describió en la experimentación, el cultivo de microalgas fue llevado a cabo en un área exclusiva y la absorbancia era monitoreada semanalmente. Se observó que la microalga *S. acutus* alcanza la absorbancia de uno en aproximadamente 14 días, mientras que la *S. capricornutum* alcanza este valor de absorbancia en 20 días.

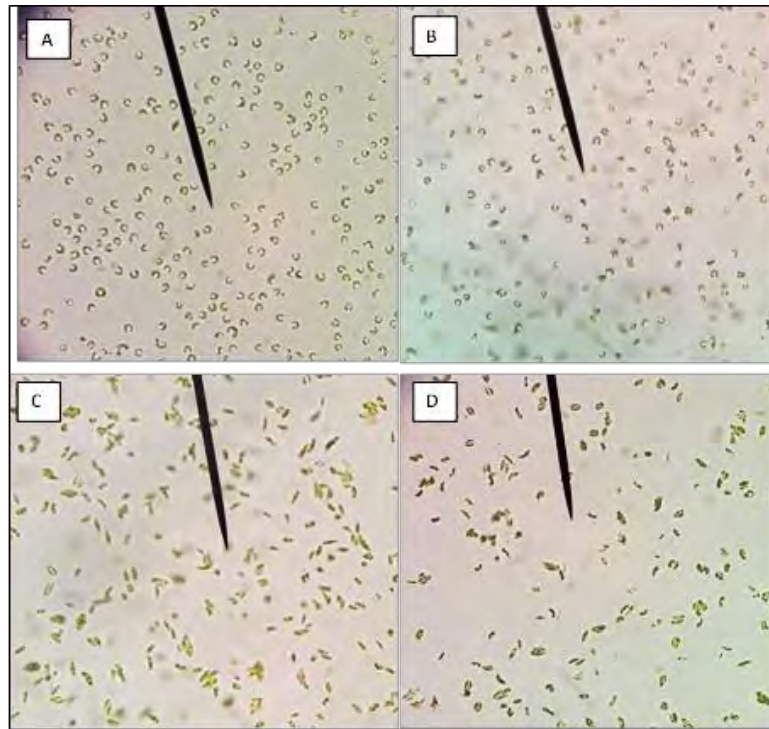
### 3.2.2 Inmovilización de microalgas en las cuentas de alginato y supervivencia

Una vez que se tuvieron inmovilizadas las microalgas en perlas, cada especie por separado, se procedió a verificar su supervivencia. Para ello se dejaron durante un mes las perlas sumergidas en agua potable. Pasado ese mes se observó un cambio (aumento) en la intensidad del color verde en las perlas como se puede ver en la figura 3.7. El cambio en la coloración muestra que las microalgas siguen reproduciéndose. Las perlas de la *S. acutus* mostraron un color verde más oscuro que la *S. capricornutum*. De esta manera cualitativa se observó que las microalgas son capaces de sobrevivir y reproducirse en un material como el alginato de calcio durante el tiempo estudiado.

Después se procedió a liberar las algas utilizando una disolución de citrato de sodio. Una vez libres se observaron al microscopio y se comparó la apariencia (forma y color) con un cultivo fresco de medio líquido. No se observaron cambios drásticos ni en color y forma (ver figura 3.8).



**Figura 3.7** Comparación del crecimiento de *S. acutus* durante un mes.  
 A) Microalgas en el primer día de inmovilización.  
 B) Microalgas un mes después de la inmovilización.

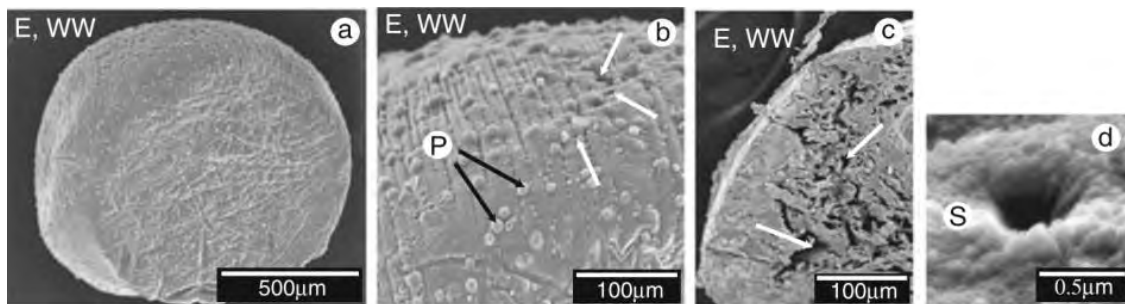


**Figura 3.8** Comparación de microalgas antes y después de ser inmovilizadas y liberadas del alginato un mes después. *S. capricornutum* en (A) antes y (B) después. *S. acutus* en (C) antes y (D) después. Imagen tomada del microscopio a 40X.

De acuerdo con las observaciones de Ruiz-Marin et al. (2013), la *S. obliquus* (otro nombre que recibe la microalga *S. acutus*) inmovilizada en alginato de calcio registra un crecimiento inmediato después que se forman las esferas. Covarrubias et al. (2012) sugieren que las microalgas se adaptan rápidamente a la inmovilización, además que también reportaron el aumento del número de microorganismos en *Chlorella sorokiniana*

después de haber sido inmovilizada en perlas de alginato. En el presente trabajo, se podría suponer un comportamiento similar para ambas microalgas verdes, *S. capricornutum* y *S. acutus*, debido a que igualmente se observa una mayor intensidad del color en las perlas pasado un mes.

Covarrubias et al. (2012) hicieron la caracterización de las perlas de alginato, utilizando microscopía electrónica de barrido y en la figura 3.9 se muestran las microfotografías obtenidas, mostrando la estructura interna de una perla de alginato; en las micrografías se observan poros, los cuales permiten el intercambio de sustancias con el medio.



**Figura 3.9** a) Microfotografía por microscopía electrónica de barrido de la superficie de una perla de alginato (que contiene inmovilizada conjuntamente a *Chlorella sorokiniana* y *Azospirillum brasilense*) después de la incubación durante 48 h en agua residual regular. b) Ampliación de la perla, las flechas negras indican protuberancias y las flechas blancas indica poros. c) Corte de la perla, las flechas muestran las cavidades internas típicas de perlas de alginato. d) Típica cavidad de poro de la superficie de las perlas (Covarrubias et al. 2012).

### 3.2.3 Bioensayos de exposición

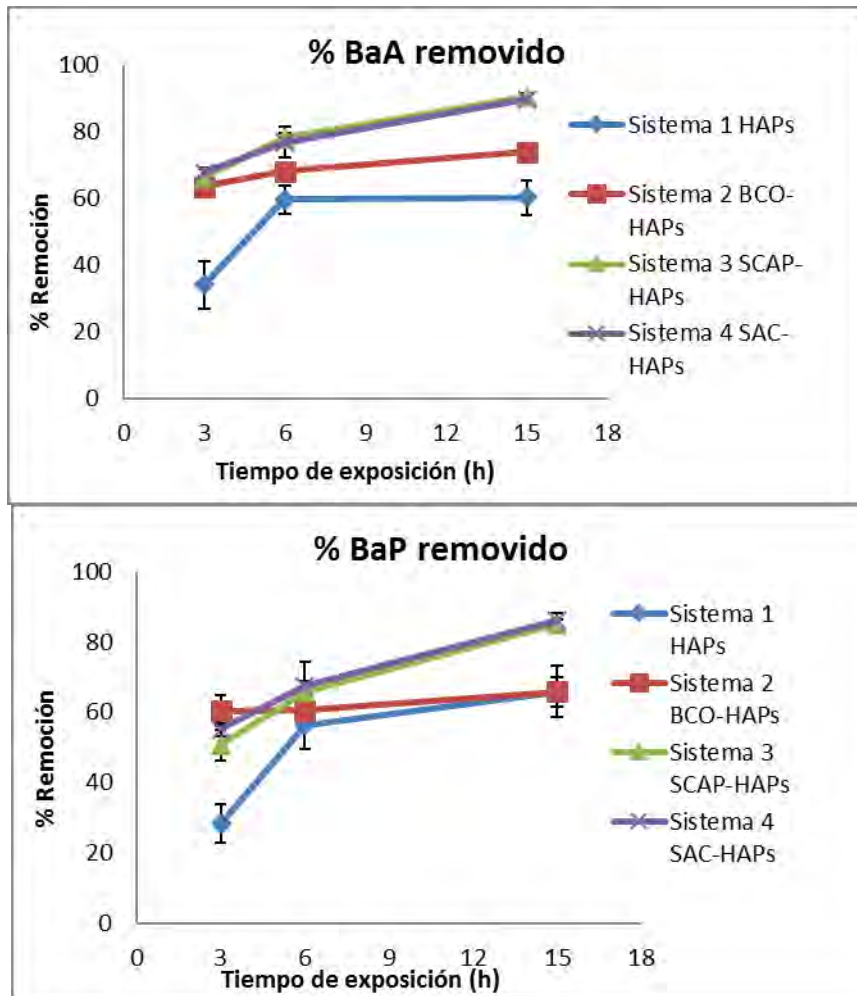
#### 3.2.3.1 Evaluación de la remoción en diferentes tiempos

