

Información Importante

La Universidad Santo Tomás, informa que el(los) autor(es) ha(n) autorizado a usuarios internos y externos de la institución a consultar el contenido de este documento a través del Catálogo en línea del CRAI-Biblioteca y el Repositorio Institucional en la página Web de la CRAI-Biblioteca, así como en las redes de información del país y del exterior con las cuales tenga convenio la Universidad.

Se permite la consulta a los usuarios interesados en el contenido de este documento, para todos los usos que tengan **finalidad académica**, nunca para usos comerciales, siempre y cuando mediante la correspondiente cita bibliográfica se le dé crédito al trabajo de grado y a su autor.

De conformidad con lo establecido en el Artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, la Universidad Santo Tomás informa que “los derechos morales sobre documento son propiedad de los autores, los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.”

Centro de Recursos para el Aprendizaje y la Investigación, CRAI-Biblioteca

Universidad Santo Tomás, Bucaramanga

ESTUDIO DE LA REMOCIÓN DE HIDROCARBUROS POR *SELENASTRUM*
CAPRICORNUTUM EN MUESTRAS DE LIXIVIADOS DE SUELOS
CONTAMINADOS POR PETRÓLEO

MARÍA ANGÉLICA CORZO RONCANCIO

UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS
DIVISIÓN DE INGENIERÍAS Y ARQUITECTURA
FACULTAD DE QUÍMICA AMBIENTAL
BUCARAMANGA
2017

ESTUDIO DE LA REMOCIÓN DE HIDROCARBUROS POR *SELENASTRUM
CAPRICORNUTUM* EN MUESTRAS DE LIXIVIADOS DE SUELOS
CONTAMINADOS POR PETRÓLEO

MARÍA ANGÉLICA CORZO RONCANCIO

TRABAJO DE GRADO

Director del Proyecto
PAULINA ALEJANDRA MEDINA CASTILLO
Química Marina. *M.Sc.*

Co Director del Proyecto
RICARDO RESTREPO MANRIQUE
Biólogo Esp.

UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS
DIVISION DE INGENIERIAS Y ARQUITECTURA
FACULTAD DE QUÍMICA AMBIENTAL
BUCARAMANGA
2017

“No nos queda otro camino más que luchar”.
A Berta Cáceres, activista ambiental y líder indígena hondureña, asesinada por defender sus ideales, y a todos aquellos mártires, gracias por ser un ejemplo de fortaleza y de esperanza, gracias por dar todo, hasta la vida, en la lucha de un mundo mejor y más justo.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mis padres y hermana por ser el apoyo constante en todo este proceso, por ser mi fortaleza en los momentos difíciles y ser un gran ejemplo de amor.

Agradecer también a mis directores; la profesora Paulina Medina y el profesor Ricardo Restrepo por la confianza en este proyecto y la dedicación para orientarme en este camino.

A la Universidad Católica de la Santísima Concepción por abrirme sus puertas y brindarme los espacios y el apoyo para realizar este proyecto. Así mismo a la Universidad Santo Tomás, por todos estos años de aprendizaje, y por todo el apoyo que me han brindado a lo largo de la carrera.

A todas aquellas personas que tuve el agrado de conocer en mi estadía en Chile, a mis compañeros de universidad, y a los que fui conociendo en el camino, gracias por ser tan apañadoras, carismáticas y por brindarme su amistad. Al grupo del laboratorio de Ecotoxicología y Procesos de Oxidación Avanzada por su ayuda y por todos los momentos compartidos.

A Nicolás, Sol, y a todos los que de una u otra forma han hecho parte de este proceso y se me escapan, gracias por tantos años de risa, llanto y momentos difíciles en los cuales sin su amistad no podría haber superado con éxito. Gracias por acompañarme en cada locura de este camino, y espero que sean muchas más.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
2. JUSTIFICACIÓN	19
3. OBJETIVOS	21
3.1 OBJETIVO GENERAL	21
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3.2.1 Cuantificar los hidrocarburos totales presentes en las muestras de lixiviado de suelo empleando como técnica analítica la cromatografía de gases (mediante el método de patrón externo) antes y después del tratamiento con <i>Selenastrum capricornutum</i> .	21
3.2.2 Determinar el porcentaje de remoción de hidrocarburos presentes en el lixiviado de suelo después del tratamiento con <i>Selenastrum capricornutum</i> .	21
3.2.3 Evaluar la toxicidad del lixiviado con los bioindicadores <i>Daphnia magna</i> y <i>Lactuca sativa</i> , antes, durante y después del tratamiento con <i>Selenastrum capricornutum</i> .	21
4. MARCO REFERENCIAL	22
4.1 MARCO TEÓRICO	22
4.1.1 ENSAYOS TOXICOLÓGICOS.	22
Aspectos generales y ensayos toxicológicos con el microcrustáceo <i>Daphnia magna</i> .	22
Aspectos generales y ensayos toxicológicos de la planta terrestre <i>Lactuca sativa</i> .	24
4.1.2 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS DE PETRÓLEO	24
Estandarización y evaluación del método	25
4.2 MARCO DE ANTECEDENTES	26
4.2.1 REMOCIÓN DE PETRÓLEO EN SUELOS	26
4.2.2 USOS DE LAS USOS DE LAS MICROALGAS EN TRATAMIENTOS DE REMOCIÓN	27
4.2.3 DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS	28
4.2.3.1 Biodegradación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en el Ser Humano	29
4.2.3.2 Biodegradación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos por parte de la microalga <i>Selenastrum capricornutum</i> .	31

5. METODOLOGÍA	34
5.1 Cultivo de la microalga <i>Selenastrum capricornutum</i>	35
5.2 Adaptación de la microalga y selección de la concentración de petróleo	35
5.3 Preparación de lixiviado de suelo	36
5.4 Preparación del tratamiento en los lixiviados de suelos.	37
5.5 Determinación de la clorofila α en las muestras de lixiviados de suelo contaminado con petróleo	38
5.6 Determinación de hidrocarburos totales presentes en el lixiviado de suelo por cromatografía de gases	38
5.6.1 Extracción de Hidrocarburos presentes en las muestras de lixiviados	38
5.6.2 Porcentaje de recuperación del método de extracción líquido-líquido con diclorometano	39
5.6.3 Condiciones cromatográficas	39
5.6.4 Curva de calibración y evaluación del método	40
5.6.5 Obtención y análisis de resultados.	40
5.7 Ensayo de toxicidad con el microcrustáceo <i>Daphnia magna</i>	41
5.8 Ensayo de toxicidad con semillas de lechuga (<i>Lactuca sativa</i>)	42
5.9 Impactos ambientales del proyecto	43
6. RESULTADOS	44
6.1 Cultivo y adaptación de la microalga.	44
6.2 Determinación de la clorofila α en las muestras de lixiviados de suelo contaminado con petróleo	46
6.3 Determinación de Hidrocarburos presentes en el lixiviado de suelo contaminado con petróleo mediante cromatografía gaseosa.	48
6.3.1 Porcentaje de recuperación del método de extracción de hidrocarburos para las muestras de lixiviados de suelo.	48
6.3.2 Análisis Cromatográfico y curva de calibración de los estándares para la determinación de los hidrocarburos por patrón externo.	48
6.3.3 Determinación de la concentración de hidrocarburos alifáticos en las muestras de lixiviados de suelos por cromatografía gaseosa.	49
6.3.4 Posible identificación de los compuestos en las muestras por Espectroscopía de masas.	53
6.4 Ensayos toxicológicos.	55
6.4.1 Ensayo toxicológico con <i>Daphnia magna</i>	55
6.4.2 Ensayo toxicológico con semillas de lechuga (<i>Lactuca sativa</i>)	57
7. CONCLUSIONES	60
8. BIBLIOGRAFÍA	62
9. ANEXOS	70

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Composición del petróleo	14
Figura 2. Distintos tipos de hidrocarburos presentes en el petróleo	15
Figura 3. Derrames de petróleo ocurridos en Ecuador, México y Colombia	16
Figura 4. Efectos de derrames de hidrocarburos de petróleo en medios acuáticos	17
Figura 5. Efectos de los derrames de hidrocarburos de petróleo en suelos	18
Figura 6. Fotografía del cladóceros <i>Daphnia magna</i> en etapa adulta	23
Figura 7. Morfología de la planta de lechuga	24
Figura 8. Representación esquemática de la metabolización de BaP en el ser humano	30
Figura 9. Estructura molecular del Benzo[a]pireno (BaP)	31
Figura 10. Representación esquemática de los productos de la metabolización del Benzo[a]pireno por la microalga <i>Selenastrum capricornutum</i>	32
Figura 11. Esquema de la acción de las enzimas oxigenasas	33
Figura 12. Metodología planteada para el desarrollo del proyecto	34
Figura 13. Cultivos de la microalga <i>S. capricornutum</i> en los laboratorios de toxicología de la UCSC	35
Figura 14. Preparación de los lixiviados de suelo contaminado con volúmenes crecientes de petróleo. A) Bandejas con la mezcla suelo-petróleo. B) Lixiviados obtenidos después de las 24 horas. C) Lixiviados después del proceso de decantación	37
Figura 15. Filtrado de la muestra de 25 mL para determinación de Clorofila α	38
Figura 16. Muestras extraídas de los lixiviados de suelo contaminado con petróleo	39
Figura 17. Ensayo de toxicidad con <i>Daphnia magna</i>	41
Figura 18. Ensayo de toxicidad con semillas de <i>Lactuca sativa</i>	42
Figura 19. Resultados de absorbancia de la microalga <i>Selenastrum capricornutum</i> expuesta a diferentes concentraciones de petróleo	45
Figura 20. Adaptación de la microalga a volúmenes crecientes de petróleo	45
Figura 21. Resultados de la determinación de clorofila α en las muestras de lixiviados de suelo contaminado con petróleo	47
Figura 22. Cromatogramas de las muestras de lixiviados de suelos contaminados con 25 mL de petróleo antes (A) y después del tratamiento (B) y muestras de lixiviados de suelos contaminados con 50 mL de petróleo antes (C) y después del tratamiento (D)	51
Figura 23. Porcentaje de mortalidad en cada tratamiento	56
Figura 24. Resultados del ensayo de toxicidad con semillas de lechuga (<i>Lactuca sativa</i>)	58

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Características de la Tierra de Hojas marca Anasac.	36
Tabla 2. Características del petróleo crudo procedente de la refinería ENAP.	36
Tabla 3. Resultados de la absorbancia para determinar clorofila α en las muestras de lixiviados a los 5 y 10 días de tratamiento.	46
Tabla 4. Corrección de las absorbancias	46
Tabla 5. Porcentaje de recuperación para cada muestra.	48
Tabla 6. Tiempos de retención y área de cada compuesto de la mezcla de estándares de hidrocarburos alifáticos lineales	48
Tabla 7. Resultados cuantitativos de las muestras evaluadas por CGMS.	52
Tabla 8. Posible identificación de los hidrocarburos alifáticos lineales en las muestras de 25mL Y 50mL antes y después del tratamiento	54
Tabla 9. Análisis de CL ₅₀ del tóxico de referencia para el individuo <i>D. magna</i> a través el programa Probit	55
Tabla 10. Resultados del ensayo de toxicidad con <i>Daphnia magna</i>	55
Tabla 11. Concentración efectiva (CE ₅₀) del control positivo para el bioensayo de semillas de <i>Lactuca sativa</i>	57
Tabla 12. Resultados del ensayo de toxicidad con <i>Lactuca sativa</i> .	58
Tabla 13. ANOVA respuesta pretratamiento del bioensayo con <i>D. magna</i>	71
Tabla 14. ANOVA respuesta tratamiento (5 días) del bioensayo con <i>D. magna</i>	72
Tabla 15. ANOVA respuesta pretratamiento del bioensayo con <i>Lactuca sativa</i> .	73
Tabla 16. ANOVA respuesta tratamiento a los 5 días del bioensayo con <i>Lactuca sativa</i> .	74
Tabla 17. ANOVA respuesta pretratamiento del bioensayo con <i>Lactuca sativa</i> .	75

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Tratamiento estadístico ANOVA para resultados de la determinación de Clorofila α .	70
Anexo 2. Tratamiento estadístico ANOVA para los ensayos toxicológicos.	71
Anexo 3. Registro fotográfico ensayo de toxicidad <i>Lactuca Sativa</i>	76
Anexo 4. Curvas de calibración para el método de alcanos obtenidas por la mezcla de estándares.	78
Anexo 5. Espectros de masas de las muestras de lixiviados de suelos contaminados con volúmenes crecientes de petróleo	81
Anexo 6. Certificado participación en modo póster del III Congreso Colombiano de Restauración Ecológica	87

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS, ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
BAP	Benzo[a]pireno
BTEX	Benceno, tolueno, etilbenceno, xileno.
CE₅₀	Concentración efectiva media
CL₅₀	Concentración letal media
Cr_(VI)	Cromo (6)
CO₂	Dióxido de carbono
DBO	Demanda bioquímica de oxígeno
DQO	Demanda química de oxígeno
FLA	Fluoranteno
FLU	Fluoreno
HAP's	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
HTP	Hidrocarburos totales de petróleo
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
mL	Mililitros
NCh	Norma chilena
nm	Nanometros
PHE	Fenantreno
PYR	Pireno
S	Desviación estándar
SST	Sólidos suspendidos totales
USEPA	Agencia de protección ambiental de los Estados Unidos
µm	Micrómetro

GLOSARIO

ATENUACIÓN NATURAL: proceso en el que se aprovechan los ciclos naturales para contener la contaminación que se genera por derrames de productos químicos y reducir la concentración de los contaminantes en los lugares afectados¹.

BIOACUMULACIÓN: aumento de la concentración del tóxico dentro de los organismos respecto a la concentración del tóxico en el ambiente como consecuencia de la exposición a este, ya sea inhalación, cutánea u oral ².

BIOAUMENTACIÓN: en una técnica de biorremediación que consiste en agregar microorganismos no nativos con el fin de completar o definir la biodegradación del sustrato³.

BIOESTIMULACIÓN: es la adición de nutrientes para beneficiar el crecimiento de los microorganismos nativos y de esta manera aumentar la velocidad de la degradación de un compuesto tóxico⁴

BIOTA: reunión de poblaciones diferentes e interactivas de organismos⁵

CONCENTRACIÓN EFECTIVA MEDIA (CE₅₀): concentración de una sustancia en el medio, que se espera que produzca un determinado efecto en el 50% de los organismos de experimentación de una población dada⁶.

CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (CL₅₀): concentración de una sustancia en el medio, que se espera que mate al 50% de los organismos de una población⁶.

CONTROL NEGATIVO: es un tratamiento en una investigación que duplica todos los factores que puedan afectar el resultado, excepto la condición que está siendo investigada⁷.

CONTROL POSITIVO: evaluación de la respuesta tóxica con una sustancia de referencia, utilizada para controlar la sensibilidad de los organismos en el momento en el cual se evalúa el material problema⁸.

HIDROCARBUROS: compuestos orgánicos formados por carbono e hidrógeno⁹.

INOCUO: que no hace daño¹⁰.

NCh 2083: norma chilena para los bioensayos de toxicidad aguda mediante la determinación de la inhibición de la movilidad de *Daphnia magna* o *Daphnia pulex* (Crustacea, Cladocera).

RESUMEN

La contaminación por petróleo es una de las problemáticas que más preocupan a la comunidad en general. El uso del petróleo, solamente como fuente de energía primaria, es del 34% a nivel mundial¹¹. Además, no solamente se utiliza para la producción de energía, sus derivados también son importantes a nivel industrial. Esto genera que haya una alta demanda de petróleo. Aunque hoy en día las nuevas formas de energía renovables estén creciendo para dejar atrás el uso de los combustibles fósiles, la demanda energética mundial sólo puede ser suplida por este. No sólo su proceso de refinamiento genera contaminación, sino que, además, las otras etapas para la producción como su extracción y transporte también son contaminantes.

El interés por combatir la contaminación que tanto afecta al medio ambiente ha llevado a estudiar formas de remediación de las matrices que han sido contaminadas, como la biorremediación, que se perfila como una forma de tratamiento económico y amigable con el medio ambiente.

En este trabajo se evaluó el potencial degradador de la microalga *Selenastrum capricornutum* como agente biorremediador de hidrocarburos en muestras de suelos contaminados con petróleo, además se la evaluación de la toxicidad de estos suelos después del tratamiento, mediante ensayos agudos con *Daphnia magna* y semillas de lechuga (*Lactuca sativa*). Primero se llevó a cabo el cultivo y la adaptación de la microalga al petróleo. Luego se obtuvieron los lixiviados de suelos previamente contaminados con volúmenes crecientes de petróleo crudo para iniciar el tratamiento con la microalga. Se extrajeron las muestras antes y después del tratamiento (10 días) y se cuantificaron por cromatografía de gases acoplada a masas. Se determinó así un porcentaje de remoción de 85,8% para las muestras de 25 mL y 97,2% para las muestras de 50 mL. Finalmente, se llevaron a cabo las pruebas ecotoxicológicas con los organismos indicadores. En ambos casos se obtuvo una disminución de la toxicidad de las muestras de lixiviados, por lo cual se puede concluir que el tratamiento con *Selenastrum capricornutum* es un tratamiento viable para la degradación de hidrocarburos.

El siguiente trabajo participó en modo póster en el III Congreso Colombiano de Restauración Ecológica

Palabras claves: Biorremediación, hidrocarburos, *Selenastrum Capricornutum*, toxicidad.

ABSTRACT

Oil pollution is one of the most concerning issues for the community as a whole. The global use of oil as a primary source of energy accounts for 34% of the total use of all sources. Furthermore, it must be added that not only is it used for energy production, but its derivatives are also important on an industrial level. This means there was a high demand for oil. Although nowadays the use of newer forms of renewable are growing and overtaking the use of fossil fuels, the global energy demand can only be met by this source. It is not only its refining process which generates pollution such as CO₂ emissions, but also the other final production stages, such as dumping generated waste near pipelines, or the oil spills during the transportation of crude oil.

Interest in combatting the effects of pollution on the environment has led to the study of how to counteract this original contamination. Bioremediation has shown itself to be an economic form of treatment and also environmentally friendly.

This research presents the study of the degradation potential of the microalgae *Selenastrum capricornutum* as a bioremediation agent of hydrocarbons on samples of soils polluted with oil. Additionally, it is presented the assessment of toxicity of these soils after treatment, through acute tests with *Daphnia magna* and lettuce seeds (*Lactuca sativa*). The first step was the cultivation and adaptation of the microalgae to oil. Then, the leaching of the soil previously polluted with increasing volumes of crude oil were obtained to initiate the treatment with microalgae. Samples were extracted before and after treatment (10 days) and quantified by mass-coupled gas chromatography. Thus, a percentage of removal of 85.5% was determined for the 25 ml samples and a percentage of 97.2% for the 50 ml samples. Eventually, ecotoxicological tests were carried out with the indicator organisms. In both cases, there was a decrease on the toxicity of the samples of leaching, therefore, it can be concluded that the treatment with *Selenastrum capricornutum* is viable for the degradation of hydrocarbons.

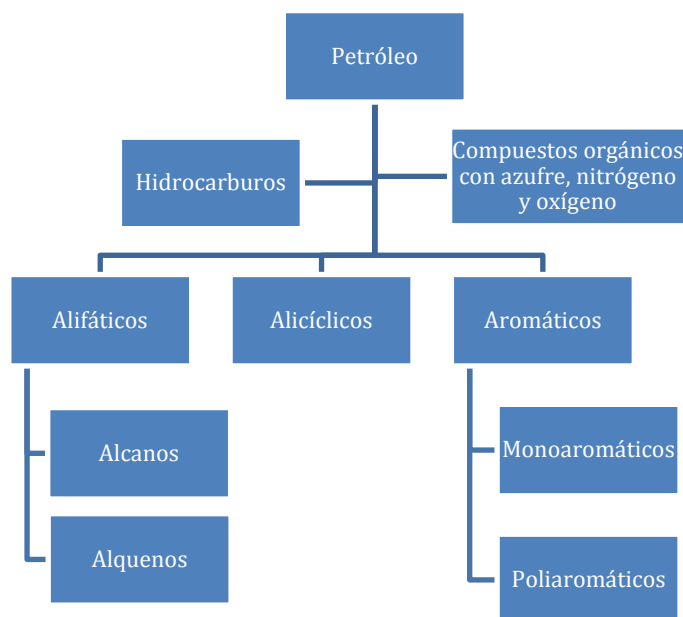
This research participated in poster mode at the III Congreso Colombiano de Restauración Ecológica

Key Words: Bioremediation, hydrocarbons, *Selenastrum capricornutum*, toxicity.

INTRODUCCIÓN

El petróleo es una sustancia viscosa, de color oscuro, formada en su mayoría por hidrocarburos y compuestos orgánicos con azufre, nitrógeno y oxígeno, además de algunos metales, como se puede observar en la Figura 1. Esta mezcla de hidrocarburos es el resultado de la descomposición de materia orgánica que proviene de restos de animales y plantas. Puede tener la consistencia de un líquido tan pesado que casi no fluye, aunque llega a ser menos denso que el agua y por consecuencia flota en los cuerpos acuáticos con los que entra en contacto.

Figura 1. Composición del petróleo¹²



En el grupo de hidrocarburos alifáticos que componen los hidrocarburos presentes en petróleo se pueden encontrar las parafinas volátiles, las no volátiles y los alquenos. Las parafinas volátiles son alcanos que se componen de cadenas de 1 a 10 átomos de carbono, estas representan el 30% del crudo de petróleo¹³, seguidos por las parafinas no volátiles, cadenas de alcanos que presentan de 11 – 40 átomos de carbono, y que pueden llegar a constituir 20% de petróleo crudo¹³, y finalmente los alquenos, o también llamados olefinas, que si bien no están muy presentes en el petróleo crudo son de gran importancia en los productos del proceso de refinado de este¹³.

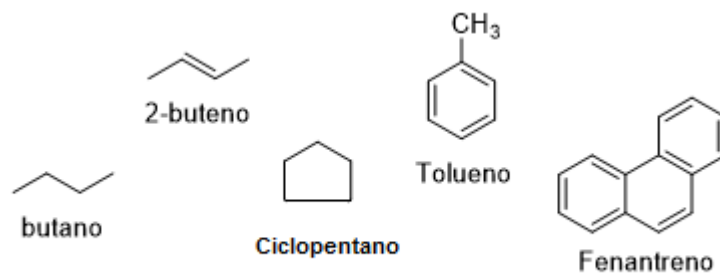
Los compuestos alicíclicos son cadenas cerradas de 3 o más carbonos que no poseen aromaticidad, como por ejemplo el ciclopentano, un cicloalcano presente en el petróleo¹⁴. Los compuestos alicíclicos, o naftenos, pueden llegar a constituir el 31% del petróleo crudo¹³.

La fracción aromática del petróleo está constituida por compuestos monoaromáticos y poliaromáticos. Los hidrocarburos monoaromáticos son aquellos compuestos que

poseen sólo un anillo bencénico en su estructura. Entre ellos se encuentran los BTEX, que son el grupo de hidrocarburos monoaromáticos compuesto por benceno, tolueno, etilbenceno y xileno¹⁵. Por otro lado, se encuentran los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's) que son compuestos que poseen un número variable de anillos bencénicos. Debido a su amplia toxicidad, su persistencia en el ambiente y variedad, se caracterizan por ser contaminantes de gran importancia. Su alta aromaticidad genera la dificultad que estos poseen para ser solubilizados en agua, lo cual hace que posean una alta resistencia a ser degradados naturalmente y como consecuencia; su bioacumulación en los organismos que están en contacto con ellos ¹⁶.

En la Figura 2 se puede observar ejemplos de los distintos tipos de hidrocarburos que se encuentran en el petróleo crudo y en los subproductos.

Figura 2. Distintos tipos de hidrocarburos presentes en el petróleo⁹.



1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El petróleo es de gran importancia debido a los derivados de su proceso de refinamiento, como lo son la gasolina, el diésel, aceites lubricantes, grasas y parafinas, entre otros. Lo cual hace que, a nivel mundial, se extraigan más de 2 billones de toneladas de petróleo por año ¹⁷.

Debido a la alta demanda y comercialización de este recurso, la contaminación generada por los procesos de extracción, refinamiento y por derrames del crudo producidos al momento de su transporte, son en la actualidad uno de los temas más importantes y que más preocupan a la sociedad, ya que generan contaminación cuando son emitidos a la atmósfera o vertidos en suelos o cuerpos de agua, como los vistos en el derrame de la plataformas petrolera de la empresa Deepwater Horizon en el Golfo de México, donde se estima que alrededor de 270 millones de litros fueron vertidos al mar, o el derrame de la Exxon Valdez en 1989 donde 38000 toneladas del crudo cayeron las costas de Alaska¹⁸.

Sudamérica no ha sido la excepción a estas catástrofes como las que se exponen en la Figura 3. La compañía Texaco fue responsable del vertimiento de 64 millones de litros de petróleo crudo en la Amazonía Ecuatoriana¹⁹; en Chile la empresa Empire Navigation derramó un estimado de 38 mil litros de petróleo en las costas de Quintero ²⁰; y finalmente, en Colombia, aunque se han presentado derrames accidentales, los constantes bombardeos por parte de los grupos al margen de la ley a los oleoductos de la Compañía Colombiana de Petróleos, ECOPETROL, han dejado un saldo de al menos unos 450 millones de litros de petróleo donde ríos, quebradas, y ciénagas se han visto afectadas^{21,22}.

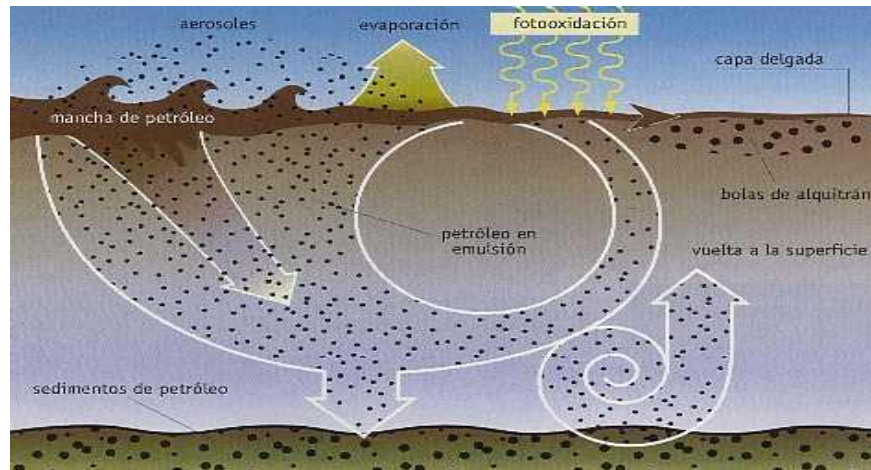
Figura 3. Derrames de petróleo ocurridos en Ecuador, México y Colombia²³⁻²⁵.



Cuando el derrame se produce en el medio acuático generalmente el crudo forma una capa por encima del agua, ya que es menos denso que esta, evitando el paso de la luz, afectando los ciclos fotosintéticos y el intercambio de oxígeno, también puede suceder que los componentes más pesados del crudo tiendan a acumularse en los sedimentos, generando una contaminación constante en las fuentes de agua,

afectando a la fauna sensible a la contaminación que vive en ellos (Figura 4). Un río que se afecta por un vertimiento de crudo es incapaz de sostener flora y fauna acuática. También afecta a la biota que entra en contacto con el derrame, los derivados del petróleo pueden entrar en la cadena alimenticia de los organismos que están en contacto con la contaminación, esto genera una bioacumulación, y aún peor, afecta morfológicamente a los especímenes, en los peces, por ejemplo, se ha observado la aparición de una aleta más, cambio en la coloración, afectaciones en el desarrollo larval y presencia de tumores ²⁶.

Figura 4. Efectos de derrames de hidrocarburos de petróleo en medios acuáticos²⁷.



Cuando un suelo es afectado por un derrame de petróleo cambia las propiedades que lo componen; el incremento de carbono hace que se alteren las relaciones con los demás componentes químicos como nitrógeno y fósforo ²⁸, provoca la muerte de los microorganismos del suelo, produciéndose un desequilibrio ecológico interrumpiendo el ciclo de nutrientes, en algunos casos puede perder su capacidad para filtrar el agua que llega por precipitación o escurrimientos, evitando que lleguen a los acuíferos subterráneos, afectando finalmente a la hidrósfera ¹⁷; los hidrocarburos en fase no acuosa pueden percolarse a las napas subterráneas contaminándolas (Figura 5) .

