



UNIVERSIDAD DE IXTLAHUACA, CUI

INCORPORADA A LA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

Clave 091-Q

Determinación de la concentración de los hidrocarburos policíclicos aromáticos naftaleno, fenantreno, fluoranteno y pireno por fluorescencia de excitación, emisión y sincrónica en medios altamente salinos

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A

Gabriela Nava Solís

DIRIGIDA POR:

Tutor Académico: Dr. en C. Leobardo M. Gómez Oliván (UAEMex)

Tutora Externa: Dra. en C. Keila Isaac Olivé (UAEMex)

Asesora: Dra. en C. Ninfa Ramírez Durán (UAEMex)

Ixtlahuaca, Estado de México.

Noviembre, 2017.





VOTO APROBATORIO

Toda vez que el trabajo de evaluación profesional, ha cumplido con los requisitos normativos y metodológicos, para continuar con los trámites correspondientes que sustentan la evaluación profesional, de acuerdo con los siguientes datos:

| | | | | | |
|--|--|------------------------|--------------------------------|------------|-----------|
| Nombre del pasante | GABRIELA NAVA SOLIS | | | | |
| Licenciatura | QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO | N° de cuenta | 1161431 | Generación | 2011-2016 |
| Opción | Tesis | Escuela de Procedencia | Universidad de Ixtlahuaca, CUI | | |
| Nombre del Trabajo para Evaluación Profesional | Determinación de la concentración de los hidrocarburos policíclicos aromáticos naftaleno, fenantreno, fluoranteno y pireno por fluorescencia de excitación, emisión y sincrónica en medios altamente salinos | | | | |

| | NOMBRE | FIRMA DE VOTO APROBATORIO | FECHA |
|-------------------------|------------------------------------|---------------------------|-------------|
| ASESOR | Dr. en C. Leobardo M. Gómez Oliván | | 4 Sept 2017 |
| COASESOR ASESOR EXTERNO | Dra. en C. Keila Isaac Olive | | 5 Sept 2017 |

| | NOMBRE | FIRMA Y FECHA DE RECEPCIÓN DE NOMBRAMIENTO | FIRMA Y FECHA DE ENTREGA DE OBSERVACIONES | FIRMA Y FECHA DEL VOTO APROBATORIO |
|---------|------------------------------------|--|---|------------------------------------|
| REVISOR | M. en C. Jaquelina López Iturbe | 07-Sept-2017 | 25-Sept-2017 | |
| REVISOR | Q. José Fernando Fuentes Gutiérrez | 07/09/2017 | 25/09/2017 | |

Derivado de lo anterior, se le **AUTORIZA LA REPRODUCCIÓN DEL TRABAJO DE EVALUACIÓN PROFESIONAL** de acuerdo con las especificaciones del anexo 8.7 "Requisitos para la presentación del examen de evaluación profesional".

| | NOMBRE | FIRMA | FECHA |
|--------------------------------|-------------------------------------|-------|-------|
| ÁREA DE EVALUACIÓN PROFESIONAL | Dr. En CQB Daniel Leocadio Victoria | | |



Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología Médica y Ambiental (Cuerpo Académico Salud Ambiental) y en el Laboratorio de Fotomedicina, Biofotónica y Espectroscopia Láser de Pulsos Ultracortos (Cuerpo Académico Física Médica), ambos de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMex), como parte las actividades del proyecto de investigación : *“Estudio de la degradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos por actinomicetos halo-alcalotolerantes utilizando métodos de espectrofluorimetría”*, llevado a cabo por la *“Red-Hispano-Mexicana para la búsqueda y aprovechamiento de microorganismos extremófilos con aplicaciones ambientales y biomédicas”*, financiada por la Secretaria de Educación Pública a través del Programa para el Desarrollo Profesional Docente para el Tipo Superior (PRODEP), en su convocatoria para la integración de Redes temáticas de Colaboración Académica PRODEP 2015. El proyecto anteriormente mencionado está registrado ante la Secretaria de Investigación y Estudios Avanzados de la UAEMex con la clave: 4035/2016RED

AGRADECIMIENTOS

Agradezco principalmente a Dios por la vida, por las bendiciones que me ha dado para llegar a hasta donde estoy, ya que es Él, quien me permite levantarme todos los días y vivir esta maravillosa vida que ha planeado para mí.

A mis padres por su apoyo incondicional en la parte moral y económica. A mi hermana Rosi por no darse por vencida cuando estaba molesta cuando las cosas no me salían o cuando estaba estresada por la escuela. A mis hermanos Juan y Héctor por el apoyo que siempre me brindaron, día a día, en el transcurso de cada año de mi carrera universitaria y quienes me enseñaron que, con el trabajo y perseverancia se encuentra el éxito profesional.