En la figura 3.10 se muestra el agitador orbital donde fueron llevados a cabo los ensayos a los diferentes tiempos. Los resultados de estos ensayos se muestran en las gráficas de la figura 3.11 y en la tabla 3.4 se muestran la cantidad de HAP remanente y los % de remoción a los diferentes tiempos de exposición con los sistemas estudiados. En éstas se observa que para el sistema 1 (HAP) primero se da una disminución de la cantidad remanente y después de las 6 h de exposición, el HAP remanente parece permanecer constante; lo anterior parece representar la remoción por fotooxidación de los HAP. Para el sistema 2 (BCO+HAPs), se da una disminución mayor de los HAP remanentes y por lo tanto un aumento en el % de remoción, esto parece indicar que en el medio con el alginato se remueven lentamente los contaminantes, llegando a las 15 h al 74% y el 65%

del BaA y el BaP respectivamente, la cual varía más lentamente para BaP. Al hacer un ANOVA al 95% de confianza para ver si eran significativamente diferentes los porcentajes encontrados para ambos HAPs en los diferentes tiempos, se encontró que no era significativo. Curiosamente, lo mismo sucede al comparar el % de remoción de ambos HAPs a las tres horas de incubación en los sistemas con las dos especies de microalgas inmovilizadas: sistema 3 (SCAP-HAPs) y sistema 4 (SAC-HAPs). Entonces, como no hay diferencia significativa entre las perlas de alginato solas (sistema 2), perlas de alginato-*S. capricornutum* (sistema 3) y perlas de alginato-*S. acutus* (sistema 4), se deduce que durante las primeras tres horas solo se da remoción abiótica (por adsorción al alginato, además de la fotodegradación). Sin embargo, en los tiempos mayores, si se nota una diferencia entre las cantidades residuales de los ensayos control sin microalgas (sistemas 1 y 2) y los bioensayos con las microalgas en las perlas (sistemas 3 y 4), además se ve que la tendencia de los HAPs después de las 3 h de exposición, es ir desapareciendo del medio en función del tiempo, por lo tanto si hay un efecto debido a las algas (bioremovión). Así, en 6 horas, se ha removido cerca del 78%, para el BaA y cerca del 66% para BaP. El ANOVA, con una confianza del 95%, mostró que eran significativamente diferentes los sistemas 3 y 4 del sistema 2 (control) en el caso del BaA; sin embargo para el BaP no mostró haber diferencia significativa entre los sistemas 2, 3, y 4 a las 6 h. Se hizo un ANOVA al 95% de confianza, para verificar si había diferencia significativa en la remoción del BaP a las 15 h de exposición, entre el sistema 2 y los sistemas 3 y 4, resultando ser significativamente diferentes. La diferencia puede deberse a que siendo un compuesto más pesado y más apolar que el otro (BaA), debe presentar mayor adsorción al alginato y migrar más lentamente hacia el interior de las perlas para encontrarse con las microalgas y por lo tanto la remoción se da de manera más lenta. En la tabla 3.4 se resaltan con negritas los datos donde el % de remoción es el mayor de todos los sistemas, comparados entre sí, que corresponde a los sistemas de las microalgas.



**Figura 3.10** Agitador orbital con controlador de temperatura.



**Figura 3.11** Porcentajes de remoción de los ensayos de exposición de los diferentes sistemas a distintos tiempos (Resultado promedio  $\pm$  desviación estándar,  $n=3$ ).



**Tabla 3.4** Porcentaje de HAP removido a los diferentes tiempos de exposición.

Sistema	Tiempo (h)	$\mu\text{g}$ recuperados de BaA	% BaA removido	$\pm$ desv. estándar	$\mu\text{g}$ recuperados de BaP	% BaP removido	$\pm$ desv. estándar
1) HAPs	3	2.6	34	7.1	2.9	28	5.6
	6	1.6	60	4.3	1.8	56	7.0
	15	1.6	60	5.2	1.4	66	7.30
2) BCO +HAPs	3	1.5	64	2.8	1.6	60	4.2
	6	1.3	68	0.9	1.6	60	0.9
	15	1.0	74	1.8	1.3	66	4.2
3) SCAP +HAPs	3	1.4	66	2.9	2.0	51	4.5
	6	<b>0.9</b>	<b>78</b>	<b>1.4</b>	<b>1.4</b>	<b>66</b>	<b>3.1</b>
	15	<b>0.4</b>	<b>91</b>	<b>0.9</b>	<b>0.6</b>	<b>85</b>	<b>1.2</b>
4) SAC +HAPs	3	1.3	68	1.2	1.8	55	1.9
	6	<b>0.9</b>	<b>77</b>	<b>4.6</b>	<b>1.3</b>	<b>68</b>	<b>6.8</b>
	15	<b>0.4</b>	<b>90</b>	<b>1.4</b>	<b>0.6</b>	<b>86</b>	<b>2.0</b>

En negritas se señala el % de remoción mayor de todos los bioensayos

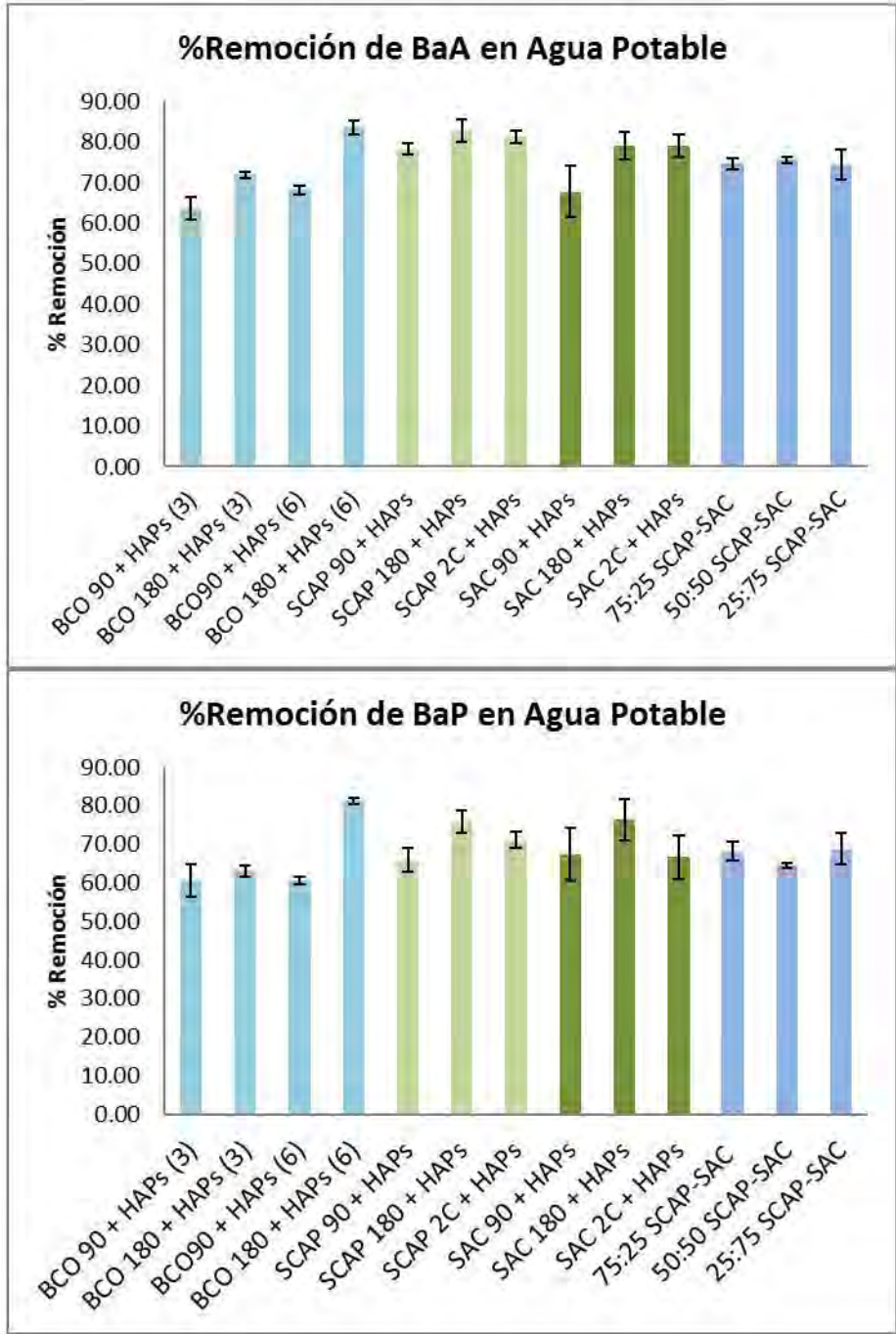
Se eligió el tiempo de 6 horas porque se observó una remoción de los HAPs cercana o mayor al 70% y también porque resultaba ser un tiempo más práctico para realizar los bioensayos con variación en las características biológicas de la perla. De todas formas se planeó mejorar la remoción del BaP a este tiempo, aumentando la cantidad de células y encontrando una mezcla óptima de las proporciones de las dos especies de microalgas. Estos resultados fueron la base para buscar la optimización de operación cuando las perlas fueran utilizadas como empaque en el bioreactor.