Figura 5. Efectos de los derrames de hidrocarburos de petróleo en suelos²⁹.



Los efectos a la salud humana generados por el contacto con los distintos tipos de hidrocarburos presentes en el petróleo son diversos. Se ha demostrado que en corto tiempo de exposición puede perjudicar el sistema nervioso causando neuropatía periferal, dolores de cabeza y mareo cuando están presentes en altas concentraciones en el aire³⁰. También pueden producir efectos en el sistema inmune, efectos a la sangre, pulmones, piel y los ojos³¹. Su exposición crónica en animales presenta afectaciones en la reproducción y malformaciones en el feto³¹, además según investigaciones realizadas la exposición prolongada a los BTEX y HAP's, genera un mayor riesgo mutagénico y carcinogénico^{32,33}.

2. JUSTIFICACIÓN

Para evitar que la contaminación generada siga afectando a los ecosistemas y las poblaciones que viven en ellos, cada día se hace mayor la necesidad de buscar técnicas que ayuden a revertir la problemática ambiental que esto conlleva, de manera más económica y ambientalmente amigable.

La biorremediación es el proceso mediante el cual, por acción bioquímica de microorganismos, se pueden degradar, transformar o remover los compuestos tóxicos a productos menos tóxicos o inocuos. Esta técnica se utiliza generalmente para la rehabilitación de sitios con residuos y suelos contaminados con compuestos orgánicos semivolátiles³⁴. Existen varias técnicas de biorremediación que dependen esencialmente del organismo que realice el proceso de remediación, se puede encontrar así la fitorremediación, micorremediación, y finalmente biorremediación con bacterias y con microalgas.

En cuanto a la actividad de éstas últimas los estudios realizados arrojan resultados de gran interés. El petróleo, generalmente, inhibe la fotosíntesis y el crecimiento de las microalgas³⁵. Además las algas que han sido expuestas a productos derivados del petróleo muestran alteraciones en el contenido del material genético y proteínas³⁶. Sin embargo, contrario a todos estos antecedentes la adaptación de las microalgas a una contaminación constante de petróleo se ha visto evidenciada en la proliferación de cuatro especies de microalgas: *Symploca dubia*, *Chlamydomonas dinobryonis*, *Scenedesmus obtusus* y *Scenedesmus sp*, en el río Arroyo Minero en Argentina donde desde 1915 el río ha estado expuesto a continuos derrames de petróleo por filtraciones en el proceso de perforación para la explotación de este crudo³⁷.

Aunque las microalgas presenten algunos tipos de ventajas como su facilidad en encontrarse en sistemas marinos y en aguas dulces, además que son un eje central de las cadenas tróficas en el agua. Sin embargo, sólo hasta 1974 se presentan los primeros trabajos acerca de su capacidad para realizar degradación de petróleo³⁸. La biorremediación de estos hidrocarburos con dichos microorganismos ha sido un campo poco estudiado en comparación con los demás organismos capaces de realizar los procesos de biodegradación³⁹.

En uno de los primeros estudios realizados para la biotransformación de hidrocarburos aromáticos policíclicos mediante el tratamiento con microalgas⁴⁰, se encontró que el género *Selenastrum sp* es una de las pocas microalgas que es capaz de realizar la metabolización del benzo(a)pireno⁴¹. Esta cepa posee una ventaja con otras especies debido a su presencia en todas partes y la facilidad de su cultivo⁴², además se encontró que las células de *S. capricornutum* poseen una mayor capacidad para la degradación de HAP's que otras microalgas verdes, tales como *Chlorella*⁴³. Se reporta así como una de las especies capaces de remover y metabolizar diferentes tipos de HAP's^{42,44}.

Con base a todo lo anterior, se hace necesario un estudio que profundice más sobre el potencial degradador de la especie *Selenastrum capricornutum* en contaminantes como los hidrocarburos. La importancia de poder llevar a cabo éste proyecto radica en la futura incidencia que éste pueda tener al momento de evaluar las alternativas ambientales para cualquier proceso de biorremediación.

Si los resultados son óptimos en este estudio preliminar, podrán ser utilizados posteriormente como parte de un proyecto a mayor escala, en el que se entre a considerar todo el abanico de posibles variables de un macroproyecto a nivel industrial, que evalúe la relación costo-beneficio-eficiencia en pro de desarrollar cada día más alternativas amigables con el medio ambiente, y generar nuevos conocimientos en el área de la fitorremediación, esto último con el fin de establecer bases de datos más amplias de organismos, cuya función pueda ayudar a biorremediar espacios que han sido afectados por los derrames de hidrocarburos de petróleo.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar muestras de lixiviados de suelo contaminado con petróleo y determinar la capacidad de la microalga *Selenastrum capricornutum* para remover concentraciones crecientes de petróleo y disminuir su toxicidad.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.2.1 Cuantificar los hidrocarburos totales presentes en las muestras de lixiviado de suelo empleando como técnica analítica la cromatografía de gases (mediante el método de patrón externo) antes y después del tratamiento con *Selenastrum capricornutum*.
- 3.2.2 Determinar el porcentaje de remoción de hidrocarburos presentes en el lixiviado de suelo después del tratamiento con *Selenastrum capricornutum*.
- 3.2.3 Evaluar la toxicidad del lixiviado con los bioindicadores *Daphnia magna* y *Lactuca sativa*, antes, durante y después del tratamiento con *Selenastrum capricornutum*.

4. MARCO REFERENCIAL

4.1 MARCO TEÓRICO

4.1.1 ENSAYOS TOXICOLÓGICOS.

Los ecosistemas naturales poseen sus propios equilibrios biológicos, por esta razón cuanto un contaminante llega a un ambiente no se queda estático y entra a perturbar el equilibrio armónico de las dinámicas de las poblaciones que se encuentran en este^{45,46}.

La ecotoxicología es la ciencia que tiene como objetivo el estudio de la contaminación en los sistemas bióticos; origen, evolución y como afectan a los seres vivos que componen estos ecosistemas⁴⁷. Además, trata de responder de forma predictiva a la toxicidad de compuestos químicos, indicando los mecanismos de acción en los organismos vivos, desde la obtención de concentración-efecto y de concentración-respuesta⁴⁶. Los ensayos toxicológicos son usados como potenciales evaluadores de los peligros ambientales y riesgos de un contaminante que impacta el ambiente⁴⁸.

La toxicidad evaluada en estos ensayos es sencillamente el resultado de las interacciones entre el tóxico a evaluar y el sistema biológico⁸. Los efectos que generalmente se evalúan son de mortalidad, crecimiento, multiplicación, o los cambios fisiológicos, histológicos o morfológicos que se puedan presentar en el organismo bioindicador⁸.

El organismo que se usará como indicador, el tiempo el tiempo de exposición y las diferentes concentraciones de tóxico que se usarán dependerán de las características que posea la sustancia tóxica a evaluar. Según el tiempo de exposición existen distintos tipos de ensayos toxicológicos. Los ensayos de toxicidad aguda se desarrollan en un intervalo de tiempo comprendido entre horas a unos pocos días, y brinda información sobre el posible riesgo que conlleva una exposición corta con el tóxico⁴⁹. Por otro lado, los ensayos de toxicidad crónica buscan evaluar los efectos que puede generar la exposición repetida y prolongada que pueda generar la sustancia que se estudia, su tiempo de estudio varía de días a entre 6 y 12 meses⁴⁹.

Aspectos generales y ensayos toxicológicos con el microcrustáceo *Daphnia magna*.

La especie *Daphnia magna* es un microcrustáceo planctónico perteneciente a la clase Branchiopoda⁵⁰, suborden Cladocera⁵⁰, que está caracterizada por estar rodeado por un caparazón, hecho de quitina (Figura 6). La longitud del cuerpo de esta Cladocera se encuentra en un rango desde menos de 0,5 mm cuando son neonatos a llegar a un poco más de 6 mm en su etapa de adultez⁵⁰. Habitan en la mayoría de tipos de agua dulce a excepción de los hábitats extremos, como las

aguas termales. Se reproducen de forma asexual por partenogénesis y una hembra adulta puede producir una nidada de huevos cada 3 a 4 días hasta su muerte⁵⁰.

Figura 6. Fotografía del cladócero *Daphnia magna* en etapa adulta⁵¹



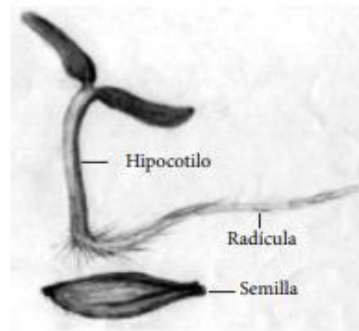
El uso de este cladócero en pruebas toxicológicas es uno de los bioensayos acuáticos más utilizados a nivel mundial debido a la sensibilidad que posee frente a numerosos compuestos químicos^{52,53}, hasta ser comúnmente usado en protocolos estandarizados por entidades reguladoras de reconocimiento internacional⁵⁴. Concretamente los ensayos para agua dulce con este organismo pueden determinar el potencial letal de los compuestos tóxicos en aguas residuales, potables, subterráneas, superficiales, sedimentarias, lixiviados, entre otras⁷. Posee un gran número de estudios de toxicidad, que comprueba su sensibilidad a muchos tipos de contaminantes, estos estudios van desde síntesis inorgánicas^{55,56}, tratamientos orgánicos para disminuir la toxicidad de nanopartículas de plata⁵⁷, toxicidad de nanotubos de carbón⁵⁸, ensayos farmacéuticos^{59,60}, hasta su uso en estudios de daño agudo por 7 tipos de petróleo crudo⁶¹.

El ensayo de toxicidad agudo se basa en la exposición de neonatos (>24 horas de nacidos), por un periodo máximo de 48 horas, al contaminante. Una vez terminado este lapso de tiempo se lleva a cabo la cuantificación de microorganismos muertos. Esto sirve para establecer el porcentaje de mortalidad producida por la sustancia a estudiar⁷

Aspectos generales y ensayos toxicológicos de la planta terrestre *Lactuca sativa*.

La *Lactuca sativa* o lechuga es una planta herbácea proxista de raíz axonomorfa, de rápida germinación⁶² (Figura 7). Durante la etapa de germinación y desarrollo de la planta suceden varios procesos fisiológicos en los que la influencia de un agente tóxico externo podría interferir alterando el desarrollo total de la planta⁸

Figura 7. Morfología de la planta de lechuga⁸.



El bioensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa L*) se desarrolla en un lapso de 120 h de exposición, en el que se evalúa los efectos tóxicos del contaminante a evaluar en el proceso de germinación de la semilla y desarrollo de las plántulas en los primeros días de crecimiento. Como resultados de esta prueba se puede evaluar la inhibición en la germinación y la inhibición en la elongación de la radícula y del hipocótilo.^{8,7}

Estos bioensayos se aplican generalmente a matrices de suelo y agua, ya que la semilla se irriga con el líquido que presenta los agentes contaminantes, se puede encontrar así como indicador toxicológico de distintos estudios que van desde plaguicidas en suelos⁶³, biosólidos⁶⁴, aguas residuales^{65,64}, metales^{65,66,67}, y derrames de petróleo^{68,69}.

4.1.2 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS DE PETRÓLEO

La determinación de la concentración de aquellas sustancias contaminantes juega un papel importante en los efectos que estos tengan sobre el entorno, así un compuesto químico puede ser inofensivo, afectar el desarrollo de las poblaciones, o ser potencialmente letal, según su concentración.

El análisis de muestras asociadas a contaminaciones de hidrocarburos en matrices ambientales es de gran importancia ya que puede revelar las consecuencias generadas de un derramamiento de petróleo, una infiltración crónica originada por una refinera, entre otros.

Se han descrito varios métodos⁷⁰ acerca de cómo calcular estos hidrocarburos:

- Gravimétricos (extractables no volátiles)
- Absorción de rayos ultravioleta (poliolefinas conjugadas, compuestos aromáticos)
- Fluorescencia de rayos ultravioleta (compuestos no saturados, compuestos aromáticos, etc., según la excitación, la emisión, la extracción y la volatilidad)
- Espectroscopía Infrarroja (IR) con frecuencia de estiramiento de los grupos CH₂-, 2930 cm⁻¹
- Cromatografía en fase gaseosa utilizando: columnas de relleno (hidrocarburos totales, alcanos normales específicos, relaciones parafina normal/isoprenoides), columnas de capilares de sílice (fundida alcanos normales específicos e hidrocarburos aromáticos policíclicos después de su separación previa sobre sílice o sílice cubierta con alúmina o alúmina solamente),
- Cromatografía en fase gaseosa acoplada a un tipo de detector (Detector de Ionización de Llama (FID) / Espectrometría de masas (MS)).

La cromatografía de gases es una de las técnicas más usadas, para análisis de hidrocarburos, ya que presenta algunas ventajas en comparación a otras técnicas. La alta sensibilidad, elevada eficiencia en la separación, detección selectiva, y pequeño tamaño de muestra para efectuar el análisis, la hacen unas de las técnicas preferidas para compuestos orgánicos volátiles.

En la cromatografía de gases los componentes vaporizados de una muestra se separan como consecuencia de su repartición entre una fase gaseosa y una fase estacionaria contenida en una columna⁷¹. Al efectuar una separación de gases, se inyecta en la cabeza de la columna. La elución se lleva a cabo mediante el flujo de una fase móvil de gas inerte⁷¹. En el análisis de hidrocarburos totales y alifáticos juega un papel fundamental, especialmente cuando se requiere controlar estos analitos en matrices acuosas.

Por lo general, la cromatografía de gases acoplada a espectrómetro de masas (GC-MS), es una de las técnicas más usadas, debido a su capacidad de separación de gran alcance y rendimiento de detección altamente sensible⁷². En donde la intención del acoplamiento es utilizar al espectrómetro de masas como detector en donde la muestra que pasa por la salida de las columnas capilares del cromatógrafo puede introducirse en las cámaras de ionización del espectrómetro⁷¹. Al llegar al detector, el analito es bombardeado por electrones, fragmentando la molécula, rompiendo enlaces y formando fragmentos más estables⁷³.

Estandarización y evaluación del método

Los procesos de estandarización de un método analítico tienen por objetivo verificar mediante análisis estadísticos, que la obtención de resultados por parte de este método sea preciso, reproducible y exacto, con un alto grado de seguridad y confiabilidad en los datos.

- Curva de Calibración.

Es una representación gráfica que se mide en función de la concentración de un analito, dentro de un determinado intervalo de trabajo. La calibración mide la capacidad de un método analítico para obtener resultados y se basa en un modelo de línea recta que consiste en una serie de “n” puntos experimentales, donde cada punto se encuentra definido por una variable “x” (variable independiente, generalmente concentración del analito de interés) y una variable “y” (variable dependiente, generalmente respuesta instrumental)⁷⁴. La recta de esta curva se encuentra definida mediante la ecuación $y = mx + b$ donde m es la pendiente de la recta y una ordenada al origen (b) ⁷⁴.

4.2 MARCO DE ANTECEDENTES

4.2.1 REMOCIÓN DE PETRÓLEO EN SUELOS

Los estudios en cuanto a remediación de petróleo en matrices ambientales como el suelo o los medios acuáticos son muy variados y se encuentran distintos organismos como agentes biorremediadores.

Se han estudiado así el uso de procesos de compostaje, que es la adición de texturizantes como el bagazo de caña, que sirven como enmienda nutricional para estos suelos. Se busca entonces la remoción de HTP y de HAP's. Se reporta el uso del bagazo de caña en dos estudios distintos para evaluar la efectividad de la remoción de este desecho agroindustrial. El primer estudio arrojó un porcentaje de remoción de 30% de HTP en un suelo que contenía 2% de bagazo de caña⁷⁵. En un segundo estudio se comparó la eficiencia de remoción tanto de HTP y HAP's para cachaza y bagazo de caña de azúcar, en donde se encontró una remoción de HTP de 51% y 60% respectivamente. La remoción de HAP's fue menor encontrando así un porcentaje de remoción para la cachaza de 43%, mientras que el bagazo de caña tuvo un porcentaje de 41%⁷⁶.

Actualmente, la biorremediación bacteriana es una de las áreas mayormente estudiadas ya que numerosos géneros de bacterias han sido reportados como degradadores de HAPs de bajo peso molecular, y unos cuantos géneros como *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter* o *Nocardia*, han sido reportados como capaces de degradar HAP's de alto peso molecular⁷⁷.

El uso de cepas de hongos para llevar el proceso de biorremediación, denominada micorremediación, es una de las áreas que se presentan como una alternativa de gran potencial debido a la facilidad que los hongos tienen para bioacumular los hidrocarburos y utilizarlos para su crecimiento mediante metabolismo⁷⁸. Aunque no está tan estudiada como la biorremediación bacteriana por ser menos eficiente, las bacterias presentan una dificultad para degradar hidrocarburos aromáticos de 4 o más anillos bencénicos⁷⁷. Se ha demostrado que varias especies fúngicas como *Cunninghamella elegans*, ascomicetos como *Aspergillus niger* y *Penicillium sp.*, y

los basidiomicetos de podredumbre blanca *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus* y *Lentinus tigrinus* pueden metabolizar HAPs⁷⁷. Generalmente los hongos crean asociaciones con otros organismos para la remoción, así como una capa vegetal texturizante. La influencia de la microbiota nativa en los procesos de remoción con hongos juega un papel importante en el desarrollo de los tratamientos micorremediadores. Una comparación entre la bioaumentación con respecto a la bioestimulación demuestra que las asociaciones de la microbiota nativa con las cepas de hongos son altamente efectivas; en un estudio se demostró que mientras los suelos bioaumentados removieron hasta un 69% de HTP, en un suelo bioestimulado sólo obtuvo un porcentaje de 28%⁷⁹. Otro estudio llevado a cabo con suspensiones de esporas de *Aspergillus niger*, *Penicillium glabrum*, y *Cladosporium cladosporioides* concuerda con la importancia de la interacción hongo-poblaciones microbianas nativas donde un suelo con tratamiento no estéril presentó una remoción de HTP de 78% comparado con un suelo estéril de 62%⁸⁰.

En el área de la fitorremediación también existen algunos estudios que destacan a este proceso como un área en potencia, generalmente asociada, como la micorremediación, con la microbiota presente en el suelo. Esto se puede evidenciar en un estudio presentado en el 2015 en donde se comparan diferentes métodos de remediación como atenuación natural, fitorremediación con alfalfa (*Medicago sativa* L.), bioaumentación con *Pseudomonas aeruginosa* y bioaumentación en conjunto con la fitorremediación, para descontaminar suelos contaminados con aceite que presenta metales (Cu, Pb and Zn) y una fracción elevada de hidrocarburos de petróleo. Los porcentajes obtenidos para la degradación de los hidrocarburos fueron bioaumentación en conjunto con la fitorremediación (68%), seguido por bioaumentación (59%), fitorremediación (47%) y finalmente la atenuación natural⁸¹

4.2.2 USOS DE LAS USOS DE LAS MICROALGAS EN TRATAMIENTOS DE REMOCIÓN

Se ha observado el uso frecuente de las microalgas en los tratamientos de efluentes de aguas residuales como una alternativa de tratamiento terciario⁸², también llamada ficorremediación, desde mediados del siglo pasado, donde se concluyó que éstas aprovechaban los nutrientes inorgánicos para su crecimiento⁸³. En la actualidad se ha evaluado un efecto positivo de estas, acopladas con bacterias, para la remoción de materia orgánica⁸², nutrientes como el nitrógeno y fósforo⁸⁴, metales pesados⁸⁵, y a la reducción de demanda química de oxígeno (DQO), demanda biológica de oxígeno (DBO) y sólidos suspendidos totales (SST)^{86,87}.

Otros estudios demuestran la capacidad de degradar diversos compuestos orgánicos incluyendo plaguicidas organoclorados como el lindano en un medio acuático⁸⁸ o la remoción de metales pesados como cadmio en un medio natural impactado con este contaminante⁸⁹.

También se reportan estudios recientes de remoción de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) por parte de la microalga, que son el componente bencénico de los hidrocarburos presentes en el petróleo, generalmente después de los procesos de refinamiento de este.

En un primer caso, se presentan la eliminación y degradación de una mezcla de HAP's compuesta por fenantreno (PHE), fluoranteno (FLA), y pireno (PYR), por acción de la *Selenastrum capricornutum*, a diferentes densidades celulares iniciales⁴². Se encontró entonces la eficacia de la remoción de HAP's por parte de la microalga, donde se obtuvo un porcentaje de remoción de 96% de PHE, 100% de FLA, y 100% de PYR a densidad celular de 1×10^7 células / mL en 4 días, mientras que menos del 50% de HAP se eliminaron a la densidad celular más baja (5×10^4 células / mL) en 7 días.

También la remoción de una mezcla de HAP's compuesta por fluoreno (FLU), fenantreno (PHE), fluoranteno (FLA), pireno (PYR) y benzo[a]pireno (BaP), mediante la acción de la microalga *Selenastrum capricornutum* con exposición a diferentes metales⁴⁴, donde la presencia de estos influyó significativamente. Los HAP de bajo peso molecular presentaron un efecto significativo y positivo en su eliminación, con un máximo de 99 % de FLU y el 89 % de PHE⁴⁴. Para HAPs de alto peso molecular (FLA, PYR, BAP) la presencia de metales no afectó a la eficacia de eliminación⁴⁴.

Estudios más recientes llevados a cabo en la Universidad Autónoma Nacional de México muestran la comparación en efectividad de tratamientos de remoción del Benzo[a]pireno (BaP) y Benzo[a]antraceno con esta microalga en estado libre o con la inmovilización en medio de alginato en forma de perlas⁹⁰⁻⁹². Estos mostraron que con la implementación de métodos de inmovilización de microalgas se remueve un 80% de BaA Y BaP 70% en medio líquido y en la biomasa⁹¹, mientras que al ser comparado con la remoción de estos mismos compuestos con microalgas en estado libre que removi6 75% y 80% de BaA y BaP⁹², respectivamente, sin embargo, las exposiciones de las microalgas libres fueron de menor tiempo que las inm6viles. En este trabajo tambi6n se evalu6 la capacidad de degradaci6n con otros compuestos arom6ticos m6s complejos como el Benzo[k]fluoranteno y Benzo[b]fluoranteno⁹².

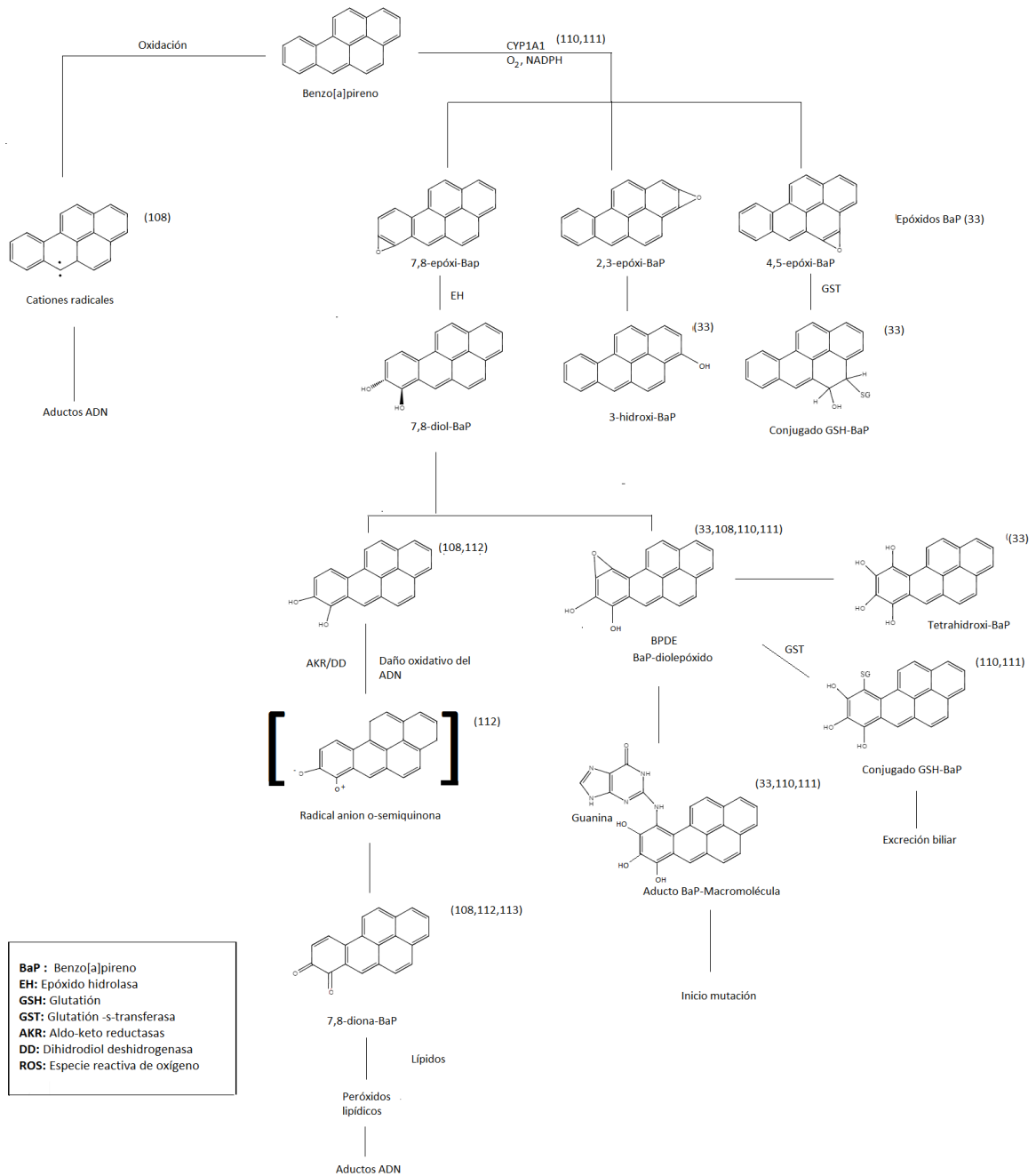
4.2.3 DEGRADACI6N DE HIDROCARBUROS AROM6TICOS POLIC6CLICOS

Existen varias formas de remoci6n de un contaminante por microorganismos; entre las cuales se encuentran adsorci6n (biosorci6n), absorci6n (bioacumulaci6n) y degradaci6n (biodegradaci6n o biotransformaci6n)⁴². En las primeras dos, mediante procesos fisicoqu6micos, los contaminantes se adhieren a las c6lulas, ayudando a concentrar los contaminantes de la fuente de contaminaci6n, mientras que la 6ltima provee canales para romper las mol6culas, en donde son transformados en otras formas qu6micas mediante actividades enzim6ticas dentro de las c6lulas⁴².

4.2.3.1 Biodegradación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en el Ser Humano

El ser humano es capaz de biodegradar los HAPs, estos compuestos que provienen de la combustión incompleta de la materia orgánica y que se han reportado son cancerígenos y mutagénicos. Pueden ser metabolizados por el organismo, cuando entran en contacto con este. Un ejemplo de esto es el Benzo[a]pireno, que es metabolizado por el sistema de enzimas del citocromo P450 (CYP) mediante reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis formando compuestos hidroxilados, fenoles o dihidrioles, para luego ser convertidos por otras enzimas que catalizan reacciones de conjugación en sulfotransferasa, epóxido hidrolasa, glutathion-S-transferasa y UDP-glicotransferasa para así facilitar su excreción por medio de la orina^{93,94}. Sin embargo, en ocasiones ciertos intermediarios se unen covalentemente a proteínas y ADN formando aductos que son tóxicos⁹³. El esquema de la metabolización descrita por varios autores se encuentra en la figura 8.

Figura 8. Representación esquemática de la metabolización del BaP en el ser humano^{33,93,95-98}



4.2.3.2 Biodegradación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos por parte de la microalga *Selenastrum capricornutum*.