A la Dra. Keila y Dra. Ninfa por darme la oportunidad de realizar este trabajo y compartir sus conocimientos, así como también por haber tenido la paciencia para guiarme durante todo el desarrollo de la tesis, son excelentes profesionistas y personas que admiro mucho.

A mis amigos por acompañarme en todos los momentos felices y tristes en la Universidad y especialmente a mi amiga de estudios Laura Leticia por compartir este gran logro juntas, por su apoyo, su valiosa amistad y compañerismo. Por fin lo logramos y cerramos una etapa más en nuestras vidas como profesionistas.

Gracias!!!

ÍNDICE

| Contenido | Página |
|--|-----------|
| Resumen | |
| Capítulo 1: Introducción | 1 |
| 1.1. Antecedentes | 1 |
| 1.2. Planteamiento del problema | 4 |
| 1.3. Justificación | 6 |
| 1.4. Hipótesis | 7 |
| 1.5. Objetivos | 8 |
| Capítulo 2: Marco teórico | 10 |
| 2.1. Fluorescencia | 10 |
| 2.2. Espectrofluorimetría de excitación, emisión y sincrónica | 12 |
| 2.2.1 Variables que afectan la espectroscopia de fluorescencia | 13 |
| 2.3. Hidrocarburos | 14 |
| 2.3.1 Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos | 15 |
| 2.4. Contaminación con Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos en México | 17 |
| 2.5. Métodos Analíticos en Química Analítica | 19 |
| 2.5.1 Validación de un método analítico | 19 |
| 2.6. Métodos Analíticos para la determinación de HPA's | 21 |
| 2.6.1. Espectrometría de fluorescencia | 21 |
| 2.6.2. Cromatografía de gases | 21 |
| 2.6.3. Cromatografía líquida | 21 |
| 2.7. Actinomicetos <i>Kocuria rosea</i> , <i>Microbacterium testaceum</i> , <i>Kocuria palustris</i> | 22 |
| 2.7.1. Actinomicetos: | 22 |
| 2.7.2. <i>Kocuria rosea</i> | 22 |
| 2.7.3. <i>Microbacterium testaceum</i> | 23 |
| 2.7.4. <i>Kocuria palustris</i> | 23 |
| 2.7.5. Bacterias haloalcalotolerantes | 23 |

| | |
|---|-----------|
| Capítulo 4: Resultados y Discusión | 35 |
| 4.1. Reactivación de las cepas | 35 |
| 4.2. Determinación de las condiciones experimentales para la determinación de los hidrocarburos por fluorescencia | 35 |
| 4.2.1 Conclusiones parciales | 55 |
| 4.3 Sensibilidad y límite de detección en la determinación de fenantreno, fluoranteno y pireno por fluorescencia | 56 |
| 4.3.1 Sensibilidad | 56 |
| 4.3.2. Límite de detección | 64 |
| 4.3.3 Conclusiones parciales | 77 |
| 4.4. Determinación de la concentración residual de fenantreno, fluoranteno y pireno en cultivos de <i>Kocuria rosea</i> por fluorescencia de excitación, emisión y sincrónica | 78 |
| 4.4.1 Conclusiones parciales | 85 |
| Capítulo 5: Conclusiones | 86 |
| Capítulo 6: Referencias | 89 |
| Anexos: Presentaciones del trabajo en Congresos | 98 |