### 3.2.3.2 Evaluación de la remoción variando las características biológicas en la perla

Como se observó en la figura 3.11 de los ensayos anteriores, entre las dos especies de microalgas no hay diferencia significativa en la remoción de los HAPs, por lo cual se procedió a aumentar el número de microalgas por perla de alginato, con la finalidad de aumentar el % de remoción. Se tuvo en los experimentos anteriores un número similar aproximado de  $1.5 \times 10^6$  células/perla para *S. capricornutum* y  $1.3 \times 10^6$  células por perla para *S. acutus*.

La tabla 3.5 muestra los resultados obtenidos de los bioensayos planteados en la tabla 2.3 (pág. 64), se muestra el porcentaje de remoción y las cantidades remanentes de cada HAP, de acuerdo a todas las variaciones hechas, incluyendo los resultados de los ensayos de los blancos (3 y 6 horas).

Se resaltó con negritas en la tabla 3.5 la menor cantidad de HAPs encontrados en el medio, que es el correspondiente a las perlas con el doble de concentración de microalgas (1.5 - 1.3x10<sup>6</sup> microalgas/perla, *S. capricornutum*/*S. acutus* respectivamente).



**Figura 3.12** Comparación del BaA y BaP removidos del medio, con las modificaciones propuestas (Resultado promedio ± desviación estándar, n=3).

**Tabla 3.5** Porcentaje de HAP removido variando las características de las perlas.

Bioensayo (E)	Sistema	µg recuperados de BaA	% BaA removido	± desv. estándar	µg recuperados de BaP	% BaP removido	± desv. estándar
1	BCO 90 + HAPs (3h)	1.5	64	2.9	1.6	61	4.2
2	BCO 180 + HAPs (3h)	1.1	72	0.8	1.5	63	1.5
3	BCO 90 + HAPs (6h)	1.3	68	0.9	1.6	61	0.9
4	BCO 180 + HAPs (6h)	0.7	84	1.7	0.8	81	0.9
5	SCAP 90 + HAPs	0.9	78	1.4	1.4	66	3.1
6	SCAP 180 + HAPs	0.7	83	2.9	1.0	76	2.8
7	SCAP 2C + HAPs	<b>0.8</b>	<b>81</b>	1.5	<b>1.2</b>	<b>71</b>	2.1
8	SAC 90 + HAPs	1.4	68	6.4	1.4	68	6.8
9	SAC 180 + HAPs	0.9	79	3.5	1.0	76	5.4
10	SAC 2C + HAPs	<b>0.8</b>	<b>79</b>	2.7	<b>1.3</b>	<b>67</b>	5.7
11	75:25 SCAP-SAC	1.0	75	1.3	1.2	68	2.4
12	50:50 SCAP-SAC	1.0	76	0.7	1.4	64	0.7
13	25:75 SCAP-SAC	1.1	75	3.7	1.3	69	4.2

En negritas se señala la menor cantidad HAPs encontrados en el medio

Observando las gráficas de la figura 3.12 y los resultados de la tabla 3.5, se puede deducir que:

- Comparando la remoción en los blancos constituidos con 90 y 180 cuentas solas, se observa que la superficie de las perlas de alginato y el tiempo de contacto, puede influir en la captación del HAP del medio, no así en la biodegradación (E 1-4). La evaluación de biodegradación no se desarrolló aquí porque no se determinó a los contaminantes en la biomasa ni los metabolitos formados, pero se ha verificado la formación de metabolitos del tipo dihidrodiol para ambas microalgas libres (Lindquist & Warshawsky 1985; García de Llasera et al. 2016)
- La remoción del BaA es significativamente diferente del blanco con *S. capricornutum* utilizando 90 perlas con el número de células original (E 3 y 5), pero no con *S. acutus* (E 8).
- No hay diferencia significativa en la remoción del BaP comparando el blanco y los tratamientos utilizando 90 perlas con ambas microalgas en número de células original por separado (E 3 vs E 5 y 8).
- Al utilizar el doble de células por perla si hay diferencia significativa en la remoción de BaA y BaP entre las cuentas con ambas microalgas por separado y el blanco (E 3 vs E 7 y 10).
- Sí hay una diferencia significativa en la remoción entre el BaA y BaP con la microalga *S. capricornutum* utilizando tanto 90 y 180 perlas (E 5 y 6); así como también variando el número de células por perla (E 5 y 7). Sin embargo con 180 perlas no hay diferencia

significativa con el blanco (E 4 y 6), suponiéndose que la remoción por la adsorción de los compuestos a las perlas es predominante a la remoción por la microalgas

- En cuanto a la remoción de los HAPs con las microalgas inmovilizadas en diferentes proporciones de las dos especies manejadas, no hay diferencia significativa en la remoción de ambos HAPs, al comparar los resultados de las 3 combinaciones (E 11-13).

Con los resultados anteriores, se puede apreciar que el número de microalgas por cuenta si importa en la remoción del HAP; en el caso de la mezcla 75:25 SCAP-SAC, los  $\mu\text{g}$  de BaP recuperados son menores que los recuperados con SAC 2C, pero no para los  $\mu\text{g}$  de BaA, por lo que se decidió utilizar las perlas en las que la remoción de ambos HAPs fuera la mayor posible. Además para no depender de un tipo de alga, realizar mezclas de perlas se vio que no se afectó el % Remoción.

La finalidad de hacer estas pruebas fue para hacer una propuesta del empaque de un bioreactor pensando en una futura aplicación práctica de estos sistemas. Se observó que el tiempo de contacto del medio con las perlas y el número de microalgas por perla, bajo esas condiciones de luz y agitación, son factores que influyen en la remoción de los HAPs.

Por tanto para probar los bioreactores, se decidió utilizar una mezcla de 90 perlas (relación 50:50, con una concentración  $1.5 - 1.3 \times 10^6$  microalgas/perla, *S. capricornutum*/*S. acutus*, respectivamente) como empaque en el bioreactor, condiciones donde se observaron las mayores diferencias con los controles.

### **3.2.4 HAPs en la biomasa**

De acuerdo a lo reportado con García de Llasera et al. (2016), en los ensayos con microalgas libres, la mayor cantidad de metabolitos formados que son liberados en el medio líquido ocurre después de 6 horas de exposición, para *S. capricornutum*; sin embargo para *S. acutus* la mayor cantidad de metabolitos formados liberados al medio líquido ocurre después entre las 6-15 horas de exposición. Los  $\mu\text{g}$  presentes en la biomasa, en medio líquido, el % de degradación y el % de remoción medidos de cuatro ensayos en algas que habían sido inmovilizadas (dos para cada especie de microalgas, con agitación orbital y 6 horas de exposición) se muestran en la tabla 3.6. En la tabla se aprecia que la cantidad de HAPs tanto en el medio líquido como en la biomasa, para la *S. capricornutum* es menor que para *S. acutus*, este comportamiento coincide con el de las microalgas libres.

Al observar que este comportamiento se repite podemos inferir que la remoción de los HAPs con microalgas inmovilizadas sucede mayormente por degradación, similar a las microalgas libres y que la biodegradación ocurre más rápido con *S. capricornutum*.

**Tabla 3.6** Cantidades de HAPs, encontradas en medio acuoso y biomasa (resultado promedio, n=2).

Microalga	µg recuperados de BaA		µg recuperados de BaP		% Degradación		% Remoción	
	Medio líquido	Biomasa	Medio líquido	Biomasa	BaA	BaP	BaA	BaP
<i>S. capricornutum</i>	0.82	0.14	1.20	0.08	76	68	80	70
<i>S. acutus</i>	0.96	0.26	1.39	0.13	70	62	76	65

### 3.2.5 Comparación de la remoción entre microalgas inmovilizadas y microalgas libres

Se hizo la comparación de la remoción con respecto a ensayos realizados con microalgas libres. Estos ensayos se realizaron en 15 mL de medio de cultivos con cada especie por separado. De acuerdo a los resultados reportados por Díaz Flores (2013), la remoción de la mezcla de BaA-BaP (concentración de 0.266 mg/L cada uno, 6 h de exposición), mostraron que de los ensayos con la microalga *S. capricornutum* removió aproximadamente el 75 y 80% de BaA y BaP, respectivamente, estas cantidades son menores que las que se recuperaron de las microalgas liberadas de la matriz alginato (ver tabla 3.6); Montañó Montiel (2013) reportó para la microalga *S. acutus* que la remoción de una mezcla BaA-BaP (concentración de 0.266 mg/L cada uno, 6 h de exposición) fue cercana al 50% para ambos HAPs, remoción menor que la reportada para las microalgas inmovilizadas (ver tabla 3.6).