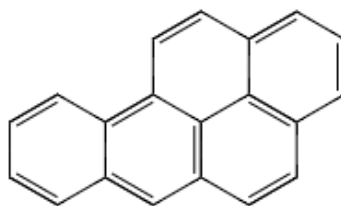
De acuerdo con las investigaciones realizadas la velocidad inicial de la reacción de degradación dependerá del tipo de HAP, y se será proporcional a la solubilidad en el agua del hidrocarburo⁹². La velocidad de degradación también varía a través del tiempo. Se ha podido concluir que, debido a la baja solubilidad en agua de los compuestos aromáticos policíclicos, durante las primeras horas, una parte de los compuestos se encuentran en la disolución y serán propensos al metabolismo, mientras que la otra gran parte se encuentra en la fase no-acuosa en el sistema, ya sean las paredes del matraz o adsorbidos sobre la biomasa, y deben ser disueltos para poder metabolizarse.

Por esto se propone una ecuación de equilibrio⁹² donde al metabolizarse los HAPS en disolución, el equilibrio se desplaza hacia la derecha, disolviéndose aquellos HAPS en el medio no-acuoso. La disolución de estos y la solubilidad será el factor limitante en la velocidad de degradación⁹².

La mayoría de productos resultantes de la metabolización de los HAPs resultan ser más polares que sus compuestos iniciales debido a la presencia de grupos OH, esto genera que estos productos se encuentren biodisponibles para otro tipo de organismos debido al aumento de la solubilidad en un medio acuoso. Sin embargo, se necesita un constante seguimiento, ya que se ha observado que, si bien ciertos metabolitos no afectan al organismo, otros en distintos tiempos del proceso de biodegradación resultan ser más tóxicos que el compuesto original.

Existen algunos estudios sobre la degradación de HAPS con la caracterización de los metabolitos resultantes de la degradación. En mayor parte son estudios de benzo[a]pireno, compuesto aromático policíclico de 5 anillos bencénicos, de fórmula $C_{20}H_{12}$ (Figura 9)

Figura 9. Estructura molecular del Benzo[a]pireno (BaP)



Fuente: Autor

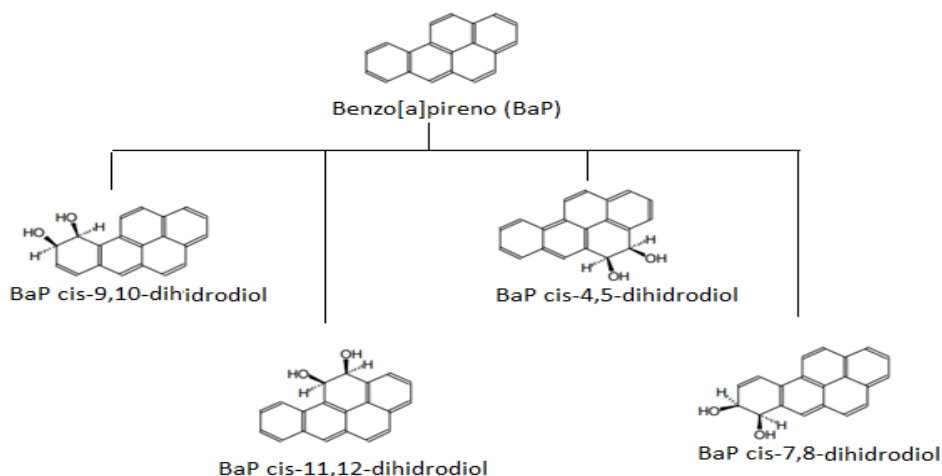
En un primer estudio se encuentra que el Benzo[a]pireno es metabolizado en cis-hidrodiol y quinonas en un periodo de 6 días por la microalga *Selenastrum capricornutum* produciendo 11,12-dihidrodiol (luz amarilla) y 9-10 dihidrodiol con luz blanca⁹⁹.

Otro estudio también reporta la remoción del BaP en un 99% a las 15 horas de exposición con formación de tres metabolitos (4,5-dihidrodiol-BaP; 7,8-dihidrodiol-BaP; y 9,10-dihidrodiol-BaP). También concluyeron que la formación de metabolitos por la *S. capricornutum* es rápida con respecto a otra microalga estudiada¹⁰⁰

En otro estudio se encontraron porcentajes de remoción de 80% en BaP, las microalgas se encontraban en estado libre. Se determinaron como metabolitos de la biodegradación del BaP el 4,5-dihidrodiol (82ng), 7,8-dihidrodiol (19ng) y 9,10-dihidrodiol (75ng), los dos primeros metabolitos se reportaron con tiempos de 45 min de exposición de la microalga al BaP, mientras que el último metabolito se reportó en tiempos mayores a 24 hrs, también se evaluó la biodegradación del Benzo[a]antraceno, compuesto aromático policíclico de 4 anillos bencénicos, donde se obtuvo un porcentaje de remoción del 75%, y cuyos metabolitos reportados fueron el 5,6-dihidrodiol (309 ng), 8,9-dihidrodiol (200 ng), y 10,11-dihidrodiol (960 ng). Se observa que la formación de metabolitos BaA es más rápida y en mayores cantidades de los de BaP¹⁰¹

Los resultados de los estudios anteriores con el BaP reportan la formación de metabolitos dihidroles (Figura 10), lo cual indica que la microalga metaboliza estos compuestos por la vía de la enzima dioxigenasa¹⁰², que transfieren al sustrato los dos átomos del oxígeno molecular.

Figura 10. Representación esquemática de los productos de la metabolización del Benzo[a]pireno por la microalga *Selenastrum capricornutum*¹⁰².



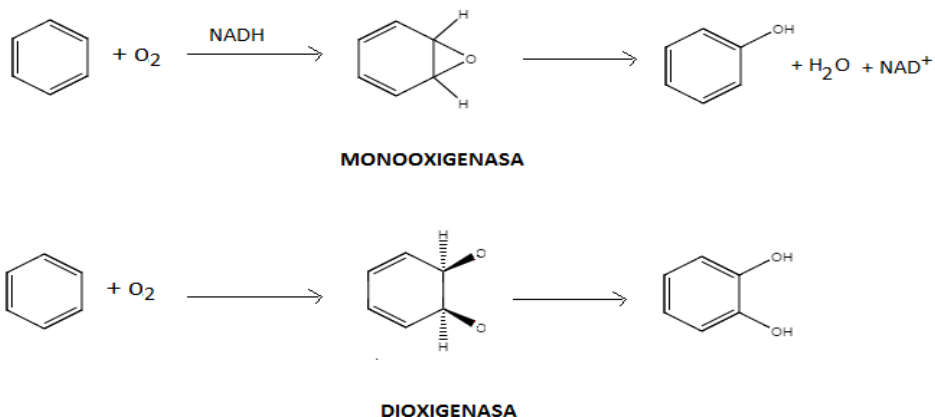
Como se mencionó anteriormente, los procesos de degradación de HAPs con bacterias y hongos son más estudiados que los de la microalga. En estos estudios al menos dos mecanismos han sido reportados en la biodegradación de HAPS: el primero utilizando enzimas extracelulares del catabolismo de la lignina¹⁰³ y el otro el sistema citocromo P-450¹⁰⁴ en el cual se encuentran las enzimas oxigenasas, en las bacterias las enzimas dioxigenasas incorporan oxígeno molecular a los HAP para formar cis-dihidrodiolos¹⁰³, mientras que, en los hongos, se encontró que las

enzimas monoxigenasas atacan los HAPS produciendo trans-dihidrodiolios o hidroxilados^{103,105}.

Según los resultados de lo reportado para la metabolización de la *Selenastrum capricornutum* presentados anteriormente y comparados con los estudios de cepas fúngicas y bacterianas, se podría concluir que la vía de metabolización sería de la enzima dioxigenasa. Sin embargo, en un estudio para la remoción de fenantreno (PHE), fluoranteno (FLA), y pireno (PYR), se determinaron como metabolitos caracterizados de la degradación el 2-,3-, y 9- hidroxifenantrenos, y se propone otro metabolito el 1-hidroxifenantreno. En este estudio también se encontraron otros metabolitos como dihidrodiolios, mono-di- y tri-hidroxilados derivados de HAPS, pero sin embargo estos no pudieron ser caracterizados¹⁰⁶. De acuerdo a todo lo anterior, esto podría sugerir que la microalga *S. Capricornutum* emplea diferentes sistemas enzimáticos para metabolizar diferentes tipos de HAPS.

Las enzimas oxigenasas como la monoxigenasa y la dioxigenasa, catalizan la oxidación del sustrato mediante la incorporación de oxígeno (Figura 11). Las primeras catalizan la transferencia de uno sólo de los átomos del O₂ como grupo hidroxilo, mientras que el otro oxígeno es reducido a H₂O¹⁰⁷. Por otro lado, las dioxigenasas catalizan la incorporación en la molécula de ambos átomos del O₂¹⁰⁷. En ambos casos utilizando NADH O NADPH como donador de electrones.

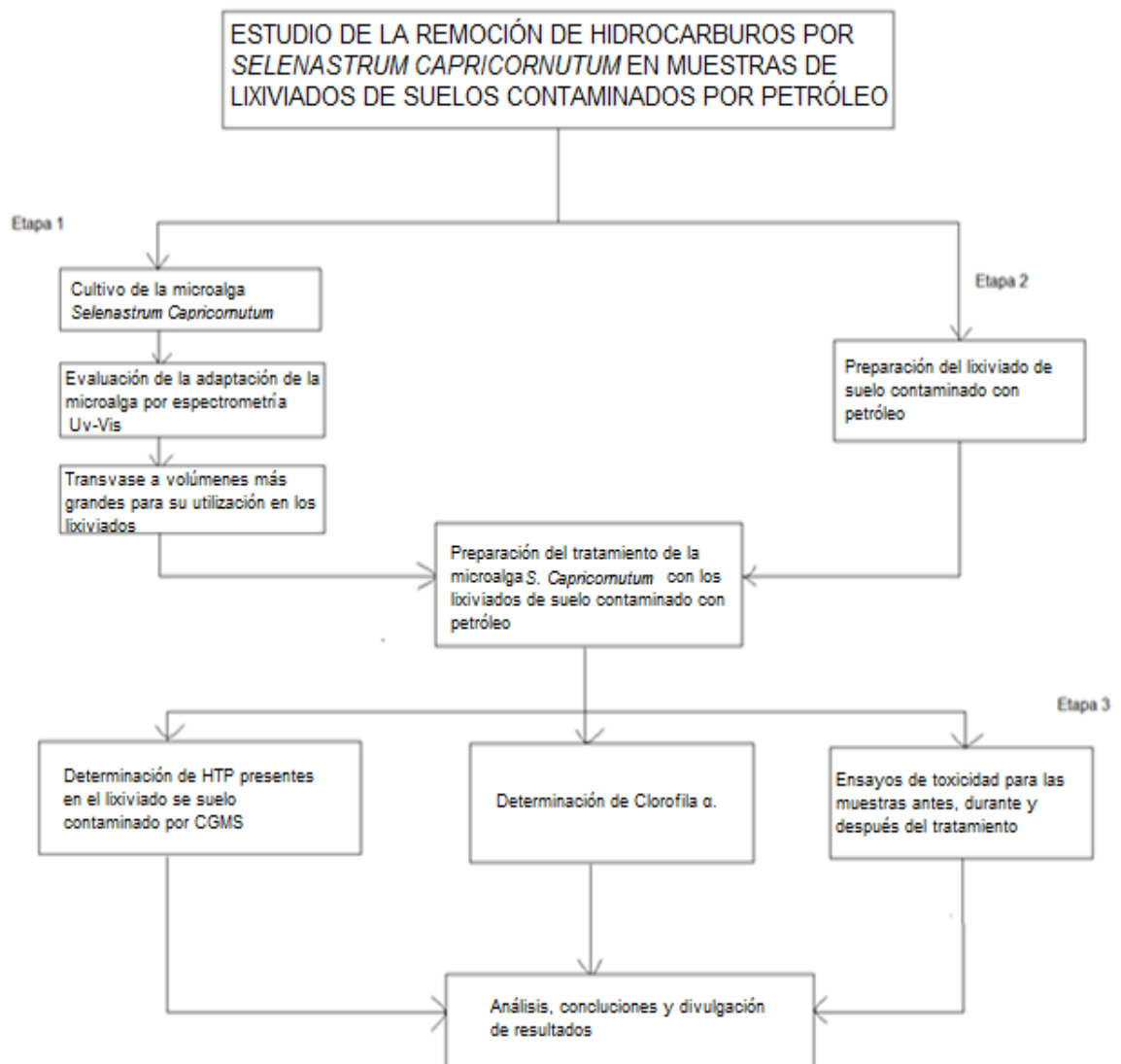
Figura 11. Esquema de la acción de las enzimas oxigenasas^{42,107}.



5. METODOLOGÍA

En la Figura 12 se encuentra el diagrama del desarrollo del trabajo experimental llevado a cabo en esta investigación. Este proyecto fue realizado en el Laboratorio de Toxicología de la Universidad Católica de la Santísima Concepción, en la ciudad de Concepción, Chile.

Figura 12. Metodología planteada para el desarrollo del proyecto



Fuente: Autor

Etapa 1. Cultivo y adaptación de la microalga *Selenastrum capricornutum*

5.1 Cultivo de la microalga *Selenastrum capricornutum*

Se realizó un cultivo puro de la microalga *S. capricornutum* cuya cepa se obtuvo de los cultivos madre del Laboratorio de toxicología de la Universidad Católica de la Santísima Concepción. En la Figura 13 se observan los cultivos, estos se llevaron a cabo siguiendo el procedimiento de USEPA (1993), en donde cada una de las sales fue disuelta en 0,5 L de agua mili Q esterilizada a 121°C por 30 min en el equipo de autoclave Tempra, modelo TMQ CV 3870. Las microalgas se incubaron en matraces Erlenmeyer de 1L a $23 \pm 2^\circ\text{C}$ bajo luz blanca en un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad.

Para el cultivo de *S. capricornutum* en el medio EPA, se inoculó una concentración de microalgas preexistentes y conocidas ($4,75 \times 10^4$ células $^{-1}$) dando así inicio al conteo diario en la curva de crecimiento.

Figura 13. Cultivos de la microalga *S. capricornutum* en los laboratorios de toxicología de la UCSC



Fuente: Autor

5.2 Adaptación de la microalga y selección de la concentración de petróleo

En tubos de ensayo se añadieron 10 mL de la microalga *Selenastrum capricornutum* con 1, 2, 4, 6 y 8 mL de petróleo crudo en cada uno, por triplicado, para poder evaluar la reacción de la microalga ante volúmenes crecientes de petróleo. Se midió la absorbancia con el espectrofotómetro Uv-vis a 680 nm durante 5 días para evaluar el crecimiento de la biomasa de la microalga en cada concentración de petróleo. Después se transvasaron los tubos de ensayo a Erlenmeyers de 250 mL tratando de mantener la misma proporción de la relación entre microalga-petróleo. Estos se dejaron en un agitador orbital con agitación constante hasta ser utilizados en las muestras de lixiviado del suelo contaminado con petróleo.

Etapa 2. Tratamiento de la microalga con el lixiviado de suelo y cuantificación por cromatografía gaseosa.

5.3 Preparación de lixiviado de suelo

El suelo usado en la preparación fue tierra de hoja desinfectada marca Anasac. Este producto se caracteriza por desarrollarse a partir de la compostación de hojas y residuos orgánicos, lo cual hace que posea un gran contenido de materia orgánica y una alta densidad. Las características del producto se encuentran en la Tabla 1.

Tabla 1. Características de la Tierra de Hojas marca Anasac.

Características del producto	
pH	5,0 – 8,5
Conductividad eléctrica (dS/m)	< 3
Materia orgánica (%)	>20
Humedad (%)	30 – 45
Densidad aparente (kg/L)	0,4 – 0,7
Relación C/N	<50
Materia Inerte (%)	0-5

Fuente: Anasac

Por otro lado, la muestra de petróleo utilizada para la adaptación de la microalga y la preparación de los lixiviados fue obtenida de la refinería de la Empresa Nacional de Petróleo (ENAP), ubicada en la comuna de Hualpén, Chile. El tipo de crudo es BRM, que quiere decir que proviene de la planta de procesamiento Batería Recepción Magallanes. En el país, ENAP realiza actividades de exploración y producción de yacimientos de hidrocarburos, en la Región de Magallanes, en el área del continente, isla Tierra del Fuego y costa afuera en el Estrecho de Magallanes. En la Tabla 2 se presentan algunas características del petróleo crudo utilizado, realizada por el Laboratorio de Cromatografía de la refinería de ENAP-Hualpén. Los Realizados bajo las normas ASTM D-2892 y ASTM D-5236.

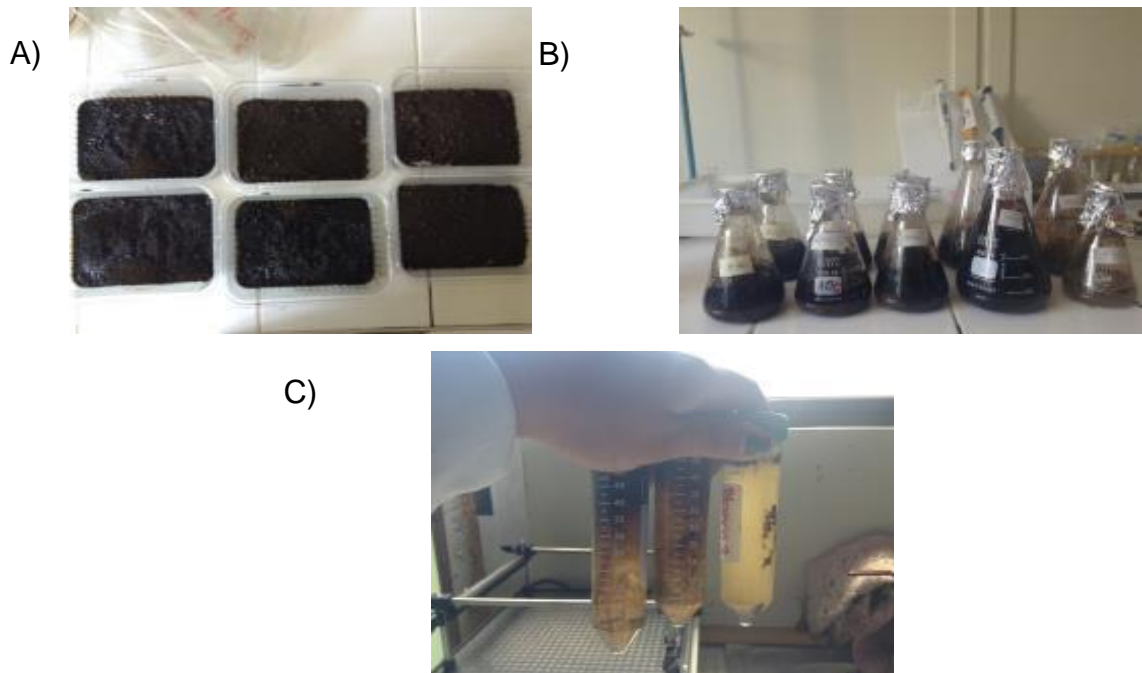
Tabla 2. Características del petróleo crudo procedente de la refinería ENAP.

CRUDO:		BRM	
		22/04/2015	
API CRUDO	18,8 (Crudo pesado)	Densidad	0,9402 (g/mL)
Azufre:	1,53 %m/m	Visc 50°	82,3

Fuente: Laboratorio de Cromatografía – ENAP

Para la preparación de los lixiviados se tomaron 150 g de suelo, al cual se le adicionaron volúmenes de 25, 50, 75 y 100 mL de petróleo crudo en cajas plásticas, cada muestra con concentración de petróleo se hizo por triplicado. También se realizó un blanco de muestra de suelo sin petróleo. En la Figura 14 se observa la preparación de los lixiviados donde primero se tienen las bandejas de suelo con petróleo, primero se observan las bandejas a las cuales se le adicionaron 150 mL de agua destilada esterilizada, con el objetivo de mezclar los componentes. Cada bandeja fue puesta en un agitador, el cual operó a 2500 rpm por un período de 2 h. Transcurrido el tiempo de ejecución del agitador, las bandejas se dejaron en reposo a temperatura ambiente por un tiempo de 24 horas. Finalmente, el contenido de cada bandeja se vertió en un embudo de decantación independiente, de donde se extrajo la fase líquida de la solución (lixiviado)⁷.

Figura 14. Preparación de los lixiviados de suelo contaminado con volúmenes crecientes de petróleo. A) Bandejas con la mezcla suelo-petróleo. B) Lixiviados obtenidos después de las 24 horas. C) Lixiviados después del proceso de decantación



Fuente: Autor

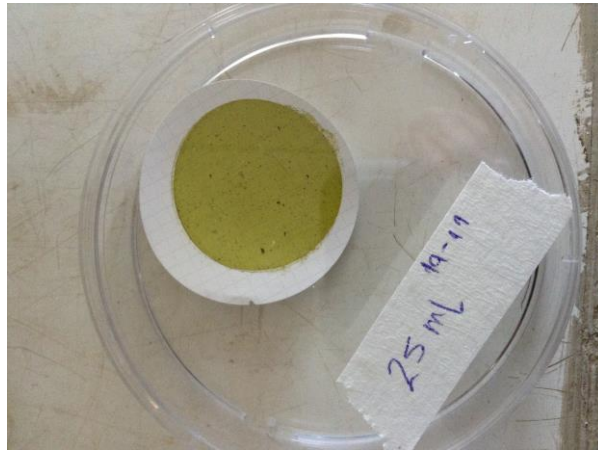
5.4 Preparación del tratamiento en los lixiviados de suelos.

En Erlenmeyers de 250mL se depositaron los lixiviados de suelo contaminado con petróleo, después se agregó un volumen de 50 mL de microalga *Selenastrum capricornutum* para iniciar el tratamiento, evaluando el comportamiento de la microalga con los lixiviados antes, durante (5 días), y al finalizar el tratamiento (10 días).

5.5 Determinación de la clorofila α en las muestras de lixiviados de suelo contaminado con petróleo

La determinación de la clorofila α se llevó a cabo como prueba de control, ya que con ella se puede realizar una estimación de la biomasa de microalga presente en la muestra¹⁰⁸, esto se puede relacionar con el crecimiento algal a partir de la exposición con los hidrocarburos. Para esta determinación, se filtraron las muestras de lixiviado en contacto con la microalga a los 5 y 10 días utilizando membranas Millipore (poros de 0,45 μm) con agua destilada (Figura 15).

Figura 15. Filtrado de la muestra de 25mL para determinación de Clorofila α .



Fuente: Autor

Después de la filtración se colocó el filtro en un tubo para centrifugado agregando 5mL de acetona y macerando la muestra. Se cubrió el tubo con papel aluminio y se dejó en refrigeración por 20 horas. Al cabo de este tiempo se agregaron 10 mL más de acetona y se centrifugó a 2500 rpm durante 20 minutos. Luego se midió las absorbancias de las muestras a 647, 664 y 750 nm.

5.6 Determinación de hidrocarburos totales presentes en el lixiviado de suelo por cromatografía de gases

5.6.1 Extracción de Hidrocarburos presentes en las muestras de lixiviados

La preparación de las muestras para la cuantificación por cromatografía se realizó con base en el método EPA 8015M, que propone una extracción líquido-líquido para hidrocarburos de petróleo utilizando como solvente diclorometano y posterior limpieza con sílica gel o sulfato de sodio anhidro.

Se vertieron 30 mL de lixiviado obtenido antes y después de emplear el tratamiento con la microalga *Selenastrum capricornutum* en un embudo de decantación al cual se le adicionaron 30 mL de diclorometano. Se agitaron constantemente y se dejaron reposar hasta la separación de las dos fases. Posteriormente se procedió a filtrar en un embudo con papel cualitativo Whatman de 90 mm de diámetro, al cual se le

adicionó sulfato de sodio anhidro para absorber agua presente en la solución. El volumen del líquido obtenido se guardó en frascos rotulados y se mantuvo refrigerado para su posterior análisis (Figura 16).

Figura 16. Muestras extraídas de los lixiviados de suelo contaminado con petróleo



Fuente: Autor

5.6.2 Porcentaje de recuperación del método de extracción líquido-líquido con diclorometano

El porcentaje de recuperación se entiende como la medida que se obtiene al evaluar un analito de concentración conocida adicionando a la muestra, que es cuantificado por el método de ensayo⁷¹. Una vez se evaluaron las condiciones iniciales del lixiviado, se adicionaron 2ppm del patrón de C13, C32, pristano y fitano a 30 mL, y finalmente se calcula el porcentaje utilizando la ecuación 1.

Ecuación 1. Determinación del porcentaje de recuperación

$$\%R = ((CF-CU) / CA) * 100$$

Donde se tiene que:

- CA = Concentración conocida adicionada a la muestra
- CF = Concentración del analito medida en la muestra fortificada.
- CU = Concentración de analito medida en la muestra sin fortificar o blanco.⁷¹

5.6.3 Condiciones cromatográficas

Al Laboratorio de Análisis Cromatográfico de la Universidad Católica de la Santísima Concepción se llevaron los frascos con las muestras refrigeradas y se traspasaron a un balón de 50 mL, para luego concentrar la muestra en un rotavapor hasta 1 mL. Los extractos obtenidos se analizaron empleando un equipo de cromatografía de gases acoplado a un detector selectivo de masas (CG-EM, Shimadzu, Modelo QP5050A con automuestreador AOC-5000), operado bajo las siguientes condiciones:

- 1 μ L de inyección, 1 mL gas portador Helio extra puro.
- Columna: Agilent HP-5 (5% *Phenyl*)-*methylpolysiloxane* de 30mx0,25mmx0,25 μ m
- Programación de las temperaturas: 60°C hasta los 310°C, aumentando 13°C por minuto y se mantuvieron por 20 min.
- Temperatura inyector: 300°C.
- Detector selectivo de masas: línea de transferencia: 320°C. Los datos se adquieren modo SCAN con el sistema de datos GCMSsolution de Shimadzu versión 1.02 desde la masa 50 hasta 500 m z-1, ionización por impacto electrónico a 70 electrón-volt (EI 70eV)
- Total de la corrida analítica: 40 min.

5.6.4 *Curva de calibración y evaluación del método*

Para la obtención de la curva de calibrado se eligieron concentraciones crecientes del estándar de hidrocarburos lineales de 0,5 , 1, 2 y 5 mg/L, preparadas por dilución de la solución estándar original. Una vez preparadas todas las disoluciones de las concentraciones mencionadas, se depositaron en viales que se introdujeron en el automuestreador del equipo de cromatografía de gases acoplada a un detector selectivo de masas. Los resultados obtenidos para cada punto del calibrado se registraron en una hoja de cálculo Excel, donde se realizó una curva de concentración vs área para realizar el estudio estadístico.

5.6.5 Obtención y análisis de resultados.

Después que las muestras pasaron por el equipo de cromatografía gaseosa acoplada a masas, se obtuvo un cromatograma de corriente reconstruida. Este es la representación gráfica de la suma de intensidades de todos los iones que se detectan de cualquier masa frente al tiempo^{109,110}.

Se obtuvieron los espectros de masas de los hidrocarburos alifáticos lineales presentes en la muestra, incluyendo todos los demás compuestos que surjan en la muestra, producto de la metabolización de los hidrocarburos por parte de la microalga.

El método por el cual se hizo la determinación de hidrocarburos presentes en la muestra fue el método de patrón externo. Cuando se quiere cuantificar un compuesto presente en una muestra por este método, se debe hacer una curva de calibración preparada con los estándares de hidrocarburos lineales y las muestras como se explicó anteriormente. Con la ecuación de la recta se calculará la concentración del analito en donde se sustituye “y” por el área del pico del analito en el cromatograma de la muestra y se despeja “x” que corresponde a la concentración del analito.

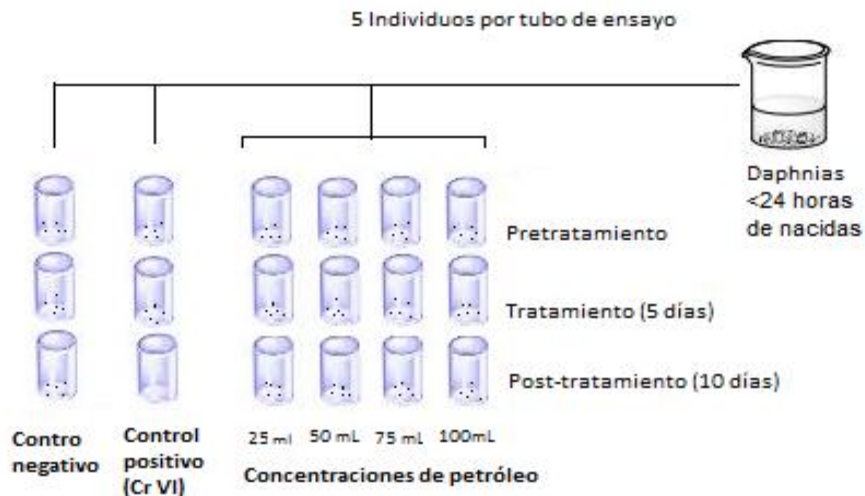
Etapa 3. Bioensayos para la evaluación de la toxicidad de las muestras de suelo contaminado con petróleo crudo.