RESUMEN

Introducción: Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA), como el fenantreno, fluoranteno y pireno son compuestos que pueden cuantificarse por fluorescencia debido a su alto rendimiento cuántico. Las bacterias haloalcalotolerantes toleran amplios rangos de concentraciones de NaCl y de pH, por lo que son potencialmente útiles en la biorremediación de ambientes salinos contaminados con HPA. Sin embargo, los estudios enfocados a la búsqueda de la capacidad biorremediadora de estas bacterias no suelen utilizar a la fluorescencia molecular como técnica de detección, probablemente porque la salinidad y alcalinidad afectan severamente a la señal de fluorescencia. Recientemente se determinó satisfactoriamente la concentración residual de antraceno en cultivos salinos de las actinobacterias haloalcalotolerantes *Kocuria rosea*, *Microbacterium testaceum* y *Kocuria palustris* mediante fluorescencia de excitación, emisión y sincrónica. En este trabajo se amplió este estudio al fenantreno, fluoranteno y pireno. **Metodología:** Primero se determinaron las condiciones experimentales óptimas para la determinación de cada hidrocarburo por cada modalidad de fluorescencia (λ_{exc} , λ_{emi} , $\Delta\lambda$, y λ_{sinc}). Seguidamente se determinó, para cada modalidad de fluorescencia, la sensibilidad de cada hidrocarburo en medio mínimo de sales suplementado con 3% y 10% de NaCl y pH 8. Luego se determinó el límite de detección de cada hidrocarburo en cada modalidad de fluorescencia, utilizando como matriz cultivos de las actinobacterias anteriormente mencionadas. Finalmente, se cuantificó la concentración residual de cada hidrocarburo en cultivos de *Kocuria rosea*. **Resultados:** Las condiciones óptimas de determinación de cada hidrocarburo en cada modalidad de fluorescencia fueron fenantreno ($\lambda_{exc} = 252$ nm, $\lambda_{emi} = 363$ nm, $\Delta\lambda = 70$ nm, $\lambda_{sinc} = 293$ nm), fluoranteno ($\lambda_{exc} = 285$ nm, $\lambda_{emi} = 460$ nm, $\Delta\lambda = 80$ nm, $\lambda_{sinc} = 365$ nm) y pireno ($\lambda_{exc} = 334$ nm, $\lambda_{emi} = 393$ nm, $\Delta\lambda = 40$ nm, $\lambda_{sinc} = 334$ nm). Los valores de sensibilidad obtenidos varían en el rango (867 a 46213) ng⁻¹, siendo las más altas las del pireno. La modalidad más sensible para el fluoranteno y el pireno fue la excitación, en el caso del fenantreno fue la sincrónica. En todos los casos las sensibilidades en el medio MSM-3%

fueron de 1.2 a 3.0 veces mayor que la del medio MSM-10%, evidenciando el efecto de la salinidad. Los límites de detección de fenantreno estuvieron en los rangos: excitación (27-62) ppb, emisión (27-62) ppb, sincronos (102-215) ppb. Los del fluoranteno fueron: excitación (69-143) ppb, emisión (104-147) ppb, sincronos (211-502) ppb; y los del pireno fueron: excitación (10-21) ppb emisión (10-29) ppb, sincronos (7-11) ppb. Se propone que el fenantreno se determine por fluorescencia de excitación, y en el caso del pireno puede utilizarse cualquiera de las tres modalidades. Para el fluoranteno se propone ampliar el estudio de fluorescencia sincrónica en busca de otra longitud de onda sincrónica con otro $\Delta\lambda$ que permita la determinación de este hidrocarburo sin interferencia de la matriz. No hubo evidencias de que la actinobacteria *Kocuria rosea* biotransformara ninguno de los hidrocarburos estudiados por ninguno de los tres métodos de fluorescencia empleados.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 ANTECEDENTES

La fluorescencia es un proceso de emisión donde las moléculas son excitadas por absorción de radiación electromagnética. Las especies excitadas se relajan a un estado fundamental, liberando su exceso de energía en forma de fotones [1]. Una de las características de los métodos de fluorescencia es su sensibilidad inherente, con límites de detección que son, a menudo, tres órdenes de magnitud más pequeños que los encontrados en espectroscopía de absorción. Los límites de detección típicos son del orden de partes por billón [1]. No obstante, los métodos de fluorescencia se aplican mucho menos que los métodos de absorción debido a que un número inferior de compuestos químicos puede fluorescer. Dentro de los compuestos que tienen la propiedad de fluorescer se encuentran los Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos (HPA's) como el naftaleno, fenantreno, fluoranteno y pireno.

Los HPA son un grupo de contaminantes orgánicos, químicamente estables y tóxicos que están distribuidos a lo largo de todo el planeta. Algunos han sido identificados como carcinogénicos y mutagénicos, por lo tanto, su eliminación del ambiente es de gran interés [2,3]. En México, la concentración de estos compuestos en el medio ambiente está regulada desde marzo de 2005, cuando se publicó la Norma Oficial Mexicana NOM-SEMARNAT/SS-2003, que establece los límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos, y las especificaciones para su caracterización y remediación. Esta norma fue revisada y actualizada en 2012 [4, 5].