De acuerdo a los resultados anteriores, se aprecia que hay una influencia por parte del alginato sobre la remoción, para el caso de la *S. capricornutum* la remoción para el BaA no varía demasiado pero si para el BaP, donde disminuye el % de remoción. Para el caso de la *S. acutus*, la remoción se ve favorecida por la inmovilización, aumentando la remoción para ambos HAPs. El uso de las microalgas inmovilizadas, puede representar una ventaja en la remoción por que se favorece la remoción del BaA y la del BaP no disminuye en gran medida.

### 3.3 Bioreactores

#### 3.3.1 Diseño y evaluación de los diseños

Como se mencionó anteriormente el diseño de cada bioreactor fue pensado para contener 15 mL de medio y las 90 perlas (que ocupan un volumen aproximado de 7 mL), para un volumen total de 22 mL, contenidos en bioreactores de 25 mL.

Pensando en que se quería adaptar a un reactor que operara en forma semicontinua todos los diseños se hicieron con una entrada y una salida. Los tubos de vidrio con los que se hicieron los bioreactores fueron de diámetros pequeños para que tuvieran una mayor longitud y hubiera un mayor tiempo de contacto entre las perlas y el medio.

Las dimensiones del tubo utilizado en los reactores fueron: diámetro interno de 1 cm y longitud de 32 cm. A cada tubo se le dio tres formas diferentes 1) como tubo recto 2) forma de "S" 3) forma de espiral. En las figuras 3.13, 3.14 y 3.15 se pueden ver, respectivamente, cada diseño.



**Figura 3.13** Reactor de tubo recto.



**Figura 3.14** Reactor en espiral.



**Figura 3.15** Reactor de "S".

Cada diseño, fue probado en 2 ciclos de 6 horas, con un tiempo total de operación de 12 horas. En la tabla 3.7 se muestran los parámetros evaluados en cuanto a la operación de cada reactor.

Al observar los resultados, el reactor en forma de S es el que presentó ventajas como menor área ocupada, la facilidad de alimentación del medio líquido (las perlas no se movían), facilidad en el empacado y desempacado de las perlas, así como en una mejor distribución de las perlas.

Los reactores de tubo recto y en espiral fueron difíciles de mantener en una posición fija, debido a que cuando se accionaba la bomba, el ligero movimiento del cabezal de la bomba hacía que se movieran un poco de su lugar y eso provocaba que se movieran las perlas; en el caso del reactor de tubo recto si se movían las perlas tendían a juntarse en un extremo del tubo y por lo tanto ya no quedaban distribuidas a lo largo del tubo.

**Tabla 3.7** Parámetros para la evaluación de los reactores propuestos.

Parámetros evaluados	Diseño del bioreactor		
	Recto	S	Espiral
Área ocupada por el sistema	400 cm <sup>2</sup>	250 cm <sup>2</sup>	250 cm <sup>2</sup>
Estabilidad (movimiento del reactor)	poca	muy estable	poca
Alimentación del medio	fácil	fácil	difícil
Empacado / desempacado	fácil	fácil	difícil
Distribución empaque	buena	buena	mala
Otras observaciones	---	---	difícil recuperación del volumen final

Para el reactor en espiral no se logró la distribución uniforme de las perlas a lo largo de todo el tubo, porque la curvatura de cada espiral hacía que las perlas se fueran al fondo. Al momento de recuperar los últimos mililitros la presión de la bomba no era suficiente para empujar el medio contenido en el fondo de la espiral.

En la tabla 3.8 se muestra de manera comparativa los  $\mu\text{g}$  recuperados, después de cada ciclo, para cada bioreactor. Se observa que se tuvieron recuperaciones similares, pero el reactor en S, muestra una mayor remoción del BaP. Además para los 3 reactores se observa que en el segundo ciclo hay una mayor remoción; esto puede deberse a que las perlas-microalgas ya se adaptaron al ambiente del bioreactor (medio acuoso, iluminación, temperatura) y en el segundo ciclo ya remueven un poco más.

Por los resultados obtenidos en el porcentaje de remoción y las ventajas operativas mostradas en la tabla 3.6, se decidió trabajar con el reactor en forma de S para las pruebas posteriores de la optimización de los parámetros de operación. En esta

evaluación no se hicieron ciclos con perlas de alginato sin microalgas (blanco), solo se enfocaron a detectar la mayor remoción y el enfoque práctico.

**Tabla 3.8** Comparación del % de remoción de los HAPs, utilizando diferentes bioreactores.

Sistema	Ciclo	$\mu\text{g}$ recuperados de BaA	% BaA removido	$\mu\text{g}$ recuperados de BaP	% BaP removido
Reactor tubo recto	1	1.2	71	1.5	62
	2	0.7	84	1.0	76
Reactor forma S	1	1.2	69	1.3	66
	2	0.7	83	0.7	83
Reactor espiral	1	1.3	68	1.4	66
	2	1.1	73	1.1	72

### 3.3.2 Optimización de los parámetros de operación

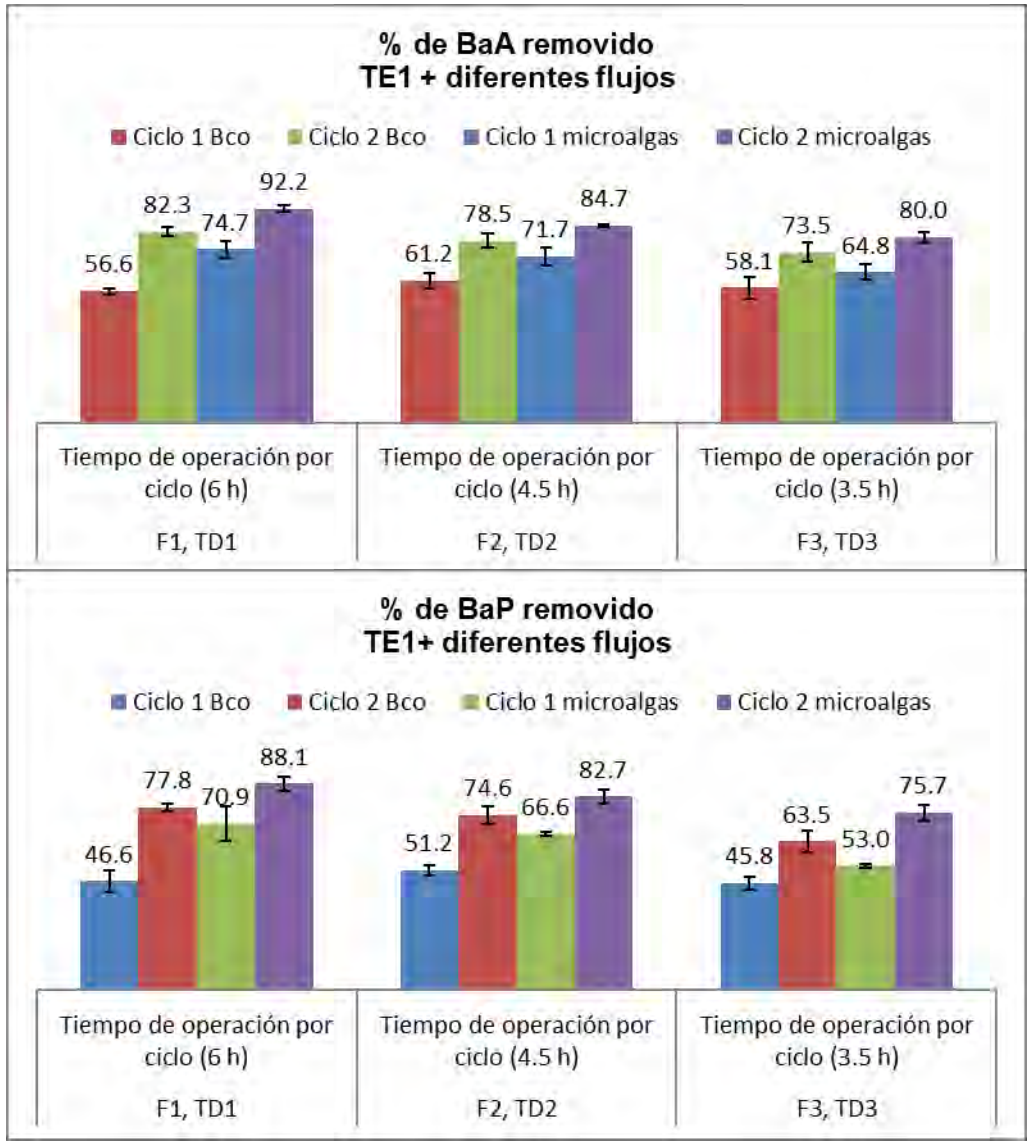
El diseño del bioreactor elegido como óptimo fue el reactor en forma de S. Se hicieron variaciones en la velocidad del flujo, tiempo de contacto estático entre la muestra acuosa-perlas, recirculación del medio y el cambio de la proporción volumen muestra acuosa-perlas. Con estas pruebas se observó la eficiencia de la remoción y a continuación se describen y discuten los resultados.