5.7 Ensayo de toxicidad con el microcrustáceo *Daphnia magna*

Para el desarrollo de esta prueba de toxicidad se emplearon neonatos (<24 horas de nacido), donde fueron expuestos a las muestras del lixiviado de suelo contaminado con petróleo durante un periodo de 48 horas, bajo el protocolo de la NCh 2083 de 1999. Se realizó el análisis ecotoxicológico con la *Daphnia magna* en muestras del lixiviado obtenido antes del tratamiento con *Selenastrum capricornutum*, durante el tratamiento (5 días) y después del tratamiento (10 días), cada una por triplicado.

La forma de procedimiento que se llevó a cabo para la preparación de la prueba de toxicidad, consiste en un control positivo y uno negativo, ambos por triplicado (Figura 14). En el control negativo se utilizó agua dura reconstituida sin suplementos y en el control positivo una solución del compuesto tóxico de referencia (Cr_{VI}) preparada a partir de dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇) en concentraciones crecientes entre 0,1 a 3 mgL⁻¹. Una vez preparadas las soluciones se depositaron 5 neonatos de menos de 24 horas de nacidos a cada una de las soluciones, después de finalizar la transferencia de los organismos se colocaron bajo condiciones controladas de iluminación y temperatura (10-20 ± E/ m² /s y 20 ± 2 °C respectivamente) por un periodo de 48 horas. Trascurrido el tiempo (48 horas) se registraron el número de organismos vivos en cada dilución del lixiviado de las muestras. En la figura 17 se presenta el diagrama del procedimiento desarrollado para este montaje de toxicidad.

Figura 17. Esquema del ensayo de toxicidad con *Daphnia magna*¹¹¹



Para los resultados de los ensayos ecotoxicológicos se determinó la concentración letal media (CL₅₀) para el control positivo y se realizará el análisis estadístico mediante un análisis de varianza ANOVA con el software Statistix 9.0® para todas las muestras, con el fin de determinar diferencias significativas entre los parámetros evaluados en el bioensayo.

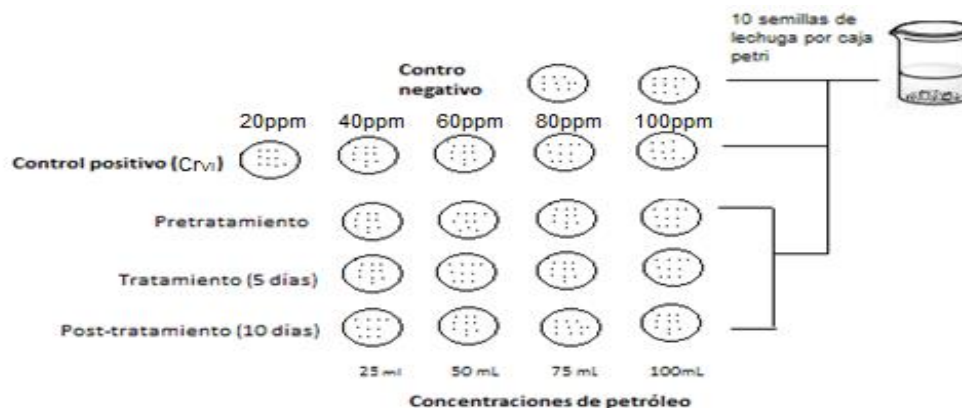
5.8 Ensayo de toxicidad con semillas de lechuga (*Lactuca sativa*)

El ensayo toxicológico con la semilla de lechuga (*Lactuca sativa*)⁷ se basa en la inhibición de germinación de las plántulas cuando se exponen a diferentes concentraciones del contaminante. Se tomaron 10 semillas y se depositaron en cajas Petri sobre un papel de filtro cualitativo de 90 mm de diámetro, donde se agregaron de 2 a 3 mL de cada muestra de lixiviado antes, durante y después del tratamiento con la microalga (Figura 18).

Las cajas fueron incubadas en la oscuridad a 20°C por 120 horas (5 días)⁷. Todos por duplicado. Después se realizó un conteo de las semillas que germinaron para cuantificar el porcentaje de germinación de estas⁷. Para el control positivo se usaron 5 cajas de Petri, cada una con 10 semillas de lechuga, sobre el papel filtro y se le adicionaron 3 mL de dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇) como compuesto tóxico de referencia (Cr_{VI})⁷, a diferentes concentraciones (20, 40, 60, 80, 100 ppm) donde se debe tener en cuenta que el límite mínimo en donde se observan efectos subletales en las semillas es de 20 ppm.

Las cajas de los ensayos con las muestras fueron incubadas en las mismas condiciones que las del bioensayo del control positivo (incubadas en la oscuridad a 20°C por 5 días). Transcurrido el tiempo de las 120h se evaluó la sensibilidad que presentaron las semillas frente al compuesto tóxico de referencia, cuantificando el número de semillas germinadas. El control negativo fue realizado agregando solamente agua destilada estéril a 5 cajas Petri que contienen 10 semillas de lechuga respectivamente, las condiciones fueron las mismas que el bioensayo y el control positivo. Los dos controles igualmente se realizaron por duplicado.

Figura 18. Esquema del ensayo de toxicidad con semillas de *Lactuca sativa*⁷



De igual forma a como se evaluó el bioensayo con *D. magna*, se aplicó el tratamiento estadístico ANOVA con el software Statistix 9.0® para los resultados obtenidos del ensayo de toxicidad, además de determinar la concentración efectiva media (CE₅₀) para el control positivo, todo esto con el fin de determinar diferencias significativas entre los parámetros evaluados en el bioensayo.

5.9 Impactos ambientales del proyecto

Los laboratorios en los que se llevó a cabo el proyecto cuentan con las normas de bioseguridad pertinentes, además de la protección que debía manejar cada persona que estuviera en contacto con el proyecto.

Los residuos de suelo contaminado con petróleo y demás materiales desechables que entraron en contacto con el crudo fueron depositados en un contenedor especial que se entregó al servicio de desechos especializado para este tipo de contaminantes. El material de vidrio que entró en contacto con el petróleo se depositó en el lugar donde se encuentra el resto de material contaminado con hidrocarburos para su posterior reutilización en otros proyectos y evitar contaminar más material.

6. RESULTADOS

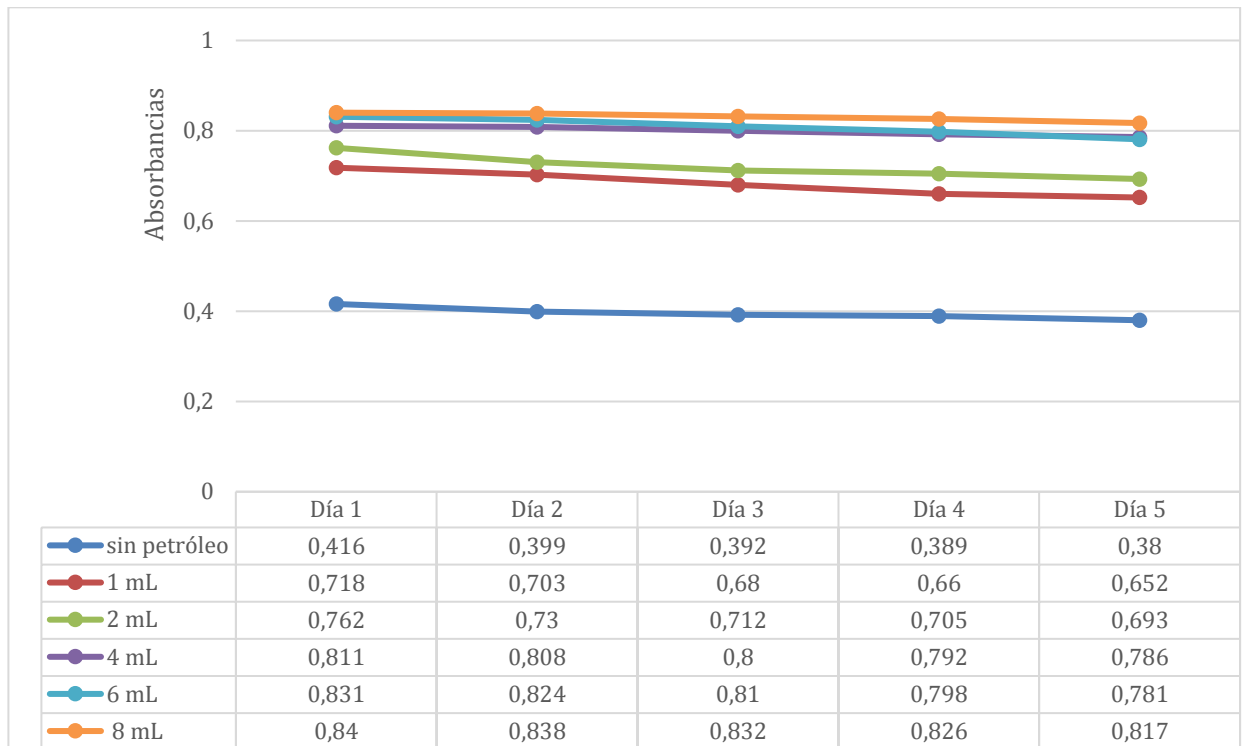
6.1 Cultivo y adaptación de la microalga.

Primero se llevó a cabo el cultivo y evaluación de la adaptación de la microalga *S. capricornutum* al contacto con el petróleo crudo. La adaptación consiste en el ajuste de una población a cambios medioambientales¹¹², en ese sentido los microorganismos logran una mejor adaptación en menor tiempo, por el cual es altamente probable encontrar microorganismos con capacidad de degradación una vez son expuestos cambios en las condiciones del entorno, como por ejemplo, explotaciones mineras, derrames de crudo, y la exposición a desechos tóxicos¹¹². Es importante llevar a cabo la adaptación ya que los microorganismos que no tengan la dotación genética para degradar los agentes contaminantes no lo van a hacer al exponerse a éstos, solo los que tengan el potencial lo van a hacer¹¹².

Para seguir la evolución de la microalga y su crecimiento después de ser expuesta a los volúmenes crecientes de petróleo crudo se realizó un análisis por Uv-vis a una longitud de 680 nm. En la Figura 15 se presentan los resultados de las absorbancias obtenidas en los 5 primeros días, donde se observa que, si bien las absorbancias van disminuyendo con respecto a la muestra del primer día, los cambios a través de los siguientes días no son muy grandes y tienen la misma tendencia con la muestra sin petróleo, esto podría significar una respuesta de supervivencia de la microalga al contacto con el petróleo, como un efecto de las nuevas condiciones de cultivo.

Finalmente se optó por realizar el experimento con las cepas que se encontraban en el tubo de ensayo con los 8mL de petróleo ya que fue la que presento menor variación entre el primer y último día. Para esto se llevó a mayor escala en matraces de Erlenmeyer manteniendo una proporción 44:56 de petróleo-microalga respectivamente. En la Figura 16 se observan primero las muestras en los tubos de ensayo de 1 hasta 8 mL con 10 mL, el orbital donde se dejaron y finalmente las microalgas con petróleo en los Erlenmeyers.

Figura 19. Resultados de absorbancia de la microalga *Selenastrum capricornutum* expuesta a diferentes concentraciones de petróleo.



Fuente: Autor

Figura 20. Adaptación de la microalga a volúmenes crecientes de petróleo.



Fuente: Autor

6.2 Determinación de la clorofila α en las muestras de lixiviados de suelo contaminado con petróleo

La biomasa puede estimarse mediante la determinación de la concentración de pigmentos fotosintéticos, como la clorofila α en la mayor parte de fitoplancton (algas, cianobacterias), en una muestra de agua. Primero se tomaron las absorbancias a 647, 664 y 750 nm, los resultados se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Resultados de la absorbancia para determinar clorofila α en las muestras de lixiviados a los 5 y 10 días de tratamiento.

Absorbancia	Muestras durante el tratamiento (5 días)					Muestras post tratamiento (10 días)				
	Blanco	25 mL	50 mL	75 mL	100 mL	Blanco	25 mL	50 mL	75 mL	100 mL
647 nm	0,036	0,016	0,016	0,048	0,014	0,042	0,083	0,146	0,235	0,380
664 nm	0,028	0,012	0,011	0,035	0,007	0,028	0,069	0,118	0,195	0,150
750 nm	0,005	0,001	0,003	0,014	0,002	0,001	0,034	0,087	0,089	0,046

Fuente: Autor

Después de obtenidos los resultados, todas las absorbancias de 647 y 664 nm se corrigen con las absorbancias de 750 nm ($A_x - A_{750}$) para eliminar el factor de la turbidez, obteniendo los resultados que se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Corrección de las absorbancias

Absorbancia	Muestras durante el tratamiento (5 días)					Muestras post tratamiento (10 días)				
	Blanco	25 mL	50 mL	75 mL	100 mL	Blanco	25 mL	50 mL	75 mL	100 mL
647 nm	0,031	0,015	0,013	0,034	0,012	0,041	0,049	0,059	0,146	0,334
664 nm	0,023	0,011	0,008	0,021	0,005	0,027	0,035	0,031	0,106	0,104

Fuente: Autor

Una vez se corrigen las absorbancias se realiza el cálculo para determinar la cantidad de clorofila α presente en cada muestra mediante la ecuación 2.

Ecuación 2. Cálculo bicromático para estimar clorofila α ^{113,114}:

$$\text{Clorofila } \alpha \text{ } (\mu\text{g/L}) = (11.93 * A_{664}) - (1.93 * A_{647}) * \text{vol. extracto (mL)/vol. Filtrado (L)}$$

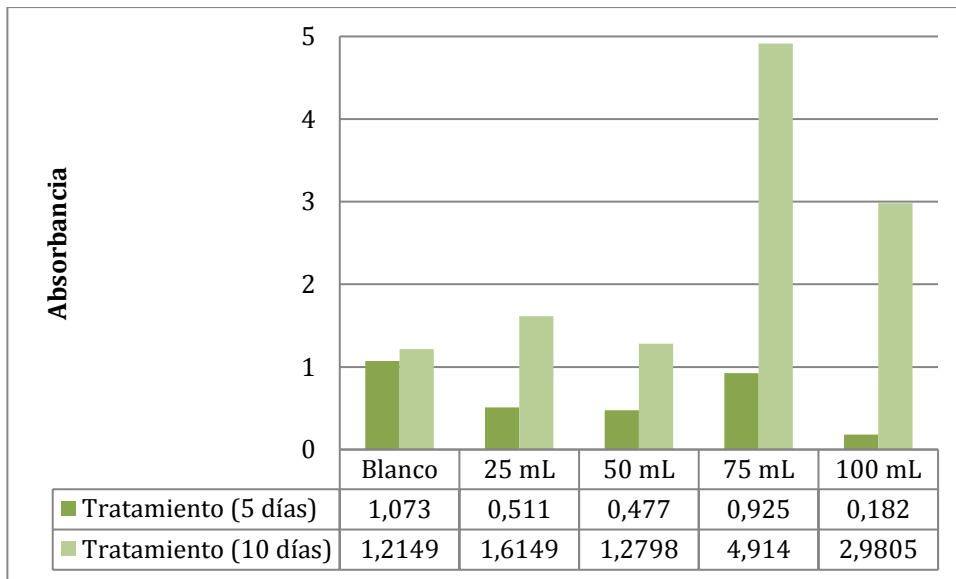
Donde:

$$\text{Vol. extracto (mL)} = 1\text{mL}$$

$$\text{Vol. Filtrado (L)} = 0,20 \text{ L}$$

En la Figura 21 se presentan los resultados obtenidos en la determinación de la clorofila α , donde se evidencia un aumento de esta, lo cual quiere decir que existe un crecimiento de la densidad de biomasa algal a medida que pasa más tiempo en contacto con las muestras del lixiviado, esto podría deberse a que la microalga está creciendo, como consecuencia de la interacción con los hidrocarburos de petróleo presentes en el lixiviado de suelo.

Figura 21. Resultados de la determinación de clorofila α en las muestras de lixiviados de suelo contaminado con petróleo



Fuente: Autor

Después se realizó un análisis de varianza ANOVA para determinar si existen diferencias significativas entre los resultados de clorofila a los 5 días de tratamiento y a los 10. Se plantearon como hipótesis:

Ho: Existen diferencias significativas entre los resultados de los ensayos a los 5 días y a los 10 días de tratamiento.

H1: No existen diferencias significativas entre los resultados de los ensayos a los 5 días y a los 10 días de tratamiento.

Los datos de resultados de ANOVA se encuentran registrados en las tablas que se observan en el Anexo 1.

De acuerdo a los resultados obtenidos, el valor F_{exp} es de 5,98 mientras que el valor de tabla de valores críticos de la distribución $F(0,05)^{115}$ obtenido para una probabilidad del 0,05 fue de 5,32; al ser el valor critico experimental mayor que el valor de tabla, se acepta la hipótesis Ho: Existen diferencias significativas entre los resultados de los ensayos a los 5 días y a los 10 días de tratamiento, lo cual podría evidencia un crecimiento significativo en la biomasa algal al finalizar el tratamiento.

6.3 Determinación de Hidrocarburos presentes en el lixiviado de suelo contaminado con petróleo mediante cromatografía gaseosa.

6.3.1 Porcentaje de recuperación del método de extracción de hidrocarburos para las muestras de lixiviados de suelo.

El porcentaje de recuperación del método para el análisis de hidrocarburos presentes en las muestras se encuentra comprendido en un rango entre 81% y 102% para las muestras de lixiviados de suelos contaminados con 2 ppm de C13, C32, pristano y fitano (Tabla 5). Según la tabla establecida por la OMS en conjunto con la FAO el rango aceptable de valores es de 80-110%¹¹⁶⁻¹¹⁸ por lo cual el porcentaje de recuperación del método de extracción se encuentra dentro del rango.

Tabla 5. Porcentaje de recuperación para cada muestra.

Muestra	%R1	%R2	%R3	S	%R promedio
C13	99,2	101,5	99,3	1,3	100,0
Pristano	97,8	95,6	95,9	1,2	96,4
Fitano	96,4	94,3	94,8	1,1	95,2
C32	89,1	87,6	90,3	1,4	89

Fuente: Autor

6.3.2 Análisis Cromatográfico y curva de calibración de los estándares para la determinación de los hidrocarburos por patrón externo.

Para el análisis cromatográfico se utilizó una mezcla de hidrocarburos alifáticos lineales de C10 a C40, (10ug/mL, S-4110-100-CY, Chiron AS) como patrón externo para la determinación de hidrocarburos presentes en las muestras de lixiviados antes y después del tratamiento. En la Tabla 6 se presentan los tiempos de retención y el área de cada compuesto de la mezcla de estándares.

La curva de calibración es una herramienta útil en la determinación de la concentración del analito, y se basa en la relación entre la una señal y la concentración. Para esto se tomaron concentraciones crecientes del estándar de hidrocarburos lineales de 0,5 , 1, 2 y 5 mg/L. Las curvas del método de cuantificación para cada compuesto de la mezcla estándar de hidrocarburos alifáticos lineales se encuentran en el ANEXO IV junto con la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación (r^2).

Tabla 6. Tiempos de retención y área de cada compuesto de la mezcla de estándares de hidrocarburos alifáticos lineales

Compuesto	Tiempo de retención	Área	Compuesto	Tiempo de retención	Área
C13	7,34	1490769	C21	14,77	2488595
C14	8,44	2124298	C22	15,51	2757292
C15	9,49	2229472	C23	16,22	2969338
C16	10,48	1946479	C24	16,91	3129227

C17	11,42	2282655	C25	17,56	3864594
Pristano	11,48	2321865	C26	18,20	3590981
C18	12,32	2089352	C27	18,81	3405057
Fitano	12,41	2215060	C28	19,36	3306669
C19	13,17	2067734	C29	19,96	3205684
C20	13,99	2482226	C30	20,54	2892335
C21	14,77	2488595	C31	21,16	2716775
C22	15,51	2757292	C32	21,84	2357352
C23	16,22	2969338	C33	22,59	2465045
C24	16,91	3129227	C34	23,45	1963606
C25	17,56	3864594	C35	24,44	1869509
C26	18,20	3590981	C36	25,59	1834838
C27	18,81	3405057	C37	26,94	1503146
C28	19,36	3306669	C38	28,53	1137706
C29	19,96	3205684	C39	30,42	1016557
C30	20,54	2892335	C40	32,65	817571

Fuente: Autor

6.3.3 Determinación de la concentración de hidrocarburos alifáticos en las muestras de lixiviados de suelos por cromatografía gaseosa.

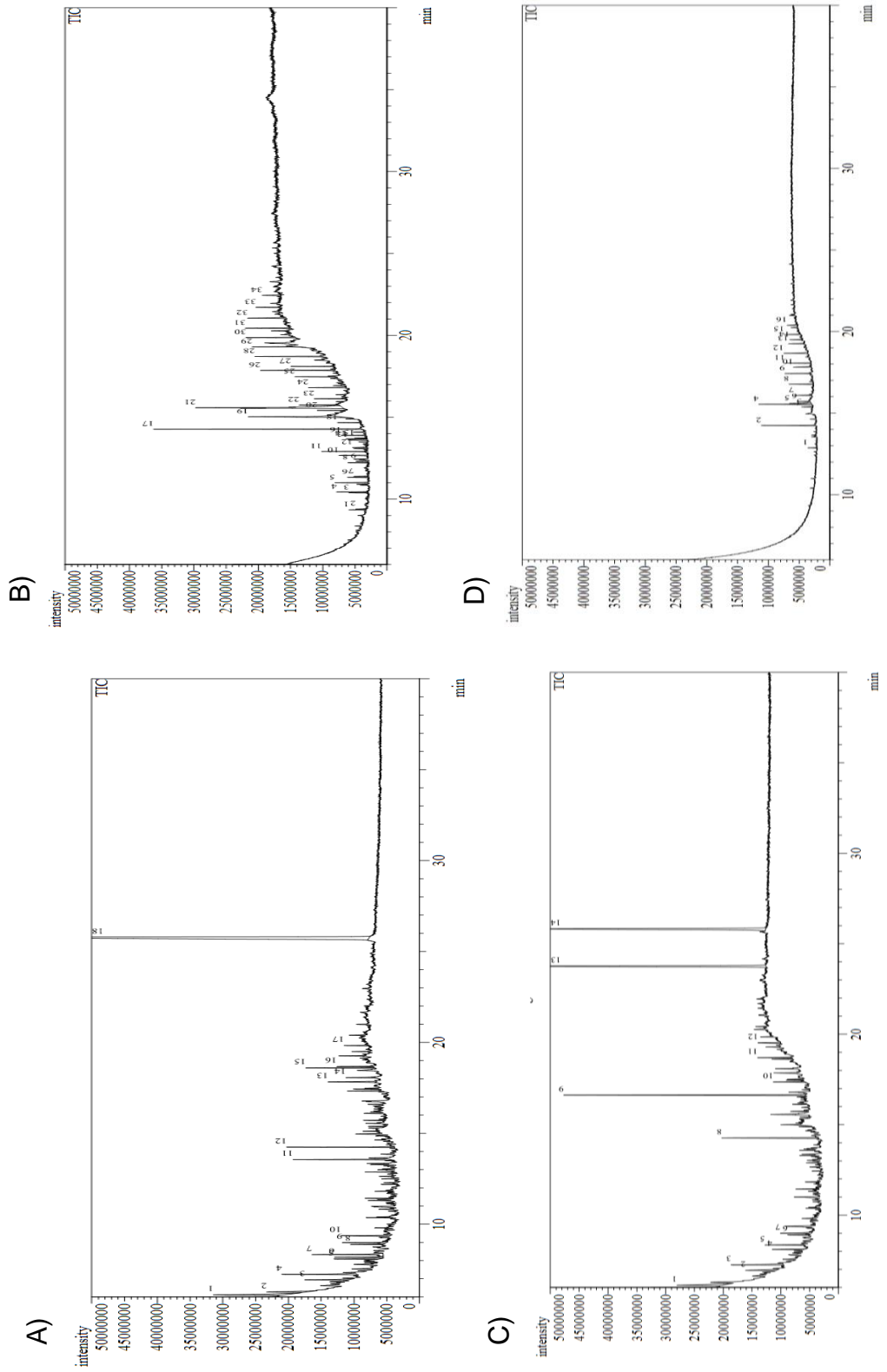
Se realizó el análisis por cromatografía gaseosa de las muestras de lixiviados de suelos contaminados con 25 y 50 mL de petróleo, antes y después de ser expuestas al tratamiento con la microalga *Selenastrum Capricornutum*. (Figura 22).

Para las muestras de 25 mL de petróleo antes del tratamiento se observan diferencias en los tiempos de retención, ya que para el cromatograma después del tratamiento aumentan de 6min a 9min, posiblemente porque los compuestos menos pesados han sido removidos. Además, se puede ver que el pico intenso casi al final del cromatograma antes del tratamiento, ya no aparece en el cromatograma después del tratamiento.

Por otro lado, para las muestras de 50 mL antes del tratamiento también se reporta un aumento en los tiempos de retención de 6min a 12 min, que podría deberse a la remoción de los compuestos de menor peso, y una disminución del número de picos, y de sus intensidades.

Se observa de igual manera, que si bien los cromatogramas de las muestras antes del tratamiento, A y C, deberían presentar un comportamiento similar, las diferencias entre estos podrían ser el resultado de los procesos de lixiviación o en el momento de la extracción de los lixiviados.

Figura 22. Cromatogramas de las muestras de lixiviados de suelos contaminados con 25 mL de petróleo antes (A) y después del tratamiento (B) y muestras de lixiviados de suelos contaminados con 50 mL de petróleo antes (C) y después del tratamiento (D)



En la Tabla 7 se reportan los hidrocarburos alifáticos lineales C10-C40, encontrados mediante el método de patrón externo, en todas las muestras, con su respectiva concentración en ppm.

Tabla 7. Resultados cuantitativos de las muestras evaluadas por CGMS.

Compuesto	tR	25 mL		50 mL	
		Sin tratamiento	Con tratamiento	Sin tratamiento	Con tratamiento
C13	7.25	12.1	-	9.56	-
C14	8.34	5.49	-	4.77	-
C15	9.37	5.19	-	3.94	-
C16	10.37	1.89	0.88	0.79	-
C17	11.33	-	1.15	-	-
Pristano	11.38	-	0.1	-	-
C18	12.23	-	0.98	-	-
Fitano	12.32	-	0.02	-	-
C20	13.89	-	1	-	-
C21	14.67	-	0.49	-	-
C22	15.42	-	0.84	-	-
C23	16.13	-	0.85	-	-
C24	16.8	-	1.22	0.60	0.29
C25	17.47	-	0.8	-	-
C26	18.1	-	1.13	-	0.26
C27	18.7	0.51	1.07	0.15	0.01
C28	19.3	-	1.55	-	-
C29	19.86	-	1.55	0.21	-
C30	20.43	-	1.6	-	-
C31	21.04	-	1.66	-	-
C32	21.71	-	1.58	-	-
C33	22.44	-	0.93	-	-
C36	25.77	111.33	-	-	-
Total		136.38	19.4	20.2	0.56

Fuente: Autor

Al hacer la comparación entre las muestras antes y después del tratamiento de 25 mL se puede evidenciar que las cadenas de C13 a C15 ya no aparecen después del tratamiento, además una disminución en la concentración de C16 pasando de 1,89ppm a 0,88 ppm. Además, en las muestras después del tratamiento ya no se presenta C36 que tenía una concentración de 111,33 ppm, y en su lugar aparecen cadenas carbonadas menores como las C25, C26, entre otras, en mínimas

concentraciones, esto podría implicar una posible degradación del C36 en estas cadenas menores.

Para las muestras de 50 mL se evidencia una desaparición de las cadenas de C13 a C16 como en la anterior muestra, posiblemente por una degradación de la microalga con las cadenas de hidrocarburos más cortas. También la disminución en la concentración del C24 y C27. En las muestras después del tratamiento no aparece el C29, pero sí se reporta un C26 que antes no estaba, esto podría deberse al rompimiento de cadenas largas como el C29.