La eliminación microbiana de estos contaminantes es una de las estrategias que más se estudia, ya que la misma se considera limpia, sustentable y ecológica [6-8]. Dentro de los microorganismos estudiados para este fin se encuentran las actinobacterias [9-11]. Como los ecosistemas contaminados por HPA's tienen

características fisicoquímicas típicas de ambientes extremos (altos y bajos valores de pH, altos valores de salinidad, etc), el uso de microorganismos halotolerantes (los que pueden vivir en ausencia o presencia de sal), alcalotolerantes (pueden vivir en presencia de valores de pH en el rango 8-11) es más deseado [9-11]. Sin embargo, como la alta salinidad y alcalinidad en ecosistemas pueden venir acompañadas una de la otra, la utilización de microorganismos haloalcalotolerantes (combinan las características de los halotolerantes y alcalotolerantes) es incluso más ventajoso [9-11].

El procedimiento a nivel de laboratorio para estudiar la capacidad transformadora, y potencialmente de degradación, de microorganismos es *in vitro* [7-13]. Es decir, se prepara un medio de cultivo que contiene al hidrocarburo en concentración conocida y que presenta las condiciones de salinidad y pH propias del ecosistema a tratar, se inocula al microorganismo en este medio (el cual probablemente es salino y alcalino). La concentración residual del hidrocarburo en el medio se determina a diferentes tiempos para monitorear su posible disminución. Los métodos más utilizados para la determinación de HPA presentes en cualquier matriz son GC y HPLC [14-17]. A pesar de la gran sensibilidad de los HPA en métodos de fluorescencia, esta técnica no se emplea comúnmente en este tipo de estudios (a menos que este acoplada a HPLC), probablemente por la presencia de efecto matriz, y porque la sensibilidad de la señal de fluorescencia disminuye considerablemente en presencia de alta salinidad [18].

Recientemente, Lara-Severino y colaboradores, estudiaron la capacidad biotransformadora de antraceno en 7 cepas haloalcalotolerantes de actinobacterias aisladas de suelos cercanos a áreas con actividad petrolera en Veracruz, México [9-11]. El medio de cultivo utilizado para el experimento *in vitro* fue el medio mínimo de sales (MSM) suplementado con 3% ó 10% de NaCl, según las necesidades fisiológicas de la cepa en estudio, ajustados todos a pH 8. A pesar de la alta salinidad del medio, la técnica analítica que utilizaron fue fluorescencia. Realizaron una comparación entre tres modalidades de

fluorescencia, la de excitación, emisión y sincrónica [10]. Encontraron que los resultados obtenidos eran reproducibles y establecieron que de las tres modalidades la de excitación era ligeramente mejor pues era más sensible, aunque la fluorescencia de excitación y emisión registraron similares valores en el límite de detección [10]. Los parámetros utilizados en la fluorescencia sincrónica fueron tomados de la literatura [19] y, probablemente, no fueron los más adecuados. Quizás esta es la razón del alto límite de detección y pobre desempeño de esta técnica en comparación con las otras.

El trabajo de Lara-Severino y colaboradores [9-10] demuestra que la fluorescencia es un método que puede utilizarse para este tipo de estudios, aun cuando el medio sea altamente salino. Como el estudio referido se realizó solamente para antraceno, sería importante ampliar el mismo a otros hidrocarburos, a fin de ampliar el estudio de las potencialidades biotransformadoras de HPA's con microorganismos haloalcalotolerantes.

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El estudio *in vitro* de microorganismos potencialmente biotransformadores de HPA's se lleva a cabo generalmente con técnicas instrumentales sofisticadas como las basadas en la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la cromatografía gaseosa (GC). Pese a la alta sensibilidad de los HPA's a las técnicas de fluorescencia, la relativa fácil disponibilidad de fluorímetros (o fluorómetros) en laboratorios instrumentales, y la sencillez en la implementación de métodos basados en fluorescencia, no es la técnica de elección cuando este tipo de estudios se lleva a cabo.

Si el medio de cultivo bacteriano es un medio altamente salino, se espera que el efecto de la salinidad sobre la señal fluorescente (efecto de "apagado" o quenching, debido a que la señal disminuye en presencia de la sal) sea severo, por lo que estas técnicas fluorescentes no suelen escogerse para este tipo de estudio. Sin embargo, la severidad del apagado de la señal depende directamente de la sensibilidad del analito, por lo que en condiciones de salinidad es probable que, incluso cuando exista apagado de la señal, sea posible cuantificar HPA por fluorescencia.

Un estudio reciente compara las respuestas fluorescentes del antraceno en medio mínimo de sales suplementado con varias concentraciones (%) de NaCl utilizando fluorescencia de excitación, de emisión y sincrónica [10]. El estudio demostró que es posible determinar este hidrocarburo con buena linealidad, sensibilidad y límite de detección en medio altamente salino por técnicas de fluorescencia. Los métodos implementados se utilizaron para determinar la concentración residual del antraceno en medios bacterianos de actinobacterias, demostrándose la capacidad de estos microorganismos en biotransformar al hidrocarburo.