#### 3.3.2.1 Modificación del flujo

Las gráficas de la figura 3.16 muestran la tendencia que a menor flujo mayor remoción de ambos HAPs dado que el tiempo de contacto aumenta. Esta tendencia se verificó al someter a las mismas condiciones perlas de alginato solo. Sin embargo, las perlas de alginato sin microalgas no removieron los HAPs en la misma proporción que lo hicieron las perlas con microalgas. La prueba estadística demuestra que si hay diferencias significativas entre blancos y perlas con microalgas. En ambos casos el % de remoción fue mayor en el segundo ciclo.

En la búsqueda de un sistema que pueda ofrecer una rápida acción en la remoción sin sacrificar la eficiencia, se optó por comparar el % de remoción de las exposiciones que duraron un tiempo estático (TE1) de 3 h más un tiempo dinámico (TD1 y TD2) de 6 y 4.5 horas a flujos F1 (0.08 mL/min) y F2 (0.16 mL/min). Se hizo una prueba t al 95% de confianza en donde se muestra que no hay diferencia significativa entre el % de remoción de BaA de las microalgas en el primer ciclo, entre los tiempos dinámicos TD1 y TD2 de 6 y 4.5 horas.





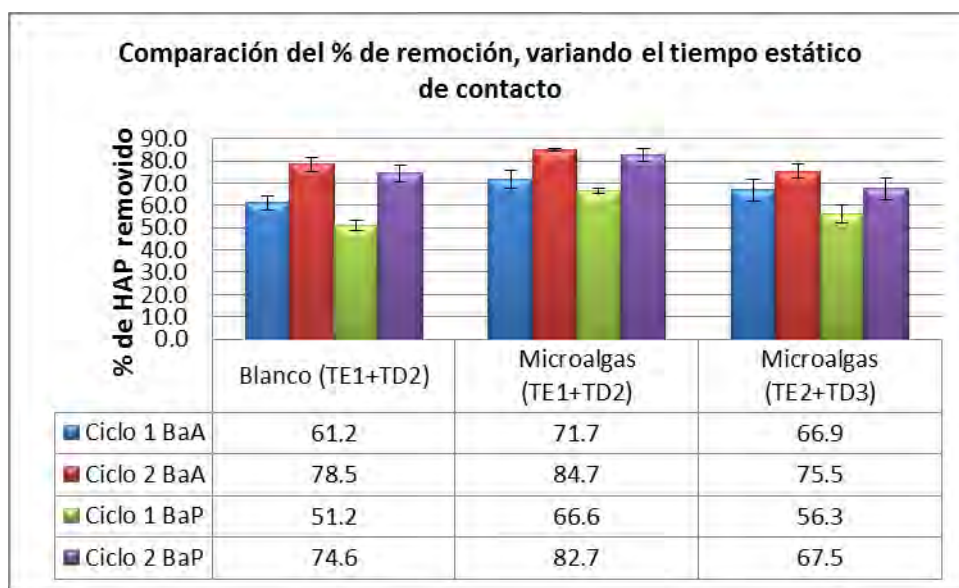
**Figura 3.16** Comparación de los % de remoción entre blancos y perlas con microalgas, variando flujos.  
 TE1= 3h, F1= 0.08 mL/min, TD1= 3h F2= 0.16 mL/min, TD2= 1.5h,  
 F3= 0.5 mL/min, TD3= 0.5h. (Resultado promedio, n=3)

Haciendo una prueba t, al 95% de confianza, para el BaP no hubo diferencias significativas en el % de remoción con las perlas con microalgas en ninguno de los dos ciclos, comparando los tiempos TD1 y TD2 de 6 y 4.5 horas, con respectivos flujos F1 y F2. Se analizaron los resultados obtenidos para F3 con un TD3 de 3.5 hrs, con una prueba t, al 95% de confianza, para lo que los resultados muestran una remoción sin diferencia significativa para el BaA, comparado con el blanco, para la primera y segunda toma de muestra. Para el BaP si hay diferencia significativa en ambas tomas. Con base a

estos resultados se optó por trabajar el reactor en un tiempo de 4.5 h por ciclo y buscando optimizar nuevamente las condiciones de operación.

### 3.3.2.2 Modificación al tiempo de contacto

El aumento del tiempo estático de contacto (TE2) en los ciclos no mostró mejoría en la disminución de los HAPs remanentes en el medio. Al contrario, como se observa en la figura 3.17 para 4 horas de contacto estático y flujo F3, ambos HAPs, tanto en el primero como en el segundo ciclo, el % de remoción fue menor que cuando se dejó 3 horas de contacto estático a un menor flujo (F2). Esto nos da indicio que la remoción del HAP se mejora si hay movimiento en el medio y las perlas, lo que haría que haya una mayor interacción de los contaminantes presentes en el medio y las perlas con microalgas y un flujo más bajo favorece la remoción más que un tiempo estático mayor.



**Figura 3.17** Remoción con dos tiempos de contacto estático. TE1=3 h+ TD2= 1.5 h con 0.16 mL/min (F2) y TE2= 4 h + TD3=0.5 h con 0.5 mL/min (F3). Tiempo de operación total para ambos ensayos = 4.5 h (Resultado promedio ± desviación estándar, n=3).

Se hizo una prueba t al 95% de confianza para comparar la remoción del BaA con las dos combinaciones y la diferencia del % de remoción fue significativa en el segundo ciclo; sin embargo para el BaP en ambos ciclos, la diferencia fue significativa, removiéndose mayor cantidad de BaP cuando se deja en contacto estático 3 horas la muestra acuosa y las perlas, que cuando se dejan 4 horas en contacto. Este resultado mostró que la condición adecuada para operar el bioreactor es dejando en contacto las perlas y el medio tres horas, de forma estática, renovando la muestra con un flujo de 0.16 mL/min.

### **3.3.2.3 Recirculación del medio**

Al realizar este ensayo por triplicado para las perlas de alginato sin microalgas (blancos) se observó una remoción de entre el 70-80% para ambos HAPs, en el primer ciclo y alrededor del 95% para ambos HAPs en el segundo; esta remoción sin duda fue mayor comparada con los ensayos anteriores, pero sin embargo se dudó de la certeza de que toda la remoción pueda asociarse al sistema alginato-microalgas, debido a que los HAPs son compuestos que al ser hidrófobos, tienden a adherirse a superficies como el silicón, material del cual está hecha la manguera con la cual se suministra la muestra acuosa al bioreactor. Por lo tanto, al estar en contacto continuo toda la muestra con la manguera, la adsorción por parte de la manguera puede ser mayor de lo que adsorbe el sistema sin recirculación.

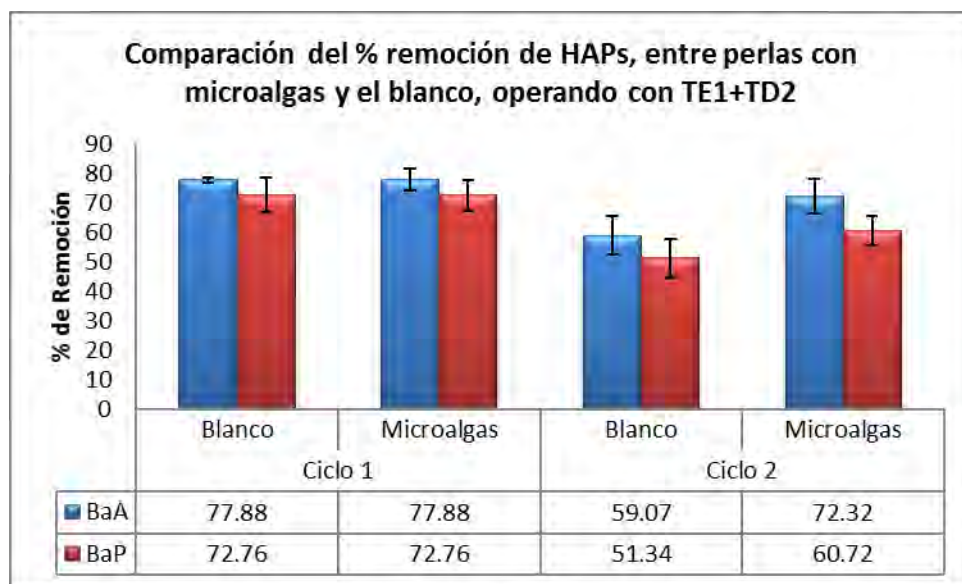
Por la incertidumbre respecto a este resultado se decidió no realizar recirculación en el ensayo empacando el bioreactor con las perlas-microalgas. Consultando con el distribuidor de la bomba peristáltica acerca de otros materiales disponibles para trabajar con la bomba, se encontró que existen materiales de baja adsorción, resistencia a varios disolventes y con la flexibilidad necesaria para operar la bomba. Por lo que una opción para proponer el uso de un sistema con recirculación puede ser viable con mangueras hechas de materiales de absorción mínima de los compuestos (en este caso los HAPs), ejemplo de estos materiales es el conocido comercialmente como "Viton".