Al realizar la sumatoria de las concentraciones encontradas para el rango de hidrocarburos alifáticos lineales, tomados como HTP, se realiza los cálculos para determinar el % de remoción (Ecuación 3) de estos hidrocarburos por el tratamiento con la microalga.

Ecuación 3.

$$\%Rem = 100 * \left(\frac{Ci - Cf}{Ci} \right)$$

Donde:

Ci = Concentración Inicial

Cf= Concentración Final

Finalmente, se determinó un porcentaje de remoción de 85,8% para las muestras de 25 mL y 97,2% para las muestras de lixiviados de suelos contaminados con 50mL de petróleo. Los resultados obtenidos demuestran un tratamiento efectivo en la remoción de hidrocarburos alifáticos lineales en las muestras de lixiviados contaminados con estos.

6.3.4 Posible identificación de los compuestos en las muestras por Espectroscopía de masas.

Después de realizada la cromatografía, las muestras pasaron por el espectrómetro de masas, cuya finalidad era poder detectar los posibles compuestos que se encontraban en las muestras. La adquisición de los datos fue en modo SCAN de 50 – 500 m/z. La base de datos de espectros de masas con las cuales se compararon las muestras fue la NIST11. Los espectros de masas de las muestras con sus compuestos tentativos se encuentran en el anexo 5.

En la Tabla 8 se encuentra los resultados para las muestras de 25mL Y 50mL antes y después del tratamiento. Se reportaron los compuestos correspondientes a los hidrocarburos alifáticos lineales C10-C40 identificados anteriormente en la cromatografía gaseosa. En algunos casos no se pudo determinar (N.d) cuál posible compuesto era ya que los cromatogramas de corriente reconstruida diferían mucho entre la muestra y la identificación tentativa dada por la base de datos de la NIST11. En los demás espectros de masas se encontró con gran variedad de compuestos con diferentes estructuras y grupos funciones, entre los que se destacan algunos ácidos grasos, alcoholes, y ésteres entre otros, algunos podrían ser metabolitos correspondientes a la degradación de las cadenas carbonadas.

Tabla 8. Posible identificación de los hidrocarburos alifáticos lineales en las muestras de 25mL Y 50mL antes y después del tratamiento

Compuesto	tR	25 mL		50 mL	
		Sin tratamiento	Con tratamiento	Sin tratamiento	Con tratamiento
C13	7.25	Tridecano	-	Dodecano	-
C14	8.34	Dodecano	-	Tetradecano	-
C15	9.37	Pentadecano	-	-	-
C16	10.37	-	Hexadecano	Hexadecano	-
C17	11.33	-	Heptadecano	-	-
Pristano (C ₁₉ H ₄₀)	11.38	-	Pristano	-	-
C18	12.23	-	Pentadecano	-	-
			Heptadecano		
Fitano (C ₂₀ H ₄₂)	12.32	-	Fitano	-	-
C20	13.89	-	Octacosano	-	-
			2-metiloctadecano		
C21	14.67	-	Heneicosano	-	-
C22	15.42	-	Heptacosano	-	-
			Hexadecano		
C23	16.13	-	Octacosano	-	-
			Heneicosano		
C24	16.8	-	Tetracosano	Tetracosano	Octacosano
					Heneicosano
C25	17.47	-	Octacosano	-	-
C26	18.1	-	Octacosano	-	Octacosano
			Tetratetracontano		Tetratetracontano
C27	18.7	Heneicosano	7-hexileicosano	N. d	7-hexileicosano
		Octacosano			
C28	19.3	-	N. d	-	-
C29	19.86	-	Octacosano	Octacosano	-
C30	20.43	-	Tetratetracontano	-	-
C31	21.04	-	7-hexileicosano	-	-
C32	21.71	-	Octacosano	-	-
C33	22.44	-	Hexadecano	-	-
			2-bromododecano		
C36	25.77	Nd	-	-	-

Fuente: Autor

6.4 Ensayos toxicológicos.

6.4.1 Ensayo toxicológico con *Daphnia magna*

Se realizó un ensayo toxicológico agudo con *Daphnia magna* evaluando el porcentaje de mortalidad de los neonatos expuestos a los lixiviados de suelo contaminados con petróleo. Las muestras procedían del lixiviado antes del tratamiento con la microalga, después de 5 días y finalmente después de 10 días.

Primero se debió realizar un control positivo para evaluar la sensibilidad de la cepa de la *D. magna* frente a un contaminante de referencia ($K_2Cr_2O_7$). En la Tabla 9 se puede apreciar que CL_{50} para *D. magna* frente al contaminante de referencia fue de 0,872 ppm. Se puede afirmar que este cultivo de organismos es válido para realizar los bioensayos con matrices problema debido a que el CL_{50} calculado se encuentra en el rango que se estipula en la normatividad^{119,120} el cual es de 0,6-1,7 ppm.

Tabla 9. Análisis de CL_{50} del tóxico de referencia para el individuo *D. magna* a través el programa Probit

Estadísticos de Regresión			
CL50	0,872		
CL50 LCL	0,559	CL50 UCL	1,501
Log10[CL50]	-0,059	Error Estándar	0,109
Beta	1,742	Intercepto	5,103
Beta Error Estándar	0,470		

Fuente: Autor

Los resultados obtenidos en el ensayo toxicológico para *Daphnia magna* se encuentran en la Tabla 10 donde se registra la cantidad de individuos que murieron en cada tratamiento sobre el total de individuos utilizados por montaje.

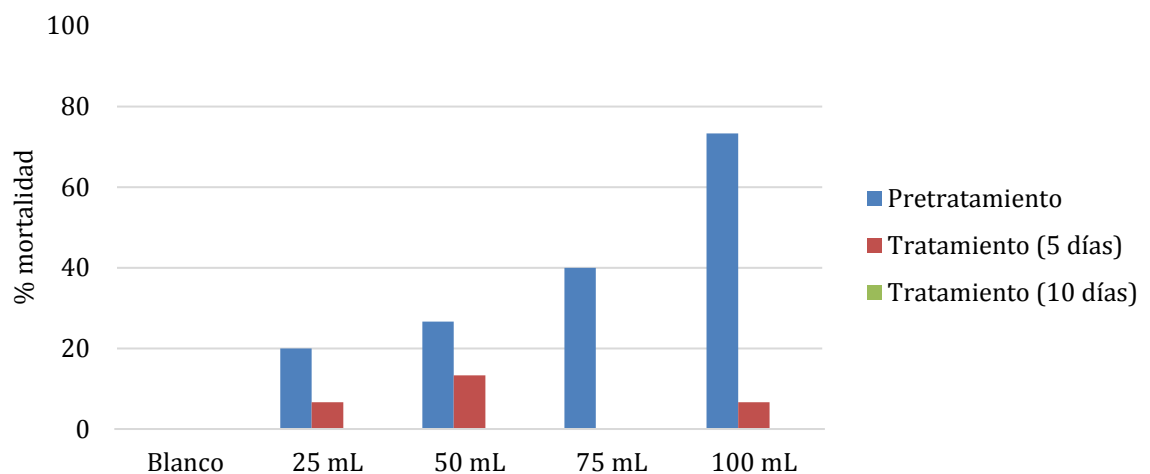
Tabla 10. Resultados del ensayo de toxicidad con *Daphnia magna*

	Pretratamiento		Tratamiento (5 días)		Postratamiento (10 días)	
	Individuos muertos	% mortalidad	Individuos muertos	% mortalidad	Individuos muertos	% mortalidad
Blanco	0/15	0	0/15	0	0/15	0
25 mL	3/15	20	1/15	7	0/15	0
50 mL	4/15	27	2/15	13	0/15	0
75 mL	6/15	40	0/15	0	0/15	0
100 mL	11/15	73	1/15	7	0/15	0

Fuente: Autor

Con estos datos se realizó un gráfico de barras (Figura 23), donde se observa que para el pre-tratamiento presentó un porcentaje de mortalidad superior a los demás, y aumenta a medida que se incrementa la concentración de petróleo. Para los datos del tratamiento se puede evidenciar una variabilidad de los datos de toxicidad que podría ser debido a que a los 5 días las microalgas están realizando el proceso de conversión o transformación del crudo y finalmente para el tratamiento a los 10 días se presentaba una mortalidad nula de los organismos. Lo cual quiere decir que los compuestos tóxicos presentes en las pruebas anteriores no se encuentran en el lixiviado o están en menor cantidad.

Figura 23. Porcentaje de mortalidad en cada tratamiento



Fuente: Autor

Para el análisis estadístico ANOVA se plantearon como hipótesis:

Ho: Existen diferencias significativas entre los resultados de los ensayos y el blanco de control.

H1: No existen diferencias significativas entre los resultados de los ensayos y el blanco de control.

Los resultados del ANOVA se encuentran registrados en las tablas del Anexo 2.

En el pretratamiento se obtuvo mediante un análisis de varianza un valor crítico estadístico F de 11.79 mientras que el valor de tabla de valores críticos de la distribución $F(0,05)^{115}$ obtenido para una probabilidad del 0.05 fue de 3,48; al ser el valor crítico mayor que el valor de tabla, se acepta la hipótesis nula (Ho), demostrando que los datos obtenidos si presentan diferencias significativas entre los pretratamientos aplicados y el blanco.

Los resultados obtenidos en el ensayo toxicológico para el tratamiento después de 5 días, presentó un porcentaje de supervivencia cercano al 100%, y mediante un análisis de varianza se obtuvo un valor crítico del estadígrafo F de 0,15 mientras que el valor de tabla de valores críticos de la distribución $F(0,05)^{115}$ obtenido para una probabilidad del 0,05 fue de 4,67; al ser el valor crítico menor que el valor de tabla se rechaza la hipótesis alternativa (H1), por ende no existen diferencias significativas entre el ensayo por concentración y el blanco. Es decir que a pesar de que hubo mortalidad, los valores obtenidos se pueden considerar similar en los 5 días de tratamiento.

Finalmente, para el tratamiento a los 10 días no se realizó un análisis de varianza ANOVA ya que el porcentaje de supervivencia era del 100%, por ende, no posee diferencias significativas con el blanco de control.

6.4.2 Ensayo toxicológico con semillas de lechuga (*Lactuca sativa*)

Para el ensayo toxicológico de *Lactuca sativa* se evaluó el porcentaje de germinación de las semillas en presencia del lixiviado de suelo de las muestras contaminadas con petróleo. Primero se realiza el control positivo con respecto a la relación entre el porcentaje de germinación de la semilla de *Lactuca sativa* frente al dicromato de potasio. La concentración efectiva media frente al control positivo se encuentra en la Tabla 11, en donde se obtuvo un CE_{50} de 35,335 ppm. Según estudios realizados para los ensayos de toxicidad con este bioindicador se reporta CE_{50} de control positivo con valores de 35,463 ppm, 35,482 ppm y 31,7334 ppm¹²¹⁻¹²³. Según estos resultados, el valor experimental se encuentra en el rango, lo cual quiere decir que las semillas son aptas para realizar el bioensayo.

Tabla 11. Concentración efectiva (CE_{50}) del control positivo para el bioensayo de semillas de *Lactuca sativa*

Estadísticos de Regresión			
CE50	35,335		
CE50 LCL	29,994	CE50 UCL	40,354
Log10[CE50]	1,548	Error Estándar	0,033
Beta	4,802	Intercepto	-2,434
Beta Error Estándar	0,652		

Fuente: Autor

Después de confirmar que las semillas son aptas, se realizó el bioensayo con las semillas de *Lactuca sativa*. En la Tabla 12 se encuentran los resultados obtenidos en el ensayo toxicológico donde se reporta la cantidad de semillas germinadas en el bioensayo sobre 20, que es la suma total de las semillas usadas en cada duplicado del ensayo.

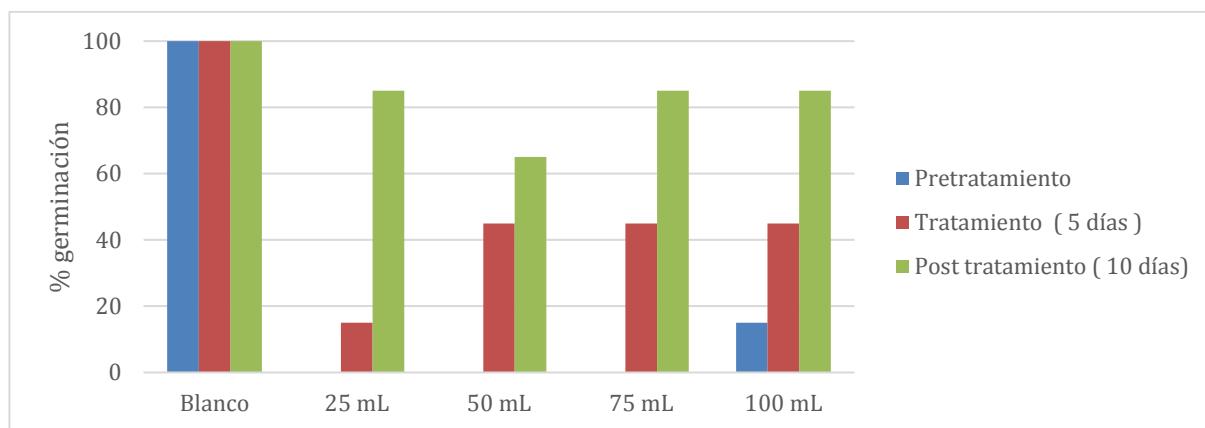
Tabla 12. Resultados del ensayo de toxicidad con *Lactuca sativa*.

	Pretratamiento		Tratamiento (5 días)		Postratamiento (10 días)	
	Semillas germinadas	% Germinación	Semillas germinadas	% Germinación	Semillas germinadas	% Germinación
Blanco	20/20	100	20/20	100	20/20	100
25 mL	0/20	0	3/20	15	17/20	85
50 mL	0/20	0	9/20	45	13/20	65
75 mL	0/20	0	9/20	45	17/20	85
100 mL	3/20	15	9/20	45	17/20	85

Fuente: Autor

Con los datos anteriores se graficó el porcentaje de germinación de las semillas (Figura 24). Se encontró así que para las muestras del pretratamiento con la microalga el porcentaje de germinación fue nulo para las 4 primeras concentraciones y se presentó un 15% para la concentración de 100 mL. Para los ensayos durante tratamiento (día 5) aumentó el porcentaje de germinación, y finalmente para las muestras del tratamiento a los 10 días, el porcentaje de germinación mucho mayor que el de las muestras anteriores, por lo cual se puede demostrar que el tratamiento con la microalga sirvió para disminuir la toxicidad presente en el lixiviado.

Figura 24. Resultados del ensayo de toxicidad con semillas de lechuga (*Lactuca sativa*)



Fuente: Autor

Para el análisis estadístico ANOVA se plantearon las siguientes hipótesis:

Ho: Existen diferencias significativas entre los resultados de los ensayos y el blanco de control.

H1: No existen diferencias significativas entre los resultados de los ensayos y el blanco de control.

Los resultados del ANOVA se encuentran registrados en las tablas del Anexo 2.

En el pretratamiento se obtuvo mediante el análisis de varianza con el software un valor crítico estadígrafo F de 8 comparado con el valor de la tabla de valores críticos de la distribución $F(0,05)^{115}$ para una probabilidad del 0.05 que es de 4,78; como el valor crítico experimental es mayor que el de la tabla se acepta la hipótesis nula (Ho), es decir, hay diferencias significativas entre los valores obtenidos en la germinación de las semillas expuestas en los ensayos y el blanco.

Para el tratamiento después de 5 días, los resultados de la ANOVA arrojaron un valor crítico del estadígrafo F de 2 mientras que el valor de tabla de valores críticos de la distribución $F(0,05)^{115}$ obtenido para una probabilidad del 0,05 es 8,94; al ser el valor crítico del ensayo menor que el valor de tabla se rechaza la hipótesis alternativa (H1), demostrando que no hay diferencias entre los valores de los ensayos y el blanco a los 5 días de tratamiento.

Finalmente, para el tratamiento a los 10 días, después de realizado el análisis de varianza se obtuvo como resultado un valor crítico estadígrafo F de 0,40, el valor de tabla de valores críticos de la distribución $F(0,05)^{115}$ que se reporta para una probabilidad del 0,05 es de 5,19; por lo cual se rechaza la hipótesis alternativa (H1), demostrando que, como en el caso anterior, no hay diferencias entre los valores de los ensayos y el blanco a los 10 días de tratamiento.

7. CONCLUSIONES

- Se demostró que la microalga *Selenastrum capricornutum* logró adaptarse al contacto con volúmenes crecientes de petróleo crudo.
- Los resultados obtenidos para el análisis espectrofotométrico de clorofila α demuestran un incremento de la clorofila en las muestras de los 10 días comparadas con las de los 5 días, esto se relaciona con un crecimiento en la biomasa algal de las microalgas.
- El porcentaje de recuperación para el método de extracción líquido-líquido con diclorometano, utilizando estándares de C13, pristano, fitano y C32, y obtuvieron porcentajes en un rango de 89 – 100%. Estos valores se encuentran dentro del rango establecido por lo cual el método de extracción es aceptable.
- Se realizó la determinación de hidrocarburos alifáticos lineales de C10 a C40 por cromatografía gaseosa acoplada a masas (CGMS) de las muestras de lixiviados de suelos contaminados con 25 y 50 mL de petróleo.
- Para las muestras de 25 mL se encontró una disminución de los compuestos de bajo peso molecular en las muestras después del tratamiento comparadas con las de antes. Además, una posible degradación del C36 cadenas carbonadas menores como la C25, C26, entre otras.
- Para las muestras de 50 mL se evidencia una desaparición de las cadenas cortas posiblemente por una degradación de la microalga. En las muestras después del tratamiento no aparece el C29, pero sí se reporta un C26 que antes no estaba, esto podría deberse al rompimiento de cadenas largas como el C29.
- Se determinó un porcentaje de remoción de 85,8% para las muestras de 25 mL y 97,2% para las muestras de lixiviados de suelos contaminados con 50mL de petróleo. Los resultados obtenidos demuestran un tratamiento efectivo en la remoción de hidrocarburos alifáticos lineales en las muestras de lixiviados contaminados con estos.
- Mediante el análisis por espectroscopia de masas en las muestras de 25mL Y 50mL antes y después del tratamiento se reportó, con base a la NIST11, la posible identificación de los compuestos correspondientes a los hidrocarburos alifáticos lineales C10-C40. También una gran variedad de compuestos con diferentes estructuras y grupos funciones, entre los que se destacan algunos ácidos grasos, alcoholes, y ésteres entre otros, algunos podrían ser metabolitos correspondientes a la degradación de las cadenas carbonadas.

- El suelo contaminado con petróleo disminuyó su toxicidad con el tratamiento con *Selenastrum capricornutum*, esto se pudo evidenciar en los resultados de las pruebas ecotoxicológicas utilizando como bioindicadores el microcrustáceo *Daphnia magna* y las semillas de *Lactuca sativa*.
- Para el ensayo toxicológico con *Daphnia magna* se encontró una reducción en el porcentaje de mortalidad del 83,3% para las muestras durante el tratamiento, y del 100% para las muestras después del tratamiento, lo cual indica que el tratamiento es viable.
- Para el ensayo toxicológico con semillas de *Lactuca sativa* se pudo evidenciar un aumento en el porcentaje de germinación del 56% para las muestras durante el tratamiento y uno del 73% después del tratamiento con la microalga.

8. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Organismo para la Protección del Medio Ambiente (EPA). Guía del ciudadano: Atenuación natural. 1996.
- (2) Jorgensen, S. E.; Fath, B. D. *Encyclopedia of ecology. Vol. 1, Vol. 1;* Elsevier: Netherland, 2008.
- (3) Arroyo Currás, T. Estudio de la efectividad de un producto biotecnológico comercial en la degradación de materia orgánica presente en aguas residuales domésticas. Tesis de pregrado, Universidad de las Américas Puebla: México, 2006.
- (4) Margesin, R.; Schinner, F. Bioremediation (Natural Attenuation and Biostimulation) of Diesel-Oil-Contaminated Soil in an Alpine Glacier Skiing Area. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, 67 (7), 3127–3133.
- (5) Pomeroy, R. S.; Parks, J. E.; Watson, L. M.; Union internationale pour la conservation de la nature et de ses ressources; Protected Areas Programme. Cómo evaluar una AMP: manual de indicadores naturales y sociales para evaluar la efectividad de la gestión de áreas marinas protegidas; UICN, Unión Mundial para la Conservación de la Naturaleza: Gland [etc.], 2007.
- (6) Duffus, J. Glossary for chemists of terms used in toxicology (IUPAC Recommendations 1993). *Pure Appl. Chem.* **1993**, 65 (9).
- (7) Ramírez Romero, P.; Mendoza Cantú, A.; México; Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales; Instituto Nacional de Ecología. *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo: la experiencia en México*; SEMARNAT: Instituto Nacional de Ecología: México, 2008.
- (8) Castillo Morales, G.; WaterTox; International Development Research Centre (Canada); Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones; Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo: Ottawa, 2004.
- (9) Morrison, R. T.; Boyd, R. N.; Zugazagoitia Herranz, R.; Fiedler, P. *Química orgánica*; Addison Wesley Longman: México, 1998,
- (10) *Diccionario de la lengua española*, Vigésimotercera edición, Edición del Tricentenario.; Real Academia Española, Ed.; Real Academia Española: Madrid, 2014.
- (11) Unidad de planeación minero energética. Cadena de petróleo 2013. Ministerio de minas y energías. República de Colombia, 2013.
- (12) Brown, T. L.; LeMay, E.; Bursten, B.; Murphy, C. *Química: la ciencia central*, 11va ed.; Pearson Educación: México, 2004, pp 1061.
- (13) Viñas-Canals. Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica. Tesis doctoral, Universitat de Barcelona: España, 2005.
- (14) Carey, F. A. Química orgánica, 6ta ed.; McGraw-Hill: México, 2006, pp 190-210
- (15) Chakraborty, R.; Coates, J. D. Anaerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, 64 (4), 437–446.

- (16) Orozco Barrenetxea, C. *Contaminación ambiental: una visión desde la química*; Thomson : Paraninfo: Madrid, 2003, pp 134-136.
- (17) Izquierdo Romero, A. R. Biodegradación de HAPs durante la biorremediación aeróbica con hidrocarburos derivados del petróleo. Análisis de poblaciones bacterianas y genes funcionales. Tesis doctoral, Universitat de Barcelona: Barcelona, 2013.
- (18) Monge, Y. El vertido del Golfo es seis veces el del “Exxon.” *El país*. Washington DC, USA June 12, 2010.
- (19) Ministerio de Relaciones Exteriores y Movilidad Humana. Chevron-Texaco pretende que el pueblo Ecuatoriano pague lo que ellos contaminaron. 2013.
- (20) Giacaman, D. Pescadores de Quintero presentarán demanda por derrame de petróleo. *La nación*. Chile 2015.
- (21) Vagas, P.; Cuéllar, R.; Dussán, J. Biorremediación de residuos de petróleo. *Univ. Los Andes* 2004.
- (22) Miranda, D.; Restrepo, R. Los derrames de petróleo en ecosistemas tropicales - impactos, consecuencias y prevención. La experiencia en Colombia. *Int. Oil Spill Conf. Proc.* **2005**, 2005 (1), 571–575.
- (23) Matute, P. Contaminación ambiental por petróleo en oriente del Ecuador, 2016.
- (24) Beltra, D. Derrame en el Golfo de Mexico, daño incalculable, 2016.
- (25) Pardo, K. Los ríos que las Farc pintaron de negro, 2016.
- (26) Bravo, E. Los impactos de la explotación petrolera en ecosistemas tropicales y la biodiversidad. *Fund. Reg. Asesor. En Derechos Hum.* **2007**.
- (27) El derrame de petróleo del Golfo, 2016.
- (28) Dias, R. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos en clima frío y templado. Ensayo y evaluación de distintas estrategias. Tesis doctoral, Universidad nacional de la Plata: Argentina, 2011.
- (29) Cortón, E.; Viale, A. Solucionando grandes problemas ambientales con la ayuda de pequeños amigos: las técnicas de biorremediación. *Rev. Ecosistemas* **2006**, 3.
- (30) Goldstein, B. D.; Osofsky, H. J.; Lichtveld, M. Y. The Gulf Oil Spill. *N. Engl. J. Med.* **2011**, 364 (14), 1334–1348.
- (31) Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. (ATSDR). Reseña Toxicológica de los Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPH) (en inglés). *Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU., Servicio de Salud Pública*. 1998.
- (32) Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Interaction profile for benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes (BTEX). *US Dep. Health Hum. Serv.* 2004.
- (33) Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR). Reseña toxicológica de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP). *Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU., Servicio de Salud Pública. Atlanta, GA* 1995.
- (34) Baird, C. *Química ambiental*; Editorial Reverté: Barcelona, 2001, pp 560.
- (35) Stepaniyan, O. V. Effects of crude oil on major functional characteristics of macroalgae of the Barents Sea. *Russ. J. Mar. Biol.* **2008**, 34 (2), 131–134.

- (36) El-Sheekh, M. M., El-Naggar, A. H., Osman, M.E.H., Haieder, A. Comparative studies on the green algae *Chlorella homosphaera* and *Chlorella vulgaris* with respect to oil pollution in the river Nile. *Water. Air. Soil Pollut.* **2000**, *124*, 187–204.
- (37) Romero, J. Adaptación de microalgas a contaminantes antropogénicos emergentes: aplicaciones. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid: Madrid, 2014.
- (38) Walker, J. D.; Colwell, R. R. Microbial petroleum degradation: use of mixed hydrocarbon substrates. *Appl Microbiol* **27**, 1053–1060.
- (39) Costas, E.; López, V.; Carrera, D.; Mateos, M. A.; Salgado, E. M. Degradación de hidrocarburos procedentes de petróleo mediante *Scenedesmus obtusus*. patente WO2011039387, 2011.
- (40) Warshawsky, D.; Keenan, T. H.; Reilman, R.; Cody, T. E.; Radike, M. J. Conjugation of benzo[a]pyrene metabolites by freshwater green alga *Selenastrum capricornutum*. *Chem. Biol. Interact.* **1990**, *74* (1–2), 93–105.
- (41) Warshawsky, D.; Cody, T.; Radike, M.; Reilman, R.; Schumann, B.; LaDow, K.; Schneider, J. Biotransformation of benzo[a]pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic analogs by several green algae and other algal species under gold and white light. *Chem. Biol. Interact.* **1995**, *97* (2), 131–148.
- (42) Chan, S. M. N.; Luan, T.; Wong, M. H.; Tam, N. F. Y. Removal and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Selenastrum capricornutum*. *Environ. Toxicol. Chem. SETAC* **2006**, *25* (7), 1772–1779.
- (43) Lei, A. P.; Wong, Y. S.; Tam, N. F. Y. Removal of pyrene by different microalgal species. *Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res.* **2002**, *46* (11–12), 195–201.
- (44) Ke, L.; Luo, L.; Wang, P.; Luan, T.; Tam, N. F.-Y. Effects of metals on biosorption and biodegradation of mixed polycyclic aromatic hydrocarbons by a freshwater green alga *Selenastrum capricornutum*. *Bioresour. Technol.* **2010**, *101* (18), 6950–6961.
- (45) Capó Martí, M. A. *Principios de ecotoxicología: [diagnóstico, tratamiento y gestión del medio ambiente]*; Tébar: Madrid, 2007, pp 12-16
- (46) Magalhaes, D.; Ferrao, A. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecologia Bras.* **2008**, *12* (3), 355–381.
- (47) Capó Martí, M. A. La ecotoxicología, una ciencia de hoy. *Med. Balear* **2003**, *18* (3), 101–104.
- (48) *Significance of tests for petroleum products*, 7th ed.; Rand, S. J., Ed.; ASTM manual series; ASTM International: West Conshohocken, PA, 2003, pp 169–182
- (49) Gámez, R.; Más, R. Aspectos generales de los estudios toxicológicos preclínicos más empleados. *Rev. CENIC Cienc. Biológicas* **2007**, *38* (3).
- (50) Ebert, D.; National Center for Biotechnology Information (U.S.). Ecology, epidemiology, and evolution of parasitism in *Daphnia*. National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information: Bethesda, MD, 2005.

- (51) Are we underestimating species extinction risk? *PLoS Biol.* **2005**, 3 (7), e253.
- (52) Pellegrini, V.; Gorbi, G.; Buschini, A. Comet Assay on *Daphnia magna* in ecogenotoxicity testing. *Aquat. Toxicol.* **2014**, 155, 261–268.
- (53) Mayer, F.; Ellersieck, M. Manual of acute toxicity: Interpretation and data base for 410 chemicals and 66 species of freshwater animals.; U.S. Dept. of the Interior, Fish and Wildlife Service: California, EEUU, 1986.
- (54) Martínez-Jerónimo, F.; Martínez-Jerónimo, L.; Espinosa-Chávez, F. Effect of culture conditions and mother's age on the sensitivity of *Daphnia magna* Straus 1820 (Cladocera) neonates to hexavalent chromium. *Ecotoxicol. Lond. Engl.* **2006**, 15 (3), 259–266.
- (55) Wang, C.-W.; Liang, C.; Yeh, H.-J. Aquatic acute toxicity assessments of molybdenum (+VI) to *Daphnia magna*. *Chemosphere* **2016**, 147, 82–87.
- (56) Wang, H.; Fan, W.; Xue, F.; Wang, X.; Li, X.; Guo, L. Chronic effects of six micro/nano-Cu₂O crystals with different structures and shapes on *Daphnia magna*. *Environ. Pollut.* **2015**, 203, 60–68.
- (57) Zhang, Z.; Yang, X.; Shen, M.; Yin, Y.; Liu, J. Sunlight-driven reduction of silver ion to silver nanoparticle by organic matter mitigates the acute toxicity of silver to *Daphnia magna*. *J. Environ. Sci.* **2015**, 35, 62–68.
- (58) Wang, X.; Qu, R.; Liu, J.; Wei, Z.; Wang, L.; Yang, S.; Huang, Q.; Wang, Z. Effect of different carbon nanotubes on cadmium toxicity to *Daphnia magna*: The role of catalyst impurities and adsorption capacity. *Environ. Pollut.* **2016**, 208, 732–738.
- (59) Kovacevic, V.; Simpson, A. J.; Simpson, M. J. 1H NMR-based metabolomics of *Daphnia magna* responses after sub-lethal exposure to triclosan, carbamazepine and ibuprofen. *Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics* **2016**.
- (60) Ding, J.; Lu, G.; Liu, J.; Yang, H.; Li, Y. Uptake, depuration, and bioconcentration of two pharmaceuticals, roxithromycin and propranolol, in *Daphnia magna*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2016**, 126, 85–93.
- (61) Martínez-Jerónimo, F.; Villaseñor, R.; Espinoza, F.; Ríos, G. Evaluación toxicológica de siete aceites crudos de campos petroleros del estado de Tabasco. *Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional*. 2004.
- (62) Arango Mejía, M. C. *Plantas medicinales: botánica de interés médico.*; Universidad de Caldas: Manizales, 2006, pp 200-203.
- (63) Iannacone, J.; Alvarino, L.; Caballero, C.; Sánchez, J. Cuatro ensayos ecotoxicológicos para evaluar lindano y clorpirifos. *Gayana Concepc.* **2000**, 64 (2).
- (64) Shargil, D.; Gerstl, Z.; Fine, P.; Nitsan, I.; Kurtzman, D. Impact of biosolids and wastewater effluent application to agricultural land on steroidal hormone content in lettuce plants. *Sci. Total Environ.* **2015**, 505, 357–366.
- (65) Park, J.; Yoon, J.; Depuydt, S.; Oh, J.-W.; Jo, Y.; Kim, K.; Brown, M. T.; Han, T. The sensitivity of an hydroponic lettuce root elongation bioassay to metals, phenol and wastewaters. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2016**, 126, 147–153.
- (66) Caporale, A. G.; Sommella, A.; Lorito, M.; Lombardi, N.; Azam, S. M. G. G.; Pigna, M.; Ruocco, M. *Trichoderma spp.* alleviate phytotoxicity in lettuce plants

- (*Lactuca sativa* L.) irrigated with arsenic-contaminated water. *J. Plant Physiol.* **2014**, 171 (15), 1378–1384.
- (67) Le, T. T. Y.; Vijver, M. G.; Kinraide, T. B.; Peijnenburg, W. J. G. M.; Hendriks, A. J. Modelling metal–metal interactions and metal toxicity to lettuce *Lactuca sativa* following mixture exposure (Cu²⁺–Zn²⁺ and Cu²⁺–Ag⁺). *Environ. Pollut.* **2013**, 176, 185–192.
- (68) Barquín, M.; Ríos, S.; Nudelman, N. Test de toxicidad sobre la especie *Atriplex lampa*, su aplicación para la evaluación de riesgo asociado a derrames de petróleo en suelos de la Patagonia. *Rev. Toxicol.* **2011**, 28 (2), 135–139.
- (69) Pentreath, V.; Gonzáles, E.; Barquín, M.; Ríos, S.; Perales, S. Bioensayo de toxicidad aguda con plantas nativas para evaluar un derrame de petróleo. *Rev. Salud Ambient.* **2015**, 15 (1), 4–12.
- (70) Comisión Oceanográfica Intergubernamental; UNESCO. *Determinación de los Hidrocarburos de Petróleo en los sedimentos*; 1982; Vol. 11, pp 38.
- (71) Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A.; Martín Gómez, M. del C. *Principios de análisis instrumental*; McGraw-Hill Interamericana: Madrid, 2001, pp 1-22, 788-811
- (72) Siddiquee, S.; Azad, S. A.; Abu Bakar, F.; Naher, L.; Vijay Kumar, S. Separation and identification of hydrocarbons and other volatile compounds from cultures of *Aspergillus niger* by GC–MS using two different capillary columns and solvents. *J. Saudi Chem. Soc.* **2015**, 19 (3), 243–256.
- (73) Lopez Valencia, J. pablo. Estandarización de la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas para la identificación y cuantificación de metilésteres de ácidos. Tesis de pregrado, Universidad tecnológica de Pereira: Pereira, 2008.
- (74) Dosal, M. A.; Villanueva, M. *Introducción a la metrología química: Carvas de calibración en los métodos analíticos*; Facultad de Química, Universidad Nacional de México, 2008.
- (75) Ordaz, J.; Martínez, Á.; Ramos, F.; Sánchez, L.; Martínez, A.; Tenorio, J.; Cuevas-Díaz, M. del C. Biorremediación de un suelo contaminado con petróleo mediante el empleo de bagazo de caña con diferentes tamaños de partícula. *Multiciencias Univ. Zulia* **2011**, 11, 136–145.
- (76) García, R.; Rios, E.; Martínez, Á.; Ramos, F.; Cruz, J.; Cuevas-Díaz, M. del C. Uso de cachaza y bagazo de caña en la remoción de hidrocarburos en suelo contaminado. *Rev. Int. Contam. Ambient.* **2011**, 27, 31–39.
- (77) Lladó Fernández, S. Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos pesados y caracterización de comunidades microbianas implicadas. Tesis doctoral, Universitat de Barcelona: España, 2012.
- (78) Pointing, S.B. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, 57, 20–33.
- (79) Medaura, M.; Guivernau, M.; Prenafeta, F.; Moreno-Ventas, X.; Viñas-Canals, M. Micorremediación y su aplicación para el tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos pesados. *V Simposio Iberoamericano de Ingeniería de Residuos*. 2013.

- (80) Pérez-Armendáriz, B.; Martínez-Carrera, D.; Calixto-Mosqueda, M.; Alba, J.; Rodríguez-Vázquez, R. Filamentous fungi remove weathred hydrocarbons from polluted soil of tropical México. *Rev. Int. Contam. Ambient.* **26**, 193–199.
- (81) Agnello, A. C.; Bagard, M.; van Hullebusch, E. D.; Esposito, G.; Huguenot, D. Comparative bioremediation of heavy metals and petroleum hydrocarbons co-contaminated soil by natural attenuation, phytoremediation, bioaugmentation and bioaugmentation-assisted phytoremediation. *Sci. Total Environ.* **2016**, *563–564*, 693–703.
- (82) Salazar, M. Aplicación e importancia de las microalgas en el tratamiento de aguas residuales. *Revista ContactoS*. Universidad Autónoma Metropolitana. **2005**, pp 64–70.
- (83) Caldwell, D. Sewage oxidation pondsperformance operation and design. *Sew. Works J.* **1946**, *18*, 453–458. (1) Organismo para la Protección del Medio Ambiente (EPA). Guía del ciudadano: Atenuación natural. 1996.
- (84) Bioremediación de aguas con fosfatos y nitratos utilizando *Scenedesmus incrassatulus* inmovilizado. *Bistua Rev. Fac. Cienc. Básicas Univ. Pamplona* **2010**, *10*, 71–79.
- (85) Bulgariu, L.; Gavrilescu, M. Bioremediation of Heavy Metals by Microalgae. In *Handbook of Marine Microalgae*; Elsevier, 2015; pp 457–469.
- (86) Medina, P.; Rudolph, A.; Cisternas, P. Incidencia de la biomasa microalgal sobre los índices de eficiencia de una laguna de estabilización. *Ecoamérica* **2002**, *18*, 19.
- (87) Hernández-Pérez, A.; Labbé, J. Microalgas, cultivo y beneficios. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr. Univ. Valpo*. **2014**, *49*, 157–173.
- (88) Moha-León, J.; Pérez-Legaspi, I.; Ríos-Leal, E.; Ortega-Clemente, L. *Nannochloris oculata*: Una alternativa para la biorremediación del lindano.; Asociación Mesoamericana de Ecotoxicología y Química Ambiental: México, 2012.
- (89) Piña-Olavide, R. Determinación de la Capacidad de Remoción de Cadmio in vitro de la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* con potencial para la biorremediación de sitios naturales impactados, Universidad autónoma de San Luis Potosí.
- (90) Bernal Toris, D. N. Evaluación de la capacidad de *Selenastrum capricornutum* inmovilizada en alginato para remover benzo[a]pireno de medio de cultivo acuoso. Tesis de grado, Universidad Nacional Autónoma de México: México, D.F, 2015.
- (91) León Santiago, M. Bioremoción de contaminantes orgánicos de medio acuoso con sistemas algales. Tesis de maestría, Universidad Autónoma de México: México, D.F, 2016.
- (92) Díaz-Flores, G. Evaluación de la biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos por la microalga *Selenastrum capricornutum* mediante metodología de extracción en fase sólida y dispersión de matriz en fase sólida acoplado a CLAR-UV. Tesis de grado, Universidad Nacional Autónoma de México: México, D.F, 2013.
- (93) Fu, P. P.; Xia, Q.; Sun, X.; Yu, H. Phototoxicity and Environmental Transformation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)—Light-Induced

- Reactive Oxygen Species, Lipid Peroxidation, and DNA Damage. *J. Environ. Sci. Health Part C* **2012**, 30 (1), 1–41.
- (94) Mastandrea, C.; Chichizola, C.; Ludeña, B.; Sánchez, H.; Álvarez, H.; Gutiérrez, A. Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Riesgos para la salud y marcadores biológicos. *Acta bioquím. clín. latinoam* **2005**, 39 (1), 27–36.
- (95) Quiñones, L.; Lee, K.; Varela F, N.; Escala, M.; García, K.; Godoy, L.; Castro, A.; Soto, J.; Saavedra, I.; Cáceres, D. Farmacogénica del cáncer: Estudio de variaciones genéticamente determinadas en la susceptibilidad a cáncer por exposición a xenobióticos. *Rev. Médica Chile* **2006**, 134 (4).
- (96) Franco Tobón, Y. N.; Ramírez Botero, C. M. El benzo[a]pireno en los alimentos y su relación con el cáncer. *Perspect Nut Hum* **2013**, 15 (1).
- (97) Penning, T. M.; Burczynski, M. E.; Hung, C.-F.; McCoull, K. D.; Palackal, N. T.; Tsuruda, L. S. Dihydrodiol Dehydrogenases and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Activation: Generation of Reactive and Redox Active o - Quinones. *Chem. Res. Toxicol.* **1999**, 12 (1), 1–18.
- (98) Huang, M.; Blair, I. A.; Penning, T. M. Identification of Stable Benzo[a]pyrene-7,8-dione-DNA Adducts in Human Lung Cells. *Chem. Res. Toxicol.* **2013**, 26 (5), 685–692.
- (99) Haritash, A. K.; Kaushik, C. P. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *J. Hazard. Mater.* **2009**, 169 (1–3), 1–15.
- (100) García de Llasera, M. P.; Olmos-Espejel, J. de J.; Díaz-Flores, G.; Montañó-Montiel, A. Biodegradation of benzo(a)pyrene by two freshwater microalgae *Selenastrum capricornutum* and *Scenedesmus acutus*: a comparative study useful for bioremediation. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2016**, 23 (4), 3365–3375.
- (101) García Cicourel, A. R. Caracterización cromatográfica y espectral de compuestos de degradación provenientes de los HAPs con aplicación a su monitoreo en cultivos de microalgas. Tesis de maestría, Universidad Nacional Autónoma de México: México, D.F, 2015.
- (102) Juhasz, A. L.; Naidu, R. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2000**, 45 (1–2), 57–88.
- (103) Peng, R.-H.; Xiong, A.-S.; Xue, Y.; Fu, X.-Y.; Gao, F.; Zhao, W.; Tian, Y.-S.; Yao, Q.-H. Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiol. Rev.* **2008**, 32 (6), 927–955.
- (104) Yadav, J. S.; Doddapaneni, H.; Subramanian, V. P450ome of the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: structure, evolution and regulation of expression of genomic P450 clusters. *Biochem. Soc. Trans.* **2006**, 34 (6), 1165–1169.
- (105) Guiraud, P.; Bonnet, J. L.; Boumendjel, A.; Kadri-Dakir, M.; Dusser, M.; Bohatier, J.; Steiman, R. Involvement of *Tetrahymena pyriformis* and selected fungi in the elimination of anthracene, and toxicity assessment of the biotransformation products. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2008**, 69 (2), 296–305.
- (106) Chan, S. M. N. Removal and biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by a microalgal species, *Selenastrum capricornutum*. Tesis doctoral, City University of Hong Kong: Hong Kong, 2010.

- (107) Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Parker, J. Brock. *Biología de los microorganismos*, Décima edición.; Pearson, Prentice Hall Hispanoamericana: Madrid, 2004, pp 586-592.
- (108) Otero, A.; Cruz, P.; Velasco, Y. Effect of the Hydrocarbon Phenanthrene on *Chlorella vulgaris* (Chlorellaceae) Growth. *Acta BiolColomb* **2013**, 18 (1).
- (109) Harris, D. C. *Análisis químico cuantitativo*, 3. ed. (6. original).; Editorial Reverté: Barcelona, 2007, pp 541.
- (110) Stashenko, E.; Martinez, J. R. GC-MS: Más de un Analizar de Masas, ¿para qué? *Scientia Chromatographica*. **2010**, 2 (4), 25–48.
- (111) Landis, W. G.; Yu, M.-H. *Introduction to environmental toxicology: impacts of chemicals upon ecological systems*, 3. ed.; Lewis: Boca Raton, Fla., 2004, pp 74-76
- (112) Posada, R. *Procesos de Biorremediación*, Módulo didáctico.; Universidad Nacional Abierta y a Distancia: Bogotá, 2012.
- (113) Jeffrey, S.; Humphrey, G. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a,b,c1 and c2 un higher plants, algae and natural phytoplakton. *Biochem Physiol Pflanz*. **1975**, 167, 191–194.
- (114) Contreras, S. Guia de laboratorio N°1: Determinación de pigmentos fotosintéticos totales (clorofila y carotenoides) en agua y sedimentos por espectrofotometría. Facultad de Ciencias, Universidad Católica de la Santísima Concepción 2015.
- (115) Howell, D. C. *Fundamental statistics for the behavioral sciences*, 9th edition.; Cengage Learning: San Francisco, CA, 201, pp 583
- (116) FAO, ONU. *Comision Del Codex Alimentarius: Manual de Procedimiento.*, 8th ed.; Food & Agriculture Organi: Roma, 2011.
- (117) Instituto de Salud Pública de Chile. *Validación de Métodos y Determinación de La Incertidumbre de La Medición*; Santiago de Chile, 2010, p 40.
- (118) Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales. *Estandarización de Métodos Analíticos*; Colombia, 2006.
- (119) Instituto Nacional de Normalización - Chile. *Aguas - Bioensayo de toxicidad aguda mediante la determinación de la inhibición de la movilidad de Daphnia magna o Daphnia pulex*; NCh 2083 - 1999.
- (120) International Organization for Standardization. Water quality -- Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna Straus* (Cladocera, Crustacea) -- Acute toxicity test; ISO 6341-2004
- (121) Duarte Castro, D. E. Determinación de la concentración de inhibición media (CE50) de cobre y níquel para la semilla *Lactuca sativa* mediante ensayos de toxicidad. Tesis de pregrado, Universidad de La Salle: Colombia, 2009.
- (122) Acosta R, C. Determinación de la concentración de inhibición media (CE50-120) del boro y el cobalto mediante bioensayos de toxicidad acuática sobre semillas de lechuga (*Lactuca sativa*). Editorial Universidad Militar Nueva Granada. 2013.
- (123) Pinto, L. Determinación de la concentración de inhibición media (CE50) de cromo para la semilla *Lactuca Sativa* mediante ensayos de toxicidad. Tesis de pregrado, Universidad de La Salle: 2009.

9. ANEXOS

Anexo 1. Tratamiento estadístico ANOVA para resultados de la determinación de Clorofila α .

Análisis de Varianza (Una Vía)							
Resumen							
<i>Grupos</i>	<i>Tamaño muestral</i>	<i>Suma</i>	<i>Media</i>	<i>Varianza</i>			
A	5	3,168	0,6336	2,528728			
B	5	12,005	2,401	38,75661			
<i>Total</i>	10		1,5173	2,02926			
ANOVA							
<i>Origen de la Variación</i>	<i>d.f.</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>nivel p</i>	<i>F crit</i>	<i>Omega Cuadrado</i>
<i>Entre Grupos</i>	1	7,809257	7,809257	5,976042	0,040275	5,317655	0,332267
<i>Dentro de Grupos</i>	8	10,45409	1,306761				
<i>Total</i>	9	18,26334					
<i>Hartley Fmax</i>	19,04683	<i>Grados de Libertad</i>	2	4			
<i>Cochran C</i>	0,950117	<i>Grados de Libertad</i>	2	4			
<i>Bartlett Chi-square</i>	5,913766	<i>Grados de Libertad</i>	1	<i>nivel p</i>	0,015023		
Comparaciones entre grupos (Factor 1 -)							
Prueba HSD de Tukey para Diferencias Entre Medias							
<i>Grupos</i>	<i>Diferencia</i>	<i>Estadísticas de la Prueba</i>	<i>nivel p</i>	<i>¿Aceptado?</i>			
1 vs 2	-1,7674	3,457179	0,04032	aceptado			
Prueba B de Tukey para Contrastes sobre Medias Ordenadas							
<i>Grupos</i>	<i>Diferencia</i>	<i>Estadísticas de la Prueba</i>	<i>Grados de Libertad</i>	<i>GL de error</i>	<i>nivel p</i>	<i>¿Aceptado?</i>	
2 vs 1	-1,7674	3,457179	2	8	0,04032	aceptado	
Prueba de Tukey-Kramer para Diferencias Entre Medias							
<i>Grupos</i>	<i>Diferencia</i>	<i>Estadísticas de la Prueba</i>	<i>nivel p</i>	<i>¿Aceptado?</i>			
1 vs 2	-1,7674	3,457179	0,04032	aceptado			

Anexo 2. Tratamiento estadístico ANOVA para los ensayos toxicológicos.

Tabla 13. ANOVA respuesta pretratamiento del bioensayo con *D. magna*

Statistix - Versión 9.0		12/10/2016, 11:37:10 a. m.				
		Pretrata				
One-Way AOV for factor by Vr						
Source		DF	SS	MS	F	P
Vr		4	24.7500	6.18750	11.79	0.0008
Error		10	5.2500	0.52500		
Total		14	30.00			
Grand Mean		3.0	CV	24.15		
Homogeneity of Variances						
		F	P			
Levene's Test		1.032	0.4396			
O'Brien's Test		M	M			
Brown and Forsythe Test		0.71	0.6053			
Welch's Test for Mean Differences						
Source		DF	F	P		
Vr		4.0	M	0.0000		
Error		M				
Component of variance for between groups		1.93040				
Effective cell size		2.9				
Vr		N	Mean	SE		
	0	4	1.25	0.3623		
	20	4	3.00	0.3623		
	40	3	3.00	0.4183		
	60	2	4.50	0.5123		
	80	2	5.00	0.5123		

Tabla 14. ANOVA respuesta tratamiento (5 días) del bioensayo con *D. magna*

Source		DF	SS	MS	F	P
Daphnia trata						
One-Way AOV for factor by Vr						
Vr		1	0.3409	0.3409	0.15	0.7053
Error		13	29.6591	2.28147		
Total		14	30.0			
Grand Mean		3.0	CV	50.35		
Homogeneity of Variances						
		F	P			
Levene's Test		1.32	0.2711			
O'Brien's Test		0.58	0.4592			
Brown and Forsythe Test		1.97	0.1841			
Welch's Test for Mean Differences						
Source	DF	F	P	DF	F	P
Vr				1.0	0.19	0.6791
Error				6.8		
Component of variance for between groups					-0.33078	
Effective cell size		4,9				
Vr		N	Mean	SE		
	0	11	2.9091	0.4554		
	20	4	3.2500	0.7552		

Tabla 15. ANOVA respuesta pretratamiento del bioensayo con *Lactuca sativa*.

Statistix -Version 9.0		12/10/2016, 11:47:03 a. m.			
One-Way AOV for factor by vr			Pretratamiento		
Source	DF	SS	MS	F	P
Vr	3	16	5.3333	8	0.0161
Error	6	4	0.66667		
Total	9	20			
Grand Mean	3.0	CV	27.22		
Homogeneity of Variances		F	P		
Levene's Test		1.60	0.2853		
O'Brien's Test		M	M		
Brown and Forsythe Test		1.60	0.2853		
Welch's Test for Mean Differences					
Source	DF	F	P		
Vr	3.0	M	0.000		
Error	M				
Component of variance for between groups			2.333		
Effective cell size		2			
Vr	N	Mean	SE		
0	6	3.00	0.3333		
10	1	5.00	0.8165		
20	1	5.00	0.8165		
100	2	1.00	0.5774		

Tabla 16. ANOVA respuesta tratamiento a los 5 días del bioensayo con *Lactuca sativa*.

Statistix - Version 9.0		12/10/2016, 11:50:11 a. m.			
One-Way AOV for factor by vr		Tratamiento 5 días			
Source	DF	SS	MS	F	P
Vr	6	16	2.6667	2	0.3041
Error	3	4	1.33		
Total	9	20			
Grand Mean	3	CV	38.49		
Homogeneity of Variances		F	P		
Levene's Test		M	M		
O'Brien's Test		M	M		
Brown and Forsythe Test		M	M		
Welch's Test for Mean Differences					
Source	DF	F	P		
vr	6	M	0.000		
Error	M				
Component of variance for between groups		0.90909			
Effective cell size	1,5				
Vr	N	Mean	SE		
10	1	2	1.1547		
20	1	2	1.1547		
30	1	4	1.1547		
40	2	4	0.8165		
50	2	4	0.8165		
60	1	4	1.1547		
100	2	1	0.8165		

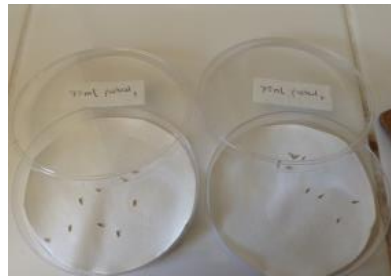
Tabla 17. ANOVA respuesta pretratamiento del bioensayo con *Lactuca sativa*.

Source		DF	SS	MS	F	P
Vr		4	4.8333	1.20833	0.40	0.8033
Error		5	15.1667	3.03333		
Total		9	20			
Grand Mean		3 CV	58.05			
Homogeneity of Variances			F	P		
Levene's Test			0.83	0.5600		
O'Brien's Test			M	M		
Brown and Forsythe Test			0.37	0.8184		
Welch's Test for Mean Differences						
Source		DF	F	P		
Vr		4	M	0.0000		
Error		M				
Component of variance for between groups -0.93590						
Effective cell size		2,0				
Vr	N	Mean	SE			
50	1	3.00	1.7416			
70	1	4.00	1.7416			
80	3	3.33	1.0055			
90	2	3.50	1.2315			
100	3	2.00	1.0055			

Anexo 3. Registro fotográfico ensayo de toxicidad *Lactuca Sativa*

Ensayo de toxicidad con las semillas de *Lactuca sativa*

1. Pretratamiento

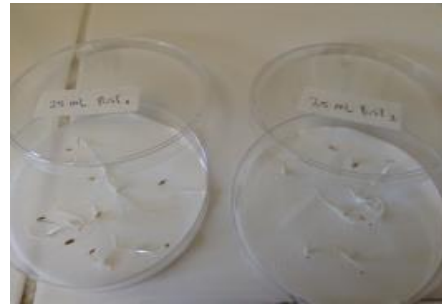


2. Durante el tratamiento (5 días)

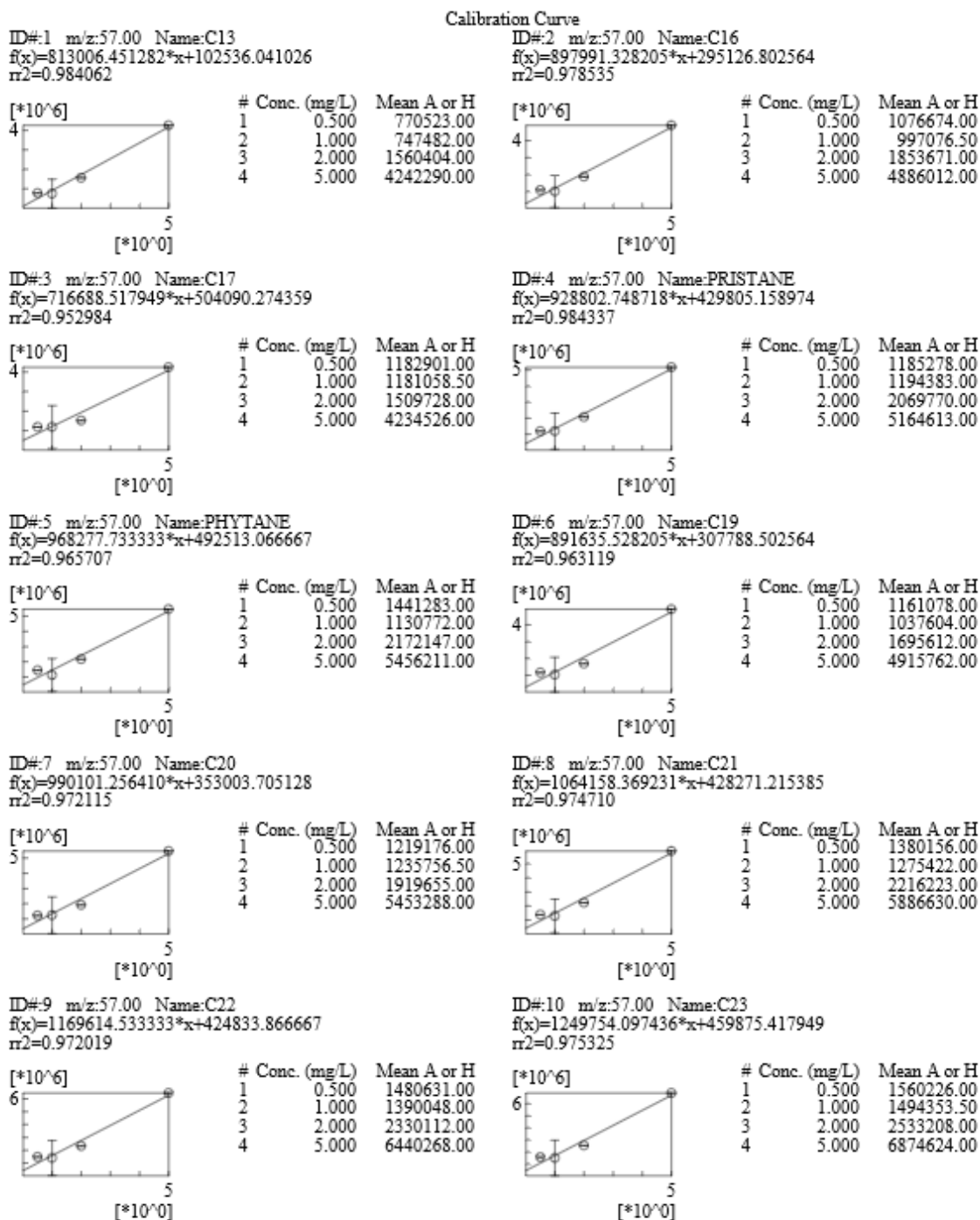




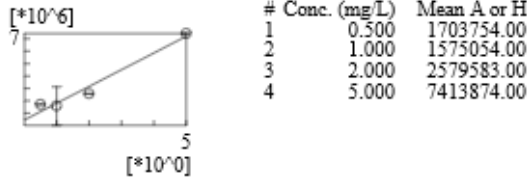
3. Después del tratamiento (10 días)



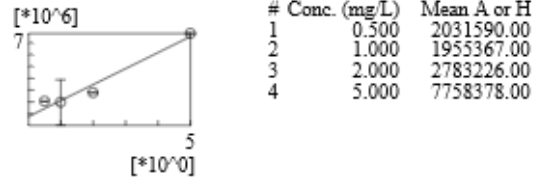
Anexo 4. Curvas de calibración para el método de alcanos obtenidas por la mezcla de estándares.