### **3.3.2.4 Cambio de la proporción volumen muestra acuosa-perlas**

Al hacer el cambio de proporción del volumen de la muestra acuosa con respecto a las perlas de microalgas (volumen muestra-perlas) se interpretaron los resultados de la siguiente manera:

1) La figura 3.18 muestra las comparaciones de: A) Los resultados de la muestra acuosa tratada con las perlas sin algas (blanco) contra el resultado de la muestra acuosa tratada con las perlas-microalgas para el primer ciclo. Los resultados no muestran diferencia significativa en la remoción de ambos HAPs para el primer ciclo. La comparación de resultados se hizo con una prueba t al 95% de confianza, (n=3 para cada ensayo). Esto puede deberse a que los HAPs al encontrarse en un mayor volumen, no tienen el mismo contacto que en un volumen menor, pareciera más lenta la difusión, es por ello que no se ve diferencia con el blanco. B) Los resultados del tratamiento de la muestra acuosa con las microalgas en el segundo ciclo comparados con su respectivo blanco (perlas sin microalgas). Es de notarse que para el segundo ciclo, si hay una

diferencia significativa (se hizo con una prueba t al 95% de confianza, n=3) entre la remoción cuando hay perlas con microalgas y perlas en blanco, para ambos HAPs, observándose nuevamente el comportamiento de que en el segundo ciclo se observa mayor remoción de las perlas con microalgas, lo cual puede deberse a la adaptación de las microalgas a las condiciones de temperatura e iluminación y mayor tiempo de contacto global. Los resultados obtenidos en el ciclo 2 provenientes de R2, no muestran diferencias significativas con R3, confirmándose la homogeneidad del medio contenido en el bioreactor y el porcentaje de remoción medido en R2.



**Figura 3.18** Comparación de la remoción entre las perlas con microalgas y el blanco, en el reactor de 50 mL. TE1= 3h, TD2= 1.5h (Resultado promedio  $\pm$  desviación estándar, n=3).

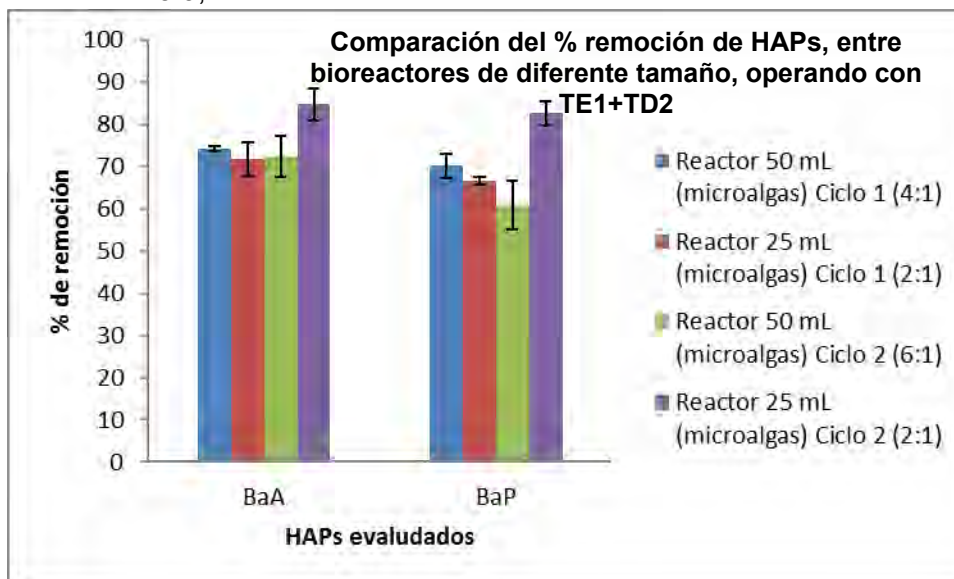
2) Comparando los resultados de la remoción del sistema 2:1 vs 4:1 (reactor 25 mL vs reactor de 50 mL) no hay diferencias significativas en la remoción de BaP, ni para BaA. Esto se comparó con una prueba t al 95% de confianza (n=3). Con estos resultados se puede inferir que el tratamiento con el doble de volumen de medio en el bioreactor (30 mL), que contenga los mismos  $\mu\text{g}$  de cada HAP (4  $\mu\text{g}$ ), puede ser tratado con la misma cantidad de perlas sin afectar el % de remoción (ver figura 3.19). En ambos casos, la bioremovición fue mayor en el segundo ciclo.

3) Comparando los resultados de volumen 6:1 vs 2:1 (ciclo 2 para ambos reactores), donde la cantidad de HAPs, en el bioreactor, es igual a 4  $\mu\text{g}$  provenientes de 30 mL de muestra acuosa más los  $\mu\text{g}$  provenientes de los 15 mL que se quedaron del primer ciclo ( $1.03 \pm 0.15 \mu\text{g}$  BaA y  $1.19 \pm 0.21 \mu\text{g}$  BaP), es decir un total de 5.03  $\mu\text{g}$  y 5.19

$\mu\text{g}$ , para BaA y BaP respectivamente, aparentemente la remoción disminuye y es menor que cuando la relación es 2:1; la figura 3.19 muestra esta comparación. Sin embargo la cantidad de HAPs iniciales a tratar fue mayor, y el % en que se aumentó la masa de HAPs (25%) es equivalente al % de remoción que disminuye, en el caso del BaP, no así para el BaA, mostrando que se sigue la misma tendencia de remover más BaA que BaP.

Con base a estas observaciones se puede ver que en proporciones mayores de muestra acuosa-perlas, la interacción de los HAPs con las perlas no es igual, no ofrecen una mejor remoción. Sin embargo, se concluye que una relación óptima de volumen de muestra acuosa-perlas, para tratar un medio acuoso con esa cantidad de HAPs presentes y perlas de esas características, sería 2:1 ya que con 4:1 no hay diferencia con los blancos, indicando que se favorece la remoción por sorción con una proporción más diferente.

En la tabla 3.9, se observan los resultados de ambos reactores



**Figura 3.19** Comparación de la remoción en los dos tamaños del reactor, proporciones 4:1 vs 2:1 y 6:1 vs 2:1 TE1= 3h, TD2= 1.5h (Resultado promedio  $\pm$  desviación estándar, n=3).

Comparando los resultados de Bernal Toris (2015), donde el tratamiento fue hecho de manera discontinua (por lotes), se aprecia una remoción aproximada de 70 para el BaP, lo cual es un valor cercano al obtenido en el reactor de 25 mL, en un tiempo de operación de 4.5 horas (primer ciclo); lo cual es una ventaja por que se disminuye el tiempo de exposición.

**Tabla 3.9** Microgramos recuperados ( $\pm$  desviación estándar) y % de remoción de los HAPs, con dos bioreactores de diferente volumen (n=3)

<b>REACTORES</b>				
	<b>Bioensayos (con microalgas)</b>		<b>Blancos (sin microalgas)</b>	
<b>Ciclo 1</b>				
	25 mL	50 mL	25 mL	50 mL
$\mu\text{g}$ rec. (% Remoción) <b>BaA</b>	<sup>a</sup> 1.13 $\pm$ 0.16 (72)	<sup>b</sup> 1.03 $\pm$ 0.15 (74)	<sup>a</sup> 1.55 $\pm$ 0.13 (61)	<sup>b</sup> 0.88 $\pm$ 0.04 (78)
$\mu\text{g}$ rec. (%Remoción) <b>BaP</b>	<sup>a</sup> 1.33 $\pm$ 0.04 (67)	<sup>b</sup> 1.19 $\pm$ 0.21 (70)	<sup>a</sup> 1.95 $\pm$ 0.09 (51)	<sup>b</sup> 1.09 $\pm$ 0.23 (73)
<b>Ciclo 2</b>				
$\mu\text{g}$ rec. (% Remoción) <b>BaA</b>	<sup>a</sup> 0.61 $\pm$ 0.02 (85)	<sup>c</sup> 1.38 $\pm$ 0.07 (72)	<sup>a</sup> 0.86 $\pm$ 0.12 (78)	<sup>c</sup> 2.01 $\pm$ 0.11 (60)
$\mu\text{g}$ rec. (%Remoción) <b>BaP</b>	<sup>a</sup> 0.69 $\pm$ 0.12 (83)	<sup>c</sup> 2.04 $\pm$ 0.12 (61)	<sup>a</sup> 1.02 $\pm$ 0.15 (75)	<sup>c</sup> 2.49 $\pm$ 0.15 (51)

<sup>a</sup>Relación 2:1; <sup>b</sup> Relación 4:1; <sup>c</sup> Relación 6:1

Es importante destacar que en los resultados de todos los experimentos las perlas del blanco (sin microalgas), nunca alcanzaron el % de remoción de las perlas que contenían a las microalgas y para obtener una remoción mayor fue necesario que operaran el doble de tiempo; con los resultados obtenidos se confirma que la remoción de HAPs se ve favorecida con la presencia de las microalgas.

## CAPITULO 4

### CONCLUSIONES

La metodología de extracción y análisis por EFS-HPLC-UV optimizada y validada, demostró ser precisa (C.V. <10%) y lograr una recuperación aceptable ( $\approx 75\%$ ) de los HAPs estudiados, acordes con los % de recuperación de métodos oficiales, como los métodos EPA, lineal en el rango de trabajo, además de contar con límites de detección y cuantificación muy pequeños ( $\approx 0.025$  mg/L o 25 partes por billón), que son muy útiles en el análisis de muestras ambientales y necesarios para cumplir con las normatividades oficiales. También mostró ser un método ecológico, porque con 6 mL de acetonitrilo, se pudieron recuperar los analitos de interés, ventaja con respecto al método clásico de la extracción Líquido-Líquido.

En cuanto a las microalgas inmovilizadas, se demostró que la matriz alginato permite la supervivencia de estos microorganismos e incluso permite que sigan reproduciéndose. La ventaja de tener las microalgas inmovilizadas es que pueden manejarse con mayor facilidad, pues todo el tratamiento del agua se hizo en un medio que no estaba aséptico y la remoción de los HAPs fue similar que cuando las perlas se encontraban en un medio estéril.

De acuerdo a los resultados, los factores que influyen en la remoción de los HAPs fueron el tiempo de contacto del medio acuoso y las perlas, la cantidad de microalgas por perla, el flujo con el cual se renueva el medio, relacionado con el movimiento (agitación) del medio acuoso. El volumen parece no tener un efecto marcado en la remoción.

Se logró cumplir el objetivo principal de esta investigación, el cual fue evaluar la remoción de Benzo(a)Antraceno y Benzo(a)Pireno en un reactor de flujo semicontinuo, utilizando las microalgas *Selenastrum capricornutum* y *Scenedesmus acutus*, inmovilizadas en alginato, demostrando que son capaces de remover estos contaminantes.

Con este trabajo se puede pensar en el tratamiento de aguas utilizando microalgas inmovilizadas para la remoción de HAPs, no descartándose que se pueden remover otros contaminantes.

## **PERSPECTIVAS A FUTURO**

Para complementar este estudio, y pensando en utilizar este método de remediación de agua a mayor escala, queda pendiente el estudiar cuántos son los ciclos de tratamiento máximos que se pueden realizar con las perlas antes de que éstas se desgasten y puedan dar paso a la fuga de los microalgas.

Otro estudio pendiente es la disposición de las perlas-cultivo de microalgas una vez que hayan sido utilizadas, pensando en un uso adecuado de la biomasa.

El diseño del reactor y el material con que está hecho, pudiera cambiar si se mejora la remoción de los HAPs.



## BIBLIOGRAFIA

- Ale, M.T., Pinelo, M. & Meyer, A.S., 2014. Assessing effects and interactions among key variables affecting the growth of mixotrophic microalgae: pH, inoculum volume, and growth medium composition. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 44(3), pp.242–256.
- Andersen, R.A., 2013. The microalgal cell. In Q. Richmond, Amos. Hu, ed. *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*. John Wiley & Sons, pp. 3–19.
- Bernal Toris, D.N., 2015. Tesis. Evaluación de la capacidad de *Selenastrum capricornutum* inmovilizada en alginato para remover Benzo[a]Pireno de medio de cultivo acuoso. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Brayner, R., Couté, A., Livage, J., Perrette, C., Sicard, C., 2011. Micro-algal biosensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401(2), pp.581–597.
- Brenner, A. & Abeliovich, A., 2013. Water Purification: Algae in Wastewater Oxidation Ponds. *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*, pp.595–601.
- Buseti, F., Heitz, A., Cuomo, M., Badoer, S., Traverso, P., 2006. Determination of sixteen polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous and solid samples from an Italian wastewater treatment plant. *Journal of Chromatography A*, 1102(1-2), pp.104–115.
- Camel, V., 2003. Solid phase extraction of trace elements. *Spectrochimica Acta Part B*, 58, pp.1177–1233.
- Castillo Morales, G., Díaz Baéz, .C., Pica Granados, Y., Ronco, A., Sobrero, A., Bulus Rosinni, G., Feola, G., Forget, G., Sánchez-Bain, A., 2004. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas G. Castillo Morales, ed., Ottawa, Canadá.
- Cerniglia, C.E., 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation*, 3(2-3), pp.351–368.
- Chan, S.M.N., Luan, T., Wong, M.H., Tam, N.F.Y., 2006. Removal and biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by *Selenastrum Capricornutum*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(7), pp.1772–1779.
- CONAGUA, 2014. Ley federal de derechos. Disposiciones aplicables en materia de aguas Nacionales 2014, México.
- Covarrubias, S.A., De-Bashan, L. E., Moreno, M., Bashan, Y., 2012. Alginate beads provide a beneficial physical barrier against native microorganisms in wastewater treated with immobilized bacteria and microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(6), pp.2669–2680.
- Cserhádi, T., 2010. *Chromatography of Aroma compounds and Fragrances* Springer, New York.

- De-Bashan, L.E., Hernández, J.P., Morey, T., Bashan, Y., 2004. Microalgae growth-promoting bacteria as “helpers” for microalgae: a novel approach for removing ammonium and phosphorus from municipal wastewater. *Water Research*, 38(2), pp.466–474.
- De-Bashan, L.E. & Bashan, Y., 2010. Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects. *Bioresource Technology*, 101(6), pp.1611–1627.
- Díaz Flores, G., 2013. Tesis. Evaluación de la biodegradación de Hidrocarburos aromáticos policíclicos por la microalga *Selenastrum capricornutum* mediante metodología de extracción en fase sólida acoplado a CLAR-UV. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Doria, E., Longoni, P., Scibilia, L., Iazzi, N., Cella, R., Nielsen, E., 2011. Isolation and characterization of a *Scenedesmus acutus* strain to be used for bioremediation of urban wastewater. *Journal of Applied Phycology*, 24(3), pp.375–383.
- Environmental Protection Agency, 2014. METHOD 8000D - Determinative Chromatographic Separations, United States of America.
- Eş, I., Vieira, J.D.G. & Amaral, A.C., 2015. Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(5), pp.2065–2082.
- El Gamal, A., 2010. Biological importance of marine algae. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 18(1), pp.1–25.
- Fogler, H. S. Elementos de ingeniería de las reacciones químicas 4ª edición, Pearson-Prentice Hall. México, 2008. pp. 421
- García de Llasera, M. P., Olmos-Espejel, J.J., Díaz-Flores, G., Montaña-Montiel, A., 2016. Biodegradation of benzo(a)pyrene by two freshwater microalgae *Selenastrum capricornutum* and *Scenedesmus acutus*: a comparative study useful for bioremediation. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(4), pp.3365–3375.
- García-Falcón, M.S., Pérez-Lamela, M. & Simal-Gándara, J., 2004. Comparison of strategies for extraction of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons from drinking waters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(23), pp.6897–6903.
- Gómez Luna, L.M. & Ramírez Carmenate, Z., 2004. Microalgas como biomonitores de contaminación. *Revista Cubana de Química*, 16(2), pp.34–48.
- Haritash, A.K. & Kaushik, C.P., 2009. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Journal of Hazardous Materials*, 169(1-3), pp.1–15.
- Hennion, M.C., 1999. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 856(1-2), pp.3–54.
- Hu, Y., Li, G., Yan, M., Ping, C., Ren, J., 2014. Investigation into the distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in wastewater sewage sludge and its resulting pyrolysis bio-oils. *Science of The Total Environment*, 473-474, pp.459–464.
- John, R.P., Anisha, G. S., Nampoothiri, K. M., Pandey, A., 2011. Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol. *Bioresource Technology*, 102(1), pp.186–193.