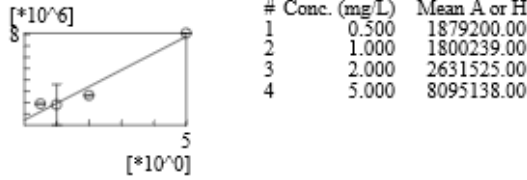
ID#11 m/z:57.00 Name:C24
 $f(x)=1349899.805128*x+449529.164103$
 $rr2=0.967051$



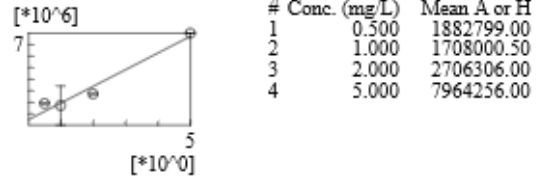
ID#12 m/z:57.00 Name:C25
 $f(x)=1350261.487179*x+762834.589744$
 $rr2=0.961094$



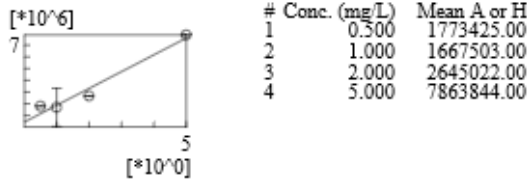
ID#13 m/z:57.00 Name:C26
 $f(x)=1465896.389744*x+486495.671795$
 $rr2=0.957748$



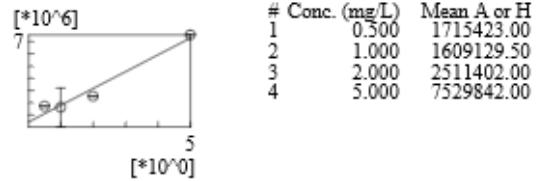
ID#14 m/z:57.00 Name:C27
 $f(x)=1442289.133333*x+500475.966667$
 $rr2=0.961446$



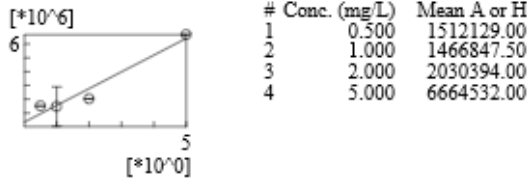
ID#15 m/z:57.00 Name:C28
 $f(x)=1437552.184615*x+432650.107692$
 $rr2=0.964521$



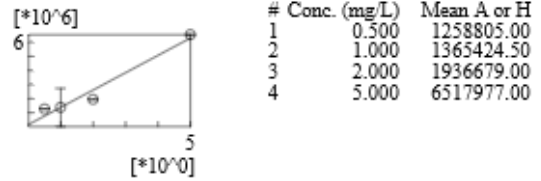
ID#16 m/z:57.00 Name:C29
 $f(x)=1373254.353846*x+423283.623077$
 $rr2=0.962600$



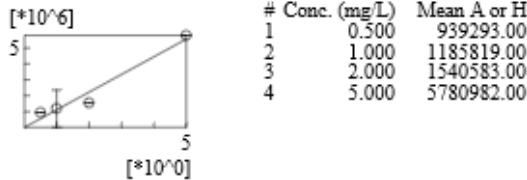
ID#17 m/z:57.00 Name:C30
 $f(x)=1214302.948718*x+338081.858974$
 $rr2=0.950504$



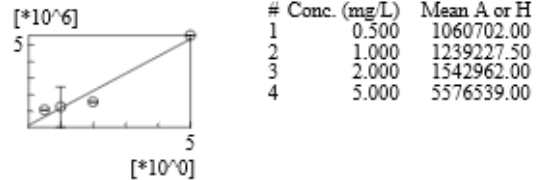
ID#18 m/z:57.00 Name:C31
 $f(x)=1223830.835897*x+169080.848718$
 $rr2=0.960822$



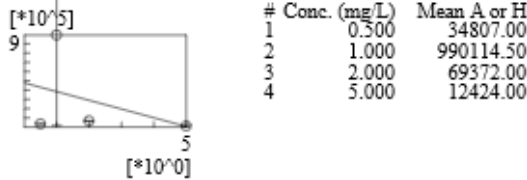
ID#19 m/z:57.00 Name:C32
 $f(x)=1113218.697436*x-3920.482051$
 $rr2=0.957631$



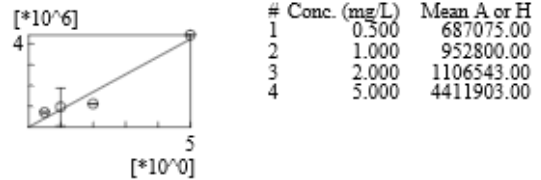
ID#20 m/z:57.00 Name:C33
 $f(x)=1043848.835897*x+136678.848718$
 $rr2=0.951416$



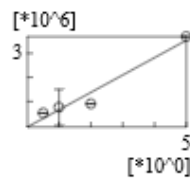
ID#21 m/z:57.00 Name:C34
 $f(x)=93816.835897*x+476040.151282$
 $rr2=0.157680$



ID#22 m/z:57.00 Name:C35
 $f(x)=849846.676923*x-16343.938462$
 $rr2=0.950691$

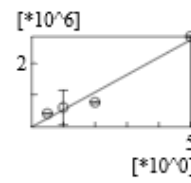


ID#:23 m/z:57.00 Name:C37
 $f(x)=719680.282051*x-65675.474359$
 $r^2=0.953712$



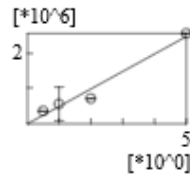
#	Conc. (mg/L)	Mean A or H
1	0.500	520125.00
2	1.000	754558.50
3	2.000	900673.00
4	5.000	3679224.00

ID#:24 m/z:57.00 Name:C38
 $f(x)=560688.338462*x-49874.969231$
 $r^2=0.963238$



#	Conc. (mg/L)	Mean A or H
1	0.500	387114.00
2	1.000	579585.00
3	2.000	744839.00
4	5.000	2854813.00

ID#:25 m/z:57.00 Name:C39
 $f(x)=509089.441026*x-56712.187179$
 $r^2=0.967318$



#	Conc. (mg/L)	Mean A or H
1	0.500	321273.00
2	1.000	524268.50
3	2.000	680451.00
4	5.000	2574419.00

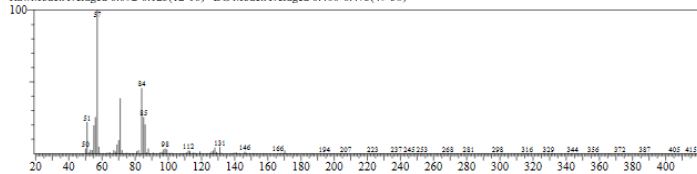
Anexo 5. Espectros de masas de las muestras de lixiviados de suelos contaminados con volúmenes crecientes de petróleo

- 25 mL – ST

GCMS Library

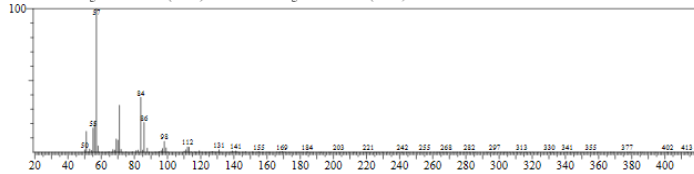
<< Target >>

Line#:1 R.Time:6.108(Scan#:14) MassPeaks:210 BasePeak:57.05(4001561)
RawMode:Averaged 6.092-6.125(12-16) BG Mode:Averaged 6.400-6.475(49-58)



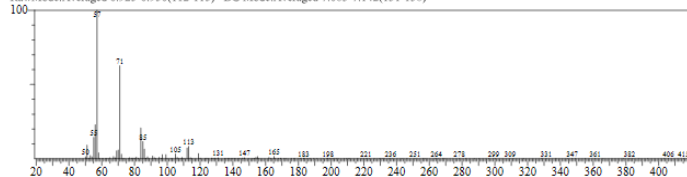
<< Target >>

Line#:2 R.Time:6.267(Scan#:33) MassPeaks:218 BasePeak:57.05(2114035)
RawMode:Averaged 6.242-6.292(30-36) BG Mode:Averaged 6.375-6.442(46-54)



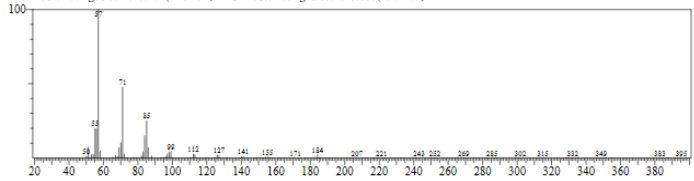
<< Target >>

Line#:3 R.Time:6.933(Scan#:113) MassPeaks:171 BasePeak:57.05(2128855)
RawMode:Averaged 6.925-6.950(112-115) BG Mode:Averaged 7.083-7.142(131-138)



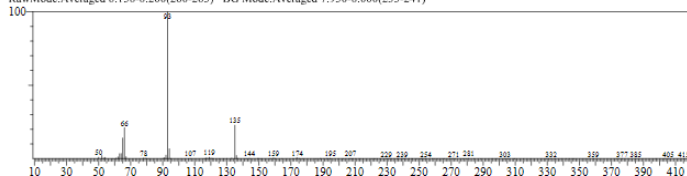
<< Target >>

Line#:4 R.Time:7.242(Scan#:150) MassPeaks:149 BasePeak:57.05(3398713)
RawMode:Averaged 7.225-7.258(148-152) BG Mode:Averaged 7.625-7.700(196-205)



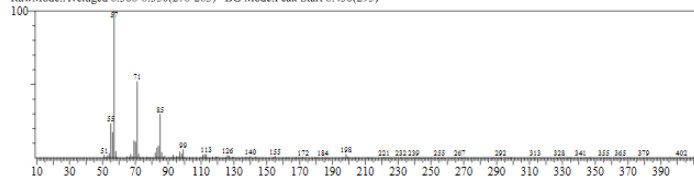
<< Target >>

Line#:5 R.Time:8.175(Scan#:262) MassPeaks:134 BasePeak:93.00(2067685)
RawMode:Averaged 8.158-8.200(260-265) BG Mode:Averaged 7.950-8.000(235-241)



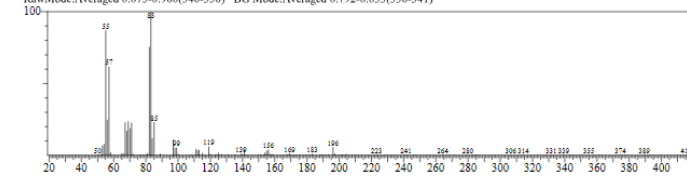
<< Target >>

Line#:6 R.Time:8.325(Scan#:280) MassPeaks:162 BasePeak:57.05(1567818)
RawMode:Averaged 8.308-8.350(278-283) BG Mode:Peak Start 8.450(295)



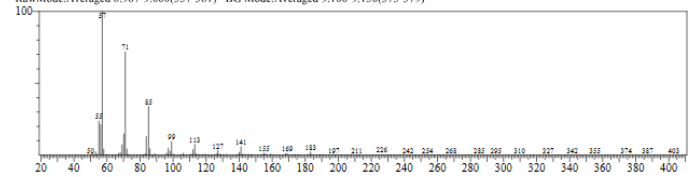
<< Target >>

Line#:7 R.Time:8.883(Scan#:347) MassPeaks:140 BasePeak:83.10(527885)
RawMode:Averaged 8.875-8.908(346-350) BG Mode:Averaged 8.792-8.833(336-341)



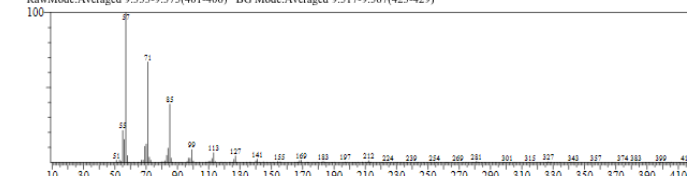
<< Target >>

Line#:8 R.Time:8.983(Scan#:359) MassPeaks:173 BasePeak:57.05(1234440)
RawMode:Averaged 8.967-9.000(357-361) BG Mode:Averaged 9.100-9.150(373-379)



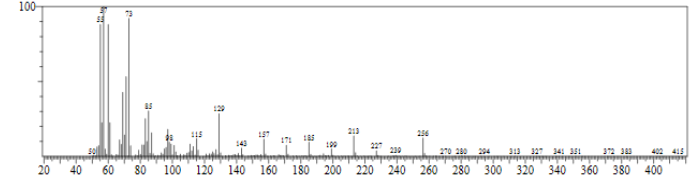
<< Target >>

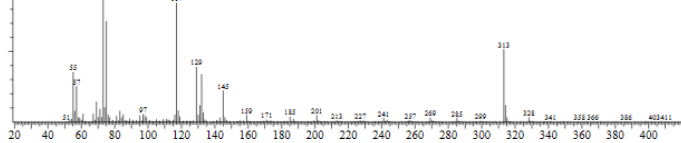
Line#:9 R.Time:9.367(Scan#:405) MassPeaks:167 BasePeak:57.05(1480145)
RawMode:Averaged 9.333-9.375(401-406) BG Mode:Averaged 9.517-9.567(423-429)



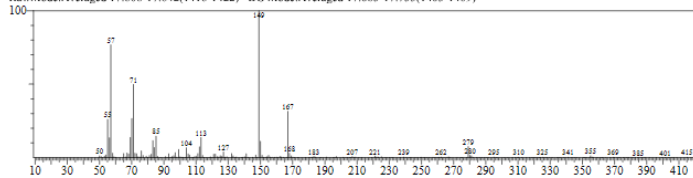
<< Target >>

Line#:10 R.Time:13.558(Scan#:908) MassPeaks:239 BasePeak:57.05(948770)
RawMode:Averaged 13.542-13.575(906-910) BG Mode:Averaged 13.392-13.458(888-896)

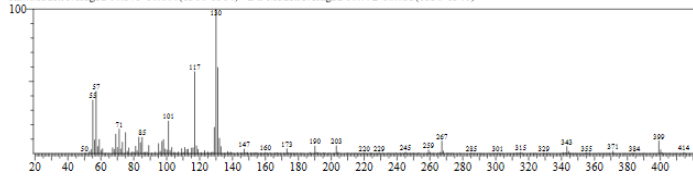




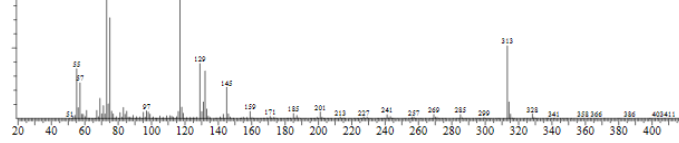
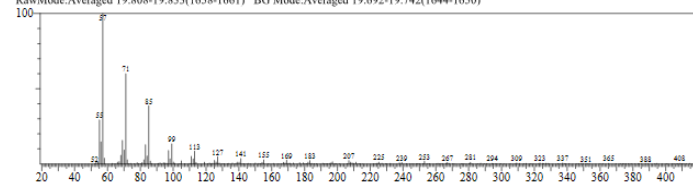
<< Target >>
 Line# 13 R.Time:17.825(Scan#:1420) MassPeaks:255 BasePeak:149.00(1031806)
 RawMode:Averaged 17.808-17.842(1418-1422) BG Mode:Averaged 17.683-17.733(1403-1409)



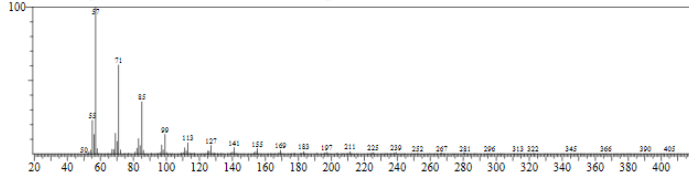
<< Target >>
 Line# 15 R.Time:18.592(Scan#:1512) MassPeaks:261 BasePeak:130.00(856176)
 RawMode:Averaged 18.575-18.608(1510-1514) BG Mode:Averaged 18.792-18.833(1536-1541)



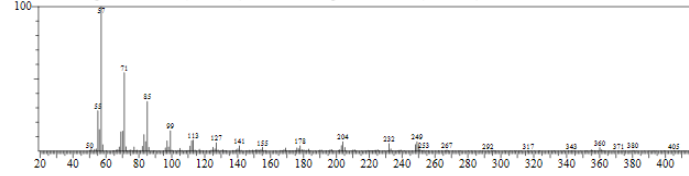
<< Target >>
 Line# 17 R.Time:19.825(Scan#:1660) MassPeaks:226 BasePeak:57.05(677995)
 RawMode:Averaged 19.808-19.833(1658-1661) BG Mode:Averaged 19.692-19.742(1644-1650)



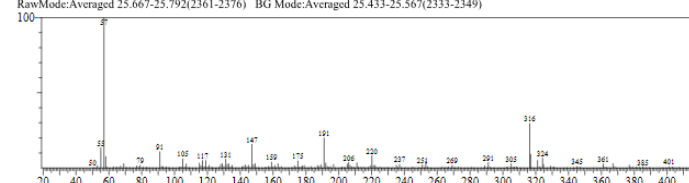
<< Target >>
 Line# 14 R.Time:18.058(Scan#:1448) MassPeaks:224 BasePeak:57.05(1053594)
 RawMode:Averaged 18.050-18.075(1447-1450) BG Mode:Averaged 18.183-18.242(1463-1470)



<< Target >>
 Line# 16 R.Time:18.667(Scan#:1521) MassPeaks:251 BasePeak:57.05(894796)
 RawMode:Averaged 18.658-18.683(1520-1523) BG Mode:Averaged 18.758-18.808(1532-1538)



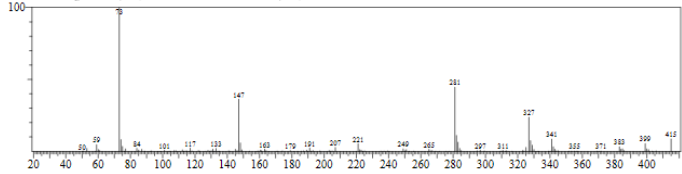
<< Target >>
 Line# 18 R.Time:25.767(Scan#:2373) MassPeaks:364 BasePeak:57.00(10601577)
 RawMode:Averaged 25.667-25.792(2361-2376) BG Mode:Averaged 25.433-25.567(2333-2349)



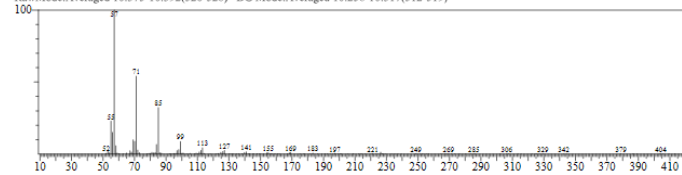
• 25 mL – CT

GCMS Library

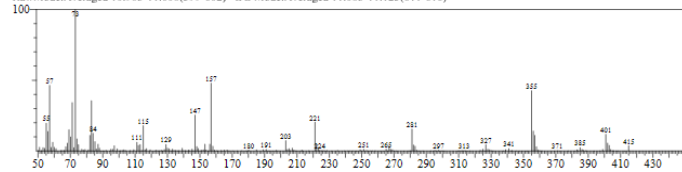
<< Target >>
 Line# 1 R.Time:9.342(Scan#:402) MassPeaks:149 BasePeak:73.05(773209)
 RawMode:Single 9.342(402) BG Mode:Peak Start 9.258(392)



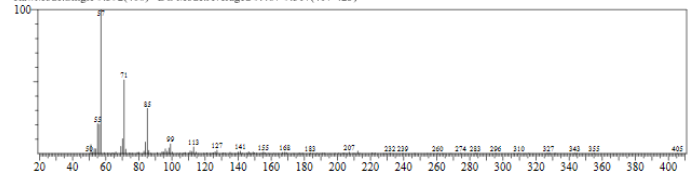
<< Target >>
 Line# 3 R.Time:10.383(Scan#:527) MassPeaks:154 BasePeak:57.10(759814)
 RawMode:Averaged 10.375-10.392(526-528) BG Mode:Averaged 10.258-10.317(512-519)



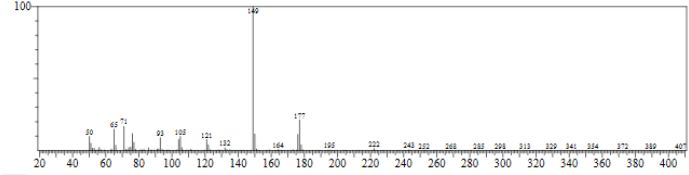
<< Target >>
 Line# 5 R.Time:11.000(Scan#:601) MassPeaks:242 BasePeak:73.05(499484)
 RawMode:Averaged 10.983-11.008(599-602) BG Mode:Averaged 11.083-11.125(611-616)



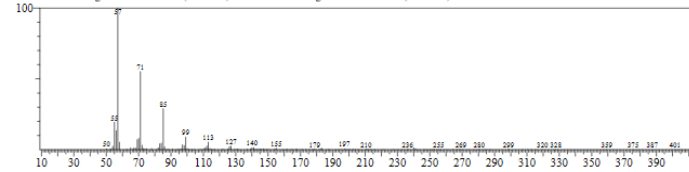
<< Target >>
 Line# 2 R.Time:9.392(Scan#:408) MassPeaks:137 BasePeak:57.05(537815)
 RawMode:Single 9.392(408) BG Mode:Averaged 9.467-9.517(417-423)

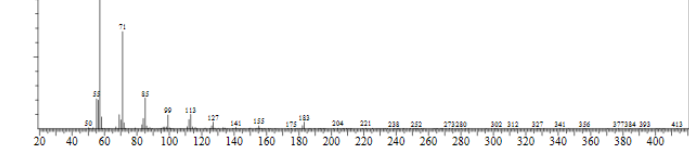


<< Target >>
 Line# 4 R.Time:10.433(Scan#:533) MassPeaks:171 BasePeak:149.00(1373213)
 RawMode:Averaged 10.425-10.442(532-534) BG Mode:Averaged 10.525-10.558(544-548)

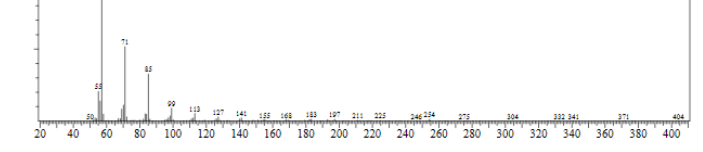
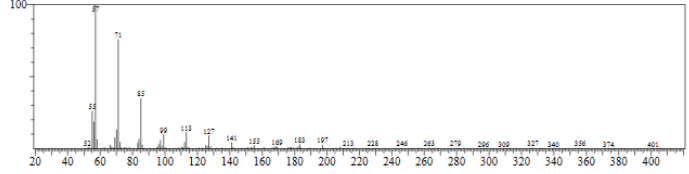


<< Target >>
 Line# 6 R.Time:11.325(Scan#:640) MassPeaks:167 BasePeak:57.10(633413)
 RawMode:Averaged 11.308-11.333(638-641) BG Mode:Averaged 11.233-11.275(629-634)

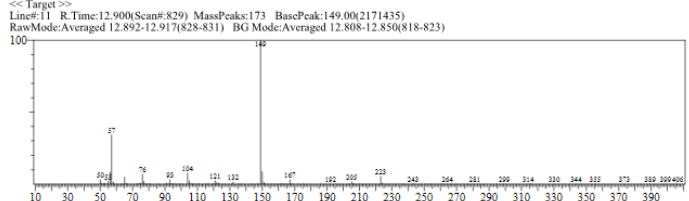
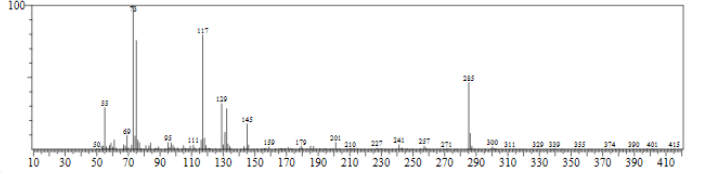




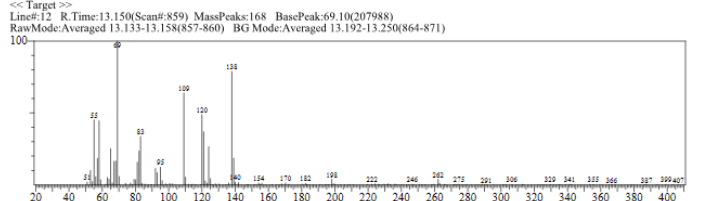
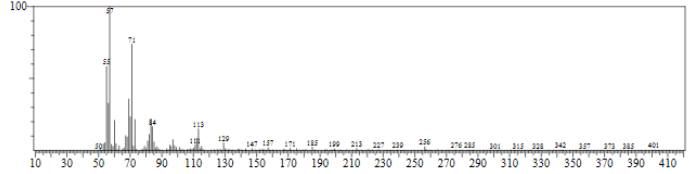
<< Target >>
Line#9 R.Time:12.308(Scan#:758) MassPeaks:159 BasePeak:57.10(380049)
RawMode:Averaged 12.300-12.325(757-760) BG Mode:Averaged 12.133-12.175(737-742)



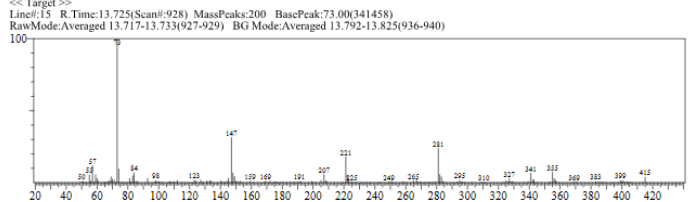
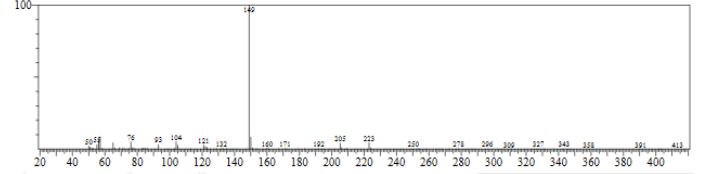
<< Target >>
Line#10 R.Time:12.658(Scan#:800) MassPeaks:215 BasePeak:73.05(378992)
RawMode:Averaged 12.650-12.683(799-803) BG Mode:Averaged 12.567-12.608(789-794)