- Johnsen, A.R., Wick, L.Y. & Harms, H., 2005. Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environmental Pollution* (Barking, Essex : 1987), 133(1), pp.71–84.
- Juhasz, A.L. & Naidu, R., 2000. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 45(1-2), pp.57–88.
- Kaya, V.M. & Picard, G., 1995. The viability of *Scenedesmus bicellularis* cells immobilized on alginate screens following nutrient starvation in air at 100 % relative humidity. *Biotechnology and Bioengineering*, 46, pp.459–464.
- Lau, A., Wong, Y. S., Tong, Z., Tam, N. F.Y., 1998. Metal removal studied laboratory scale immobilized microalgal reactor. *Journal of Environmental Sciences*, 10(3), pp.474–478.
- 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), pp.273–280.
- Lindquist, B. & Warshawsky, D., 1985. Identification of the 11,12 dihydro-11,12-dihydroxybenzo(a)pireno as a major metabolite produced by the green alga, *Selenastrum capricornutum*. *Biochemical and Biophysical research communications*, 130(1), pp.71–75.
- Luan, T.G., Jin, J., Chan, S.M.N., Wong, Y.S., Tam, N. F.Y., 2006. Biosorption and biodegradation of tributyltin (TBT) by alginate immobilized *Chlorella vulgaris* beads in several treatment cycles. *Process Biochemistry*, 41(7), pp.1560–1565.
- Lupo, B., González, C. & Maestro, A., 2012. Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 3(1), pp.130–151.
- Lürling, M., 2003. Phenotypic plasticity in the green algae *Desmodesmus* and *Scenedesmus* with special reference to the induction of defensive morphology. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology*, 39(2), pp.85–101.
- Lürling, M. & Van Donk, E., 1999. Grazer-induced colony formation in *Scenedesmus acutus* (Chlorophyceae): Ecomorph expression at different temperatures. *Journal of Phycology*, 35(6), pp.1120–1126.
- Ma, J., Xiao, R., Li, J., Yu, J., Zhang, Y., Chen, L., 2010. Determination of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental water samples by solid-phase extraction using multi-walled carbon nanotubes as adsorbent coupled with gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217(34), pp.5462–5469.
- Mallick, N., 2002. Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: A review. *BioMetals*, 15(4), pp.377–390.
- Manoli, E. & Samara, C., 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbons in natural waters: sources, occurrence and analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, 18(6), pp.417–428.
- Marce, R.M. & Borrull, F., 2000. Solid-phase extraction of polycyclic aromatic compounds. *Journal of Chromatography A*, 885(1-2), pp.273–290.
- Maria, G., Luta, I. & Maria, C., 2013. Model-based sensitivity analysis of a fluidized-bed bioreactor for mercury uptake by immobilised *Pseudomonas putida* cells. *Chemical Papers*, 67(11), pp.1364–1375.

- Mastandrea, C., Chichizola, C., Ludueña, B., Sánchez, H., Álvarez, H., Gutiérrez, A., 2005. Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Riesgos para la salud y marcadores biológicos. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 39(1), pp.27–36.
- Montaño Montiel, A., 2013. Tesis. Remoción de Hidrocarburos aromáticos Policíclicos en medio acuoso por *Scenedesmus acutus*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Moreno-Garrido, I., 2008. Microalgae immobilization: current techniques and uses. *Bioresource Technology*, 99(10), pp.3949–3964.
- Moreno-Garrido, I., 2013. Microalgal Immobilization Methods. In J. M. Guisan, ed. *Immobilization of Enzymes and Cells*. New York, pp. 327–347.
- Muñoz, R. & Guieysse, B., 2006. Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review. *Water Research*, 40(15), pp.2799–2815.
- Ohura, T., 2007. Environmental behavior, sources, and effects of chlorinated polycyclic aromatic hydrocarbons. *The Scientific World Journal*, 7, pp.372–380.
- Oliferova, L., Statkus, M., Tsysin, G., Shpigun, O., Zolotov, Y., 2005. On-line solid-phase extraction and HPLC determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water using fluorocarbon polymer sorbents. *Analytica Chimica Acta*, 538(1-2), pp.35–40.
- Olmos Espejel, J.J., 2013. Tesis Doctoral. Metodologías Cromatográficas en Línea para la determinación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en cultivos de microorganismos. Universidad Nacional Autónoma de México.
- 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, pp.138–147.
- Ozcan, S., Tor, A. & Aydin, M.E., 2010. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in waters by ultrasound-assisted emulsification-microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 665(2), pp.193–199.
- Ozer, T.B., Erkaya, I.A., Udoh, A.U., Duygu, D.Y., Akbulut, A., Bayramoglu, G., Arica, M.Y., 2011. Biosorption of Cr (VI) by free and immobilized *Pediastrum boryanum* biomass: equilibrium, kinetic, and thermodynamic studies. *Environmental Science and Pollution Research International*, 19(7), pp.2983–2993.
- Peña Salamanca, E.J., Palacios Penaranda M. L., Ospina Álvarez, N. 2005. Algas como indicadoras de contaminación. Programa Editorial Universidad del Valle, Cali, Colombia, 2005. pp.
- PerkinElmer, 2012. Solid Phase Extraction (SPE) Solutions.
- Pires, J.C.M., Alvim-Ferraz, M.C.M., Martins, F.G., Simões, M., 2013. Wastewater treatment to enhance the economic viability of microalgae culture. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(8), pp.5096–5105.

- Poole, C.F., 2003. New trends in solid-phase extraction. *Trends in Analytical Chemistry*, 22(6), pp.362–373.
- Romo-Gómez, C., Monks, S., Pulido-Flores, G., Gordillo-Martínez, A.J., 2010. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in superficial water and sediment of Lake Tecocomulco, Mexico. *Interciencia*, 35(12), pp.905–911.
- Rubio-Clemente, A., Torres-Palma, R.A. & Peñuela, G.A., 2014. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous environment by chemical treatments: A review. *Science of the Total Environment*, 478, pp.201–225.
- Ruiz-Marin, A., Mendoza-Espinosa, L.G. & Stephenson, T., 2010. Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. *Bioresource Technology*, 101(1), pp.58–64.
- Saeed, A. & Iqbal, M., 2006. Immobilization of blue green microalgae on loofa sponge to biosorb cadmium in repeated shake flask batch and continuous flow fixed bed column reactor system. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(8), pp.775–782.
- SEMARNAT, 2013. NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012, México.
- Semple, K.T., I, R.B.C. & Schmidt, S., 1999. Biodegradation of aromatic compounds by microalgae. *FEMS Microbiology letters*, 170(May 1998), pp.291–300.
- Smidsrod, O. & Skjåk-Braek, G., 1990. Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends in Biotechnology*, 8 (March), pp.71–78.
- Smith, R.M., 2003. Before the injection--modern methods of sample preparation for separation techniques. *Journal of Chromatography A*, 1000(1-2), pp.3–27.
- Suzuki, T., Yamaguchi, T. & Ishida, M., 1998. Immobilization of *Prototheca zopfii* in calcium-alginate beads for the degradation of hydrocarbons. *Process Biochemistry*, 33(5), pp.541–546.
- Tam, N.F.Y. & Wong, Y.S., 2000. Effect of immobilized microalgal bead concentrations on wastewater nutrient removal. *Environmental Pollution*, 107, pp.145–151.
- Tam, N.F.Y., Wong, Y.S. & Simpson, C.G., 1998. Repeated removal of copper by alginate beads and the enhancement by microalgae. *Biotechnolgy Techniques*, 12(3), pp.187–190.
- Tam, N.F.Y., Wong, Y.S. & Wong, M.H., 2009. Novel technology in pollutant removal at source and bioremediation. *Ocean & Coastal Management*, 52(7), pp.368–373.
- Tziotzios, G. et al., 2007. Effect of the specific surface area and operating mode on biological phenol removal using packed bed reactors. *Desalination*, 211(1-3), pp.128–137.
- US-EPA, 2009. National primary drinking water regulations.
- Wang, P., Luo, L., Ke, L., Luan, T., Tam, N.F.Y., 2013. Combined toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals to biochemical and antioxidant responses of free and immobilized *Selenastrum capricornutum*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32(3), pp.673–683.

- Wang, Y. & Wang, Y., 2007. Estimating the Octanol–Water Partition Coefficients of NPAHs and PAHs by Solid Phase Microextraction and Gas Chromatography Ion Trap Detector. *Analytical Letters*, 40(2), pp.307–319.
- Watanabe, K., 2001. Microorganisms relevant to bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*, 12(3), pp.237–241.
- Wells, M.J.M., 2003. Principles of Extraction and the Extraction of Semivolatile Organics from Liquids. In Sample Preparation. *Techniques in Analytical Chemistry*. pp. 37–138.
- World Health Organization, 1998. Polynuclear aromatic hydrocarbons in Drinking-Water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-Water Quality, 2, pp.1–27.