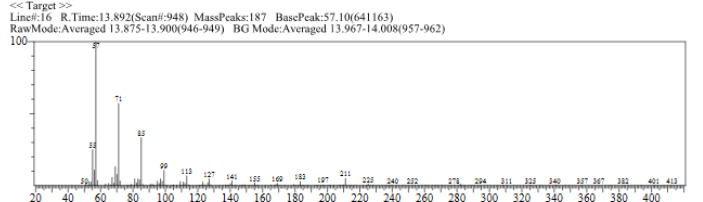
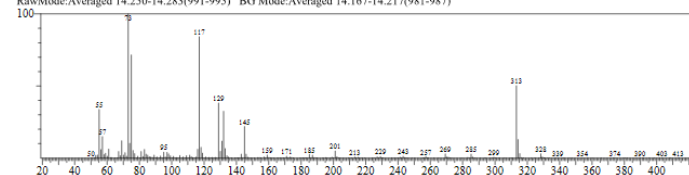
<< Target >>
Line#11 R.Time:12.900(Scan#:829) MassPeaks:173 BasePeak:149.00(2171435)
RawMode:Averaged 12.892-12.917(828-831) BG Mode:Averaged 12.808-12.850(818-823)



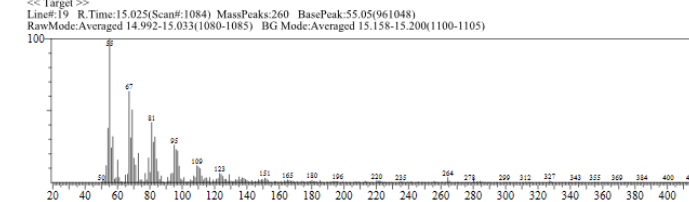
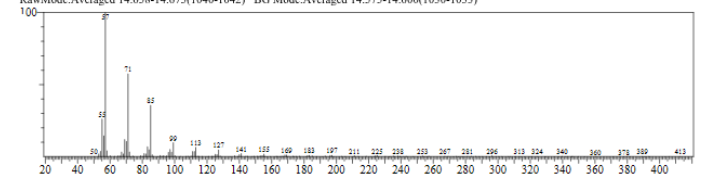
<< Target >>
Line#12 R.Time:13.150(Scan#:859) MassPeaks:168 BasePeak:69.10(207988)
RawMode:Averaged 13.133-13.158(857-860) BG Mode:Averaged 13.192-13.250(864-871)



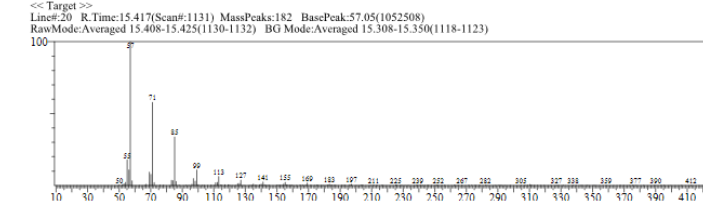
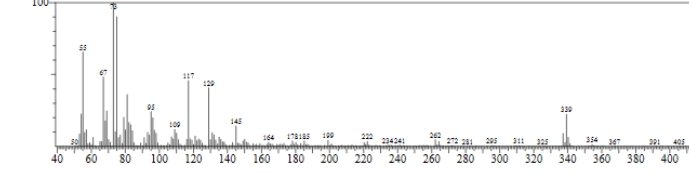
<< Target >>
Line#13 R.Time:13.617(Scan#:915) MassPeaks:220 BasePeak:57.05(379238)
RawMode:Averaged 13.600-13.633(913-917) BG Mode:Averaged 13.517-13.558(903-908)



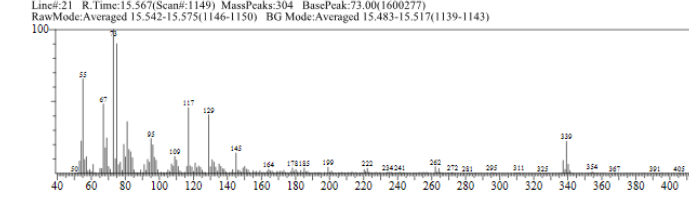
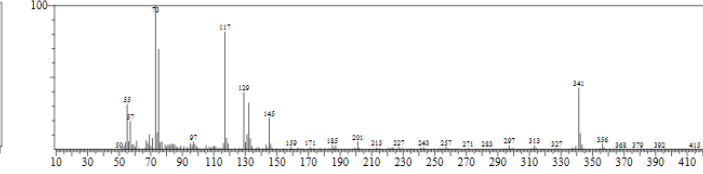
<< Target >>
Line#14 R.Time:13.683(Scan#:923) MassPeaks:173 BasePeak:149.00(1130742)
RawMode:Averaged 13.667-13.692(921-924) BG Mode:Averaged 13.800-13.842(937-942)



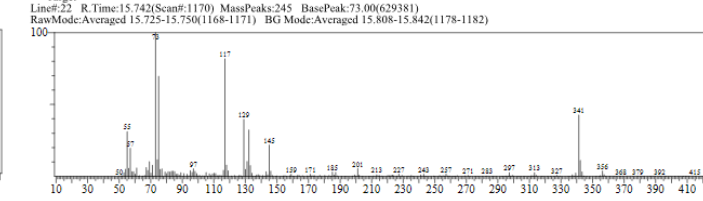
<< Target >>
Line#15 R.Time:13.725(Scan#:928) MassPeaks:200 BasePeak:73.00(341458)
RawMode:Averaged 13.717-13.733(927-929) BG Mode:Averaged 13.792-13.825(936-940)



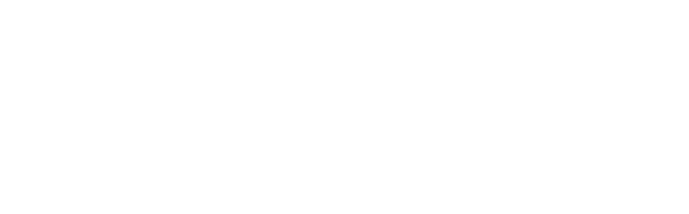
<< Target >>
Line#16 R.Time:13.892(Scan#:948) MassPeaks:187 BasePeak:57.10(641163)
RawMode:Averaged 13.875-13.900(946-949) BG Mode:Averaged 13.967-14.008(957-962)



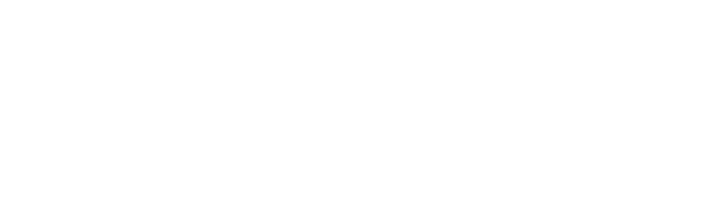
<< Target >>
Line#17 R.Time:14.267(Scan#:993) MassPeaks:249 BasePeak:73.00(2651218)
RawMode:Averaged 14.250-14.283(991-995) BG Mode:Averaged 14.167-14.217(981-987)



<< Target >>
Line#18 R.Time:14.667(Scan#:1041) MassPeaks:183 BasePeak:57.10(764313)
RawMode:Averaged 14.658-14.675(1040-1042) BG Mode:Averaged 14.575-14.600(1030-1033)



<< Target >>
Line#19 R.Time:15.025(Scan#:1084) MassPeaks:260 BasePeak:55.05(961048)
RawMode:Averaged 14.992-15.033(1080-1085) BG Mode:Averaged 15.158-15.200(1100-1105)



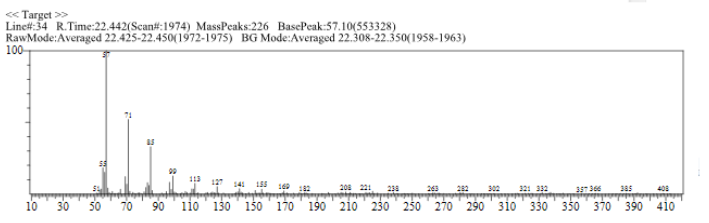
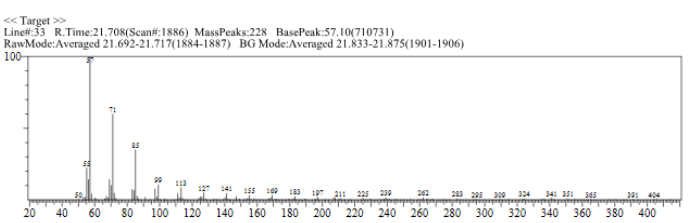
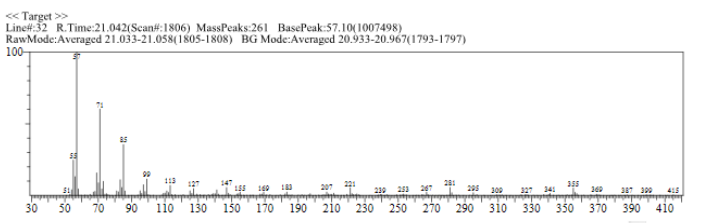
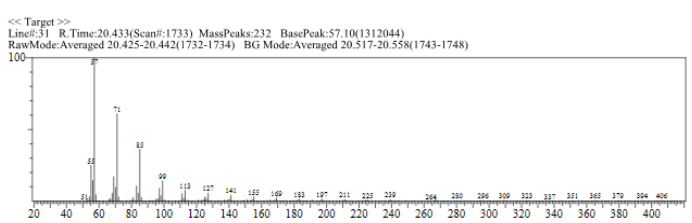
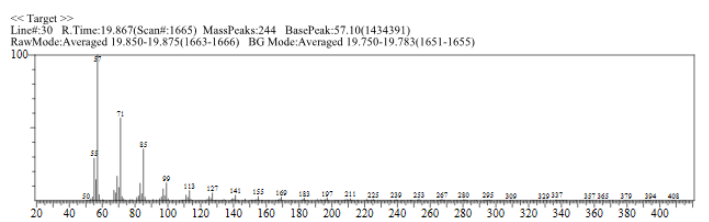
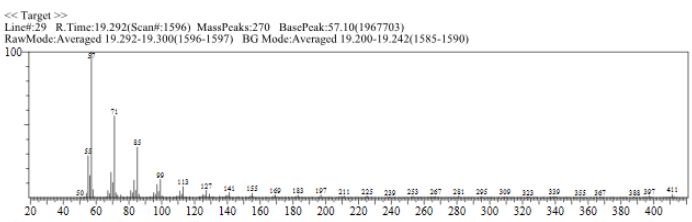
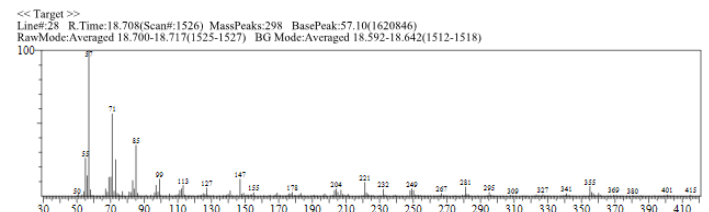
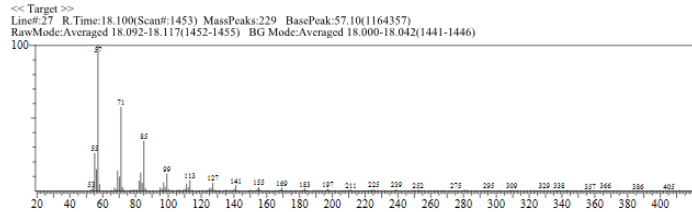
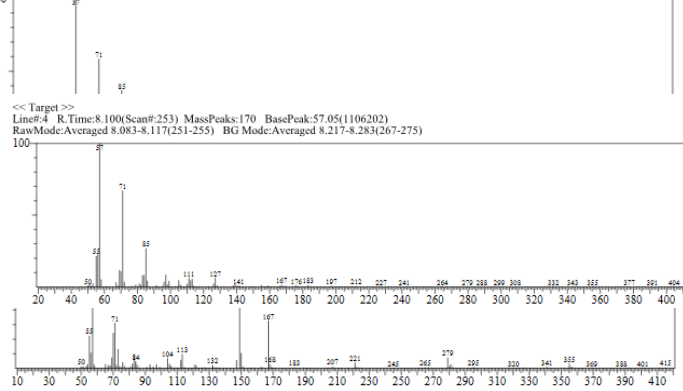
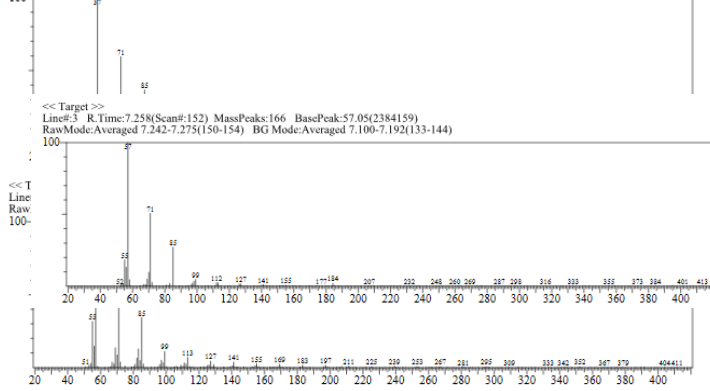
<< Target >>
Line#20 R.Time:15.417(Scan#:1131) MassPeaks:182 BasePeak:57.05(1052508)
RawMode:Averaged 15.408-15.425(1130-1132) BG Mode:Averaged 15.308-15.350(1118-1123)



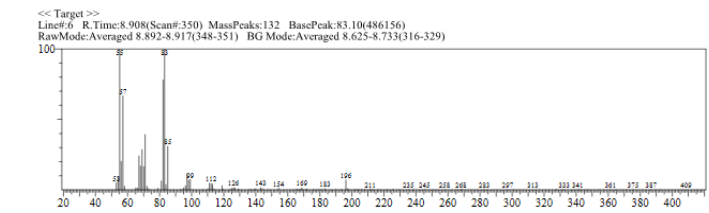
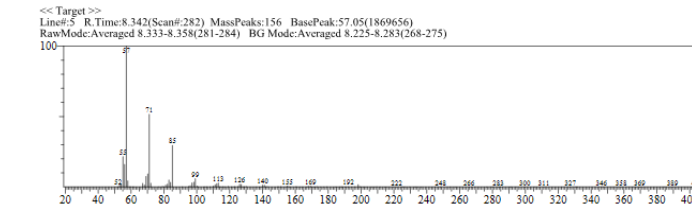
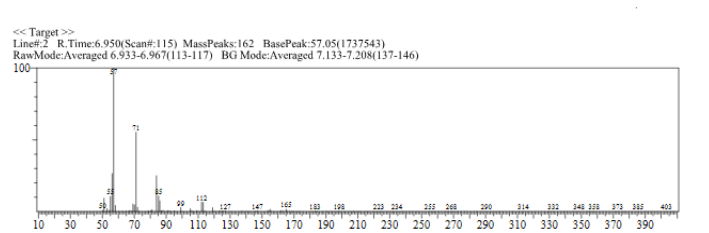
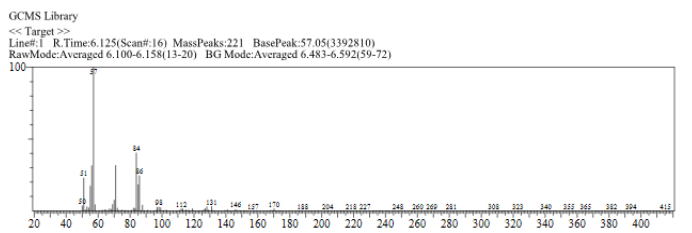
<< Target >>
Line#21 R.Time:15.567(Scan#:1149) MassPeaks:304 BasePeak:73.00(1600277)
RawMode:Averaged 15.542-15.575(1146-1150) BG Mode:Averaged 15.483-15.517(1139-1143)

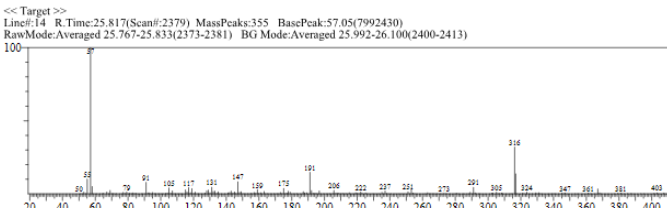
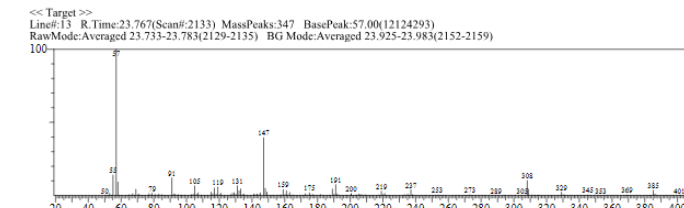
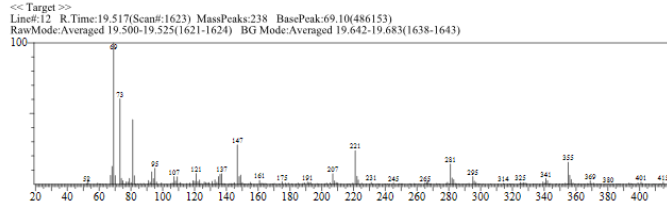
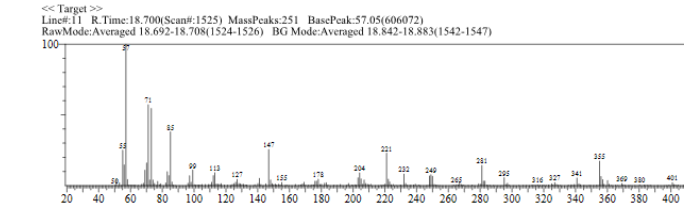
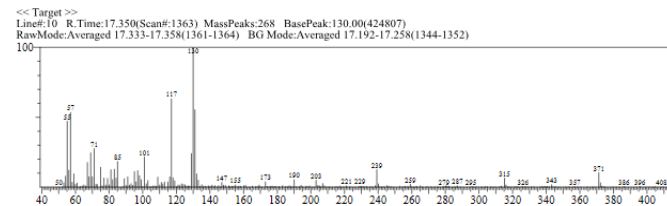
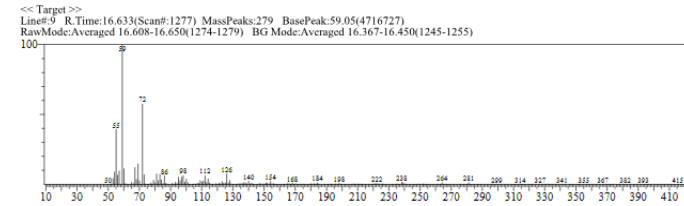
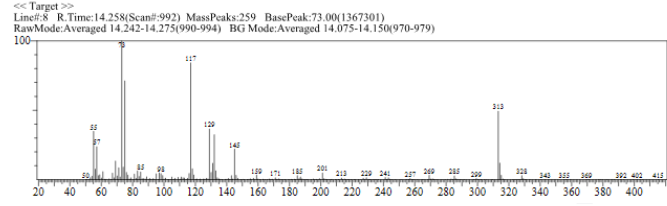
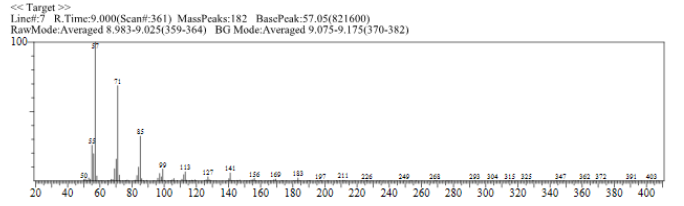
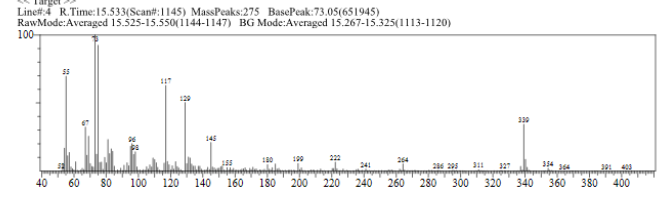
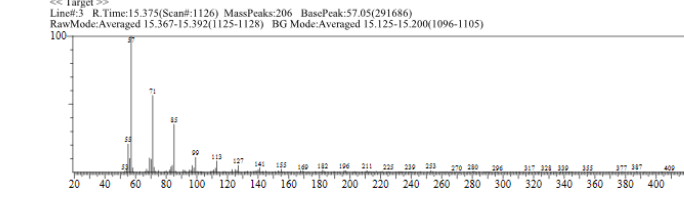


<< Target >>
Line#22 R.Time:15.742(Scan#:1170) MassPeaks:245 BasePeak:73.00(629381)
RawMode:Averaged 15.725-15.750(1168-1171) BG Mode:Averaged 15.808-15.842(1178-1182)

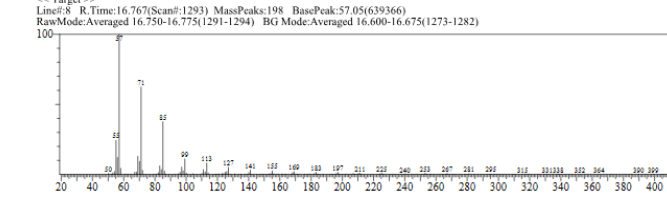
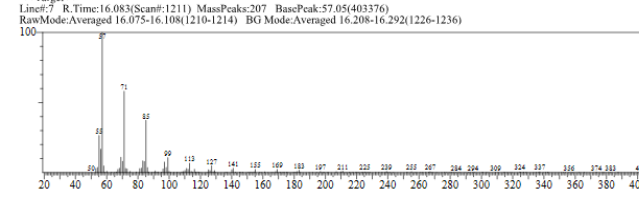
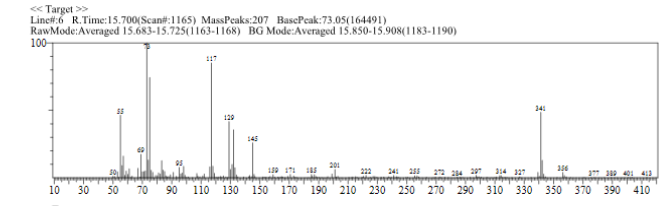
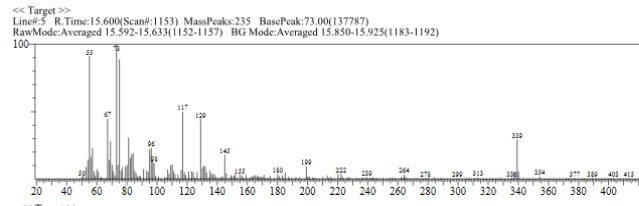
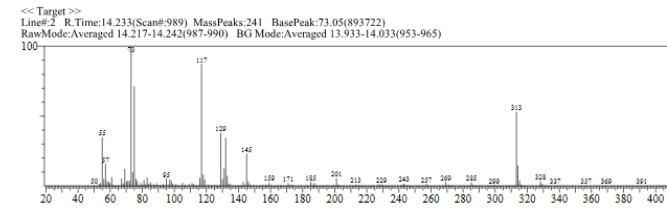
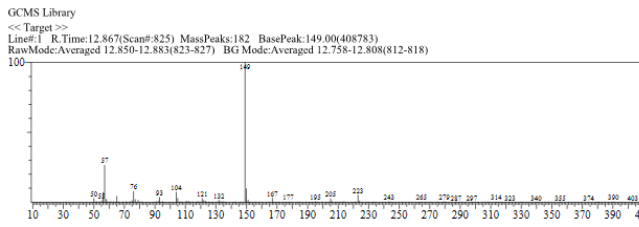


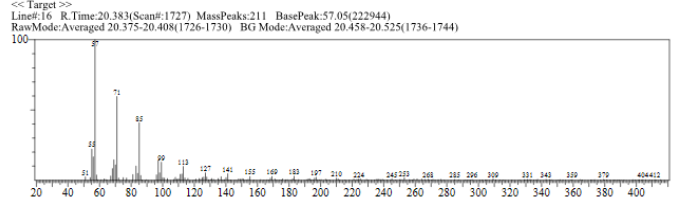
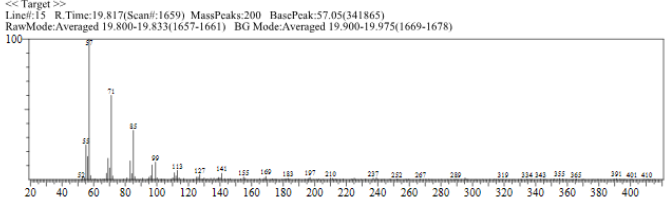
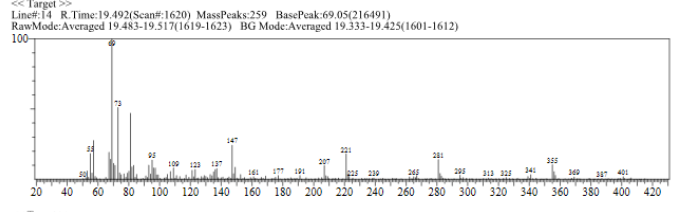
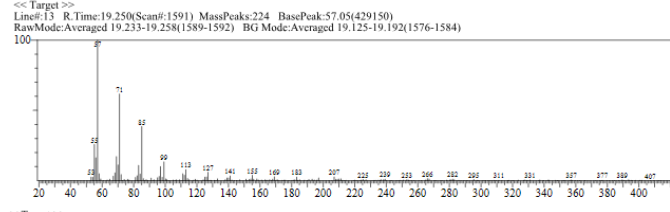
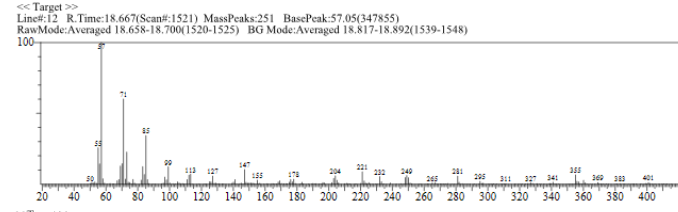
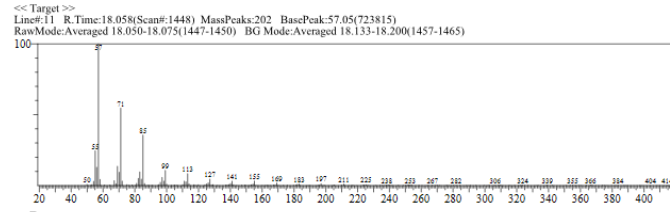
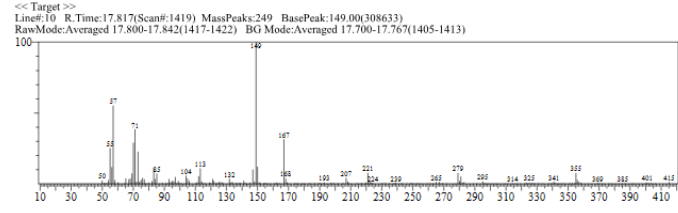
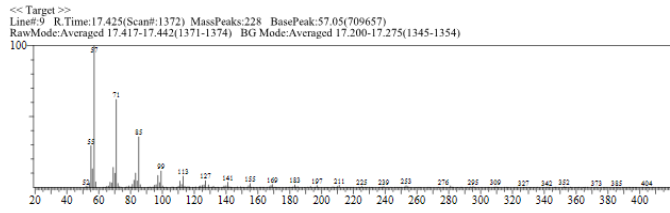
• 50 mL – ST





• 50 mL – CT





Anexo 6. Certificado participación en modo póster del III Congreso Colombiano de Restauración Ecológica

CONGRESO COLOMBIANO DE RESTAURACION ECOLOGICA
un compromiso de pais

Certifica que:

MARIA ANGELICA CORZO RONCANCIO

Participó en calidad de **PÓSTER** en el
III CONGRESO COLOMBIANO DE RESTAURACION ECOLOGICA
Realizado en el Recinto Quirama, en el municipio de Carmen de Viboral, Antioquia.
Los días 19, 20 y 21 de octubre de 2016.

Mauricio Aguilar
Mauricio Aguilar
Presidente
Red Colombiana de Restauración Ecológica

Hernando Garcia
Hernando Garcia
Director (e)
Instituto Humboldt

Jorge A. Calle D'Aleman
Jorge A. Calle D'Aleman
Decano Facultad de Ingeniería
Universidad Católica de Oriente

Jose Ignacio Barrera
Jose Ignacio Barrera
Presidente
Sociedad Iberoamericana y del Caribe de Restauración Ecológica

SIACRE
DUCCO Universidad Católica de Oriente
HUMBOLDT
RED COLOMBIANA DE RESTAURACION ECOLOGICA