El problema a abordar en esta tesis, continúa siendo el de determinar si el método de fluorescencia es adecuado para la determinación de hidrocarburos policíclicos

aromáticos en medios altamente salinos, con el fin de utilizar dichos métodos en el estudio de microorganismos haloalcalotolerantes potencialmente degradadores de hidrocarburos. En este trabajo, en particular, se amplía el estudio a los hidrocarburos naftaleno, fenantreno, fluoranteno y pireno. Se pretende responder a la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuál de las modalidades de espectrofluorimetría es la más adecuada para determinar a los hidrocarburos policíclicos aromáticos: naftaleno, fenantreno, fluoranteno y pireno en medio acuoso altamente salino 3% y 10%?

1.3 JUSTIFICACIÓN

La contaminación ambiental por petróleo y sus derivados (entre los que se encuentran los hidrocarburos policíclicos aromáticos) es un problema actual al que se enfrenta el plantea. Una de las estrategias que más se considera es la biorremediación, es decir utilizar microorganismos que sean capaces de biotransformar y degradar al contaminante. La búsqueda de microorganismos con tales capacidades es una de las líneas actuales de la microbiología ambiental. Debido a las características fisicoquímicas de los ambientes contaminados, los microorganismos halófilos, alcalófilos y haloalcalotolerantes son una buena opción de estudio. Estos organismos requieren o toleran altas concentraciones de sal y pH. La búsqueda a nivel de laboratorio de tales microorganismos requiere de técnicas analíticas capaces de determinar la concentración del analito en un medio salino.

En el caso particular de la búsqueda de microorganismos degradadores de hidrocarburos policíclicos aromáticos, las técnicas instrumentales basadas en HPLC y GC son las más empleadas para este fin. Sin embargo, aunque estos compuestos son altamente sensibles en fluorescencia, poco se ha estudiado la capacidad de esta técnica para llevar a cabo estudios de biotransformación o degradación de HPA en medios salinos. Una razón puede ser que la señal de fluorescencia se pierde en medios salinos. No obstante, estos compuestos son altamente fluorescentes, por lo que valdría la pena estudiar si la fluorescencia que presentan en este tipo de medio es suficiente para realizar una determinación precisa con buena sensibilidad y límite de detección.

Las técnicas de fluorescencia son mucho más económicas, accesibles, disponibles y de más fácil manipulación que las basadas en HPLC y GC. De ahí el interés en examinar la posibilidad de utilizarlas en la búsqueda de microorganismos halófilos, alcalófilos o haloalcalotolerantes potencialmente

biodegradadores de hidrocarburos policíclicos aromáticos. Tal posibilidad ampliaría, de manera importante, este tipo de estudios.

1.4 HIPÓTESIS

Al menos una de las tres modalidades de fluorescencia (excitación, emisión y sincrónica), resulta adecuada para la determinación de naftaleno, fenantreno, fluoranteno y pireno en un medio altamente salino (NaCl al 3% y 10%). Se considera adecuada aquella técnica que presente conveniente sensibilidad, bajo límite de detección, buena linealidad en el rango de trabajo y alta precisión en la determinación del analito.

1.5 OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar la modalidad de fluorescencia que resulta menos afectada por la salinidad en la determinación de la concentración de los hidrocarburos policíclicos aromáticos naftaleno, fenantreno, fluoranteno y pireno en medio mínimo de sales suplementado con 3% y 10% de NaCl.

Objetivos Específicos

- Registrar los espectros de excitación del medio mínimo de sales suplementado con 3% y 10% de NaCl, y de los HPA`s naftaleno, fenantreno, fluoranteno y pireno. Determinar la λ_{exc} más adecuada en cada caso.
- Registrar los espectros de emisión del medio mínimo de sales suplementado con 3% y 10% de NaCl, y de los HPA`s naftaleno, fenantreno, fluoranteno y pireno. Determinar la λ_{em} más adecuada en cada caso.
- Registrar los espectros sincrónicos del medio mínimo de sales suplementado con 3% y 10% de NaCl, y de los HPA`s naftaleno, fenantreno, fluoranteno y pireno a varias $\Delta\lambda$. Determinar la $\Delta\lambda$ más adecuada en cada caso.
- Construir la curva de calibración de excitación de los HPA`s naftaleno, fenantreno, fluoranteno y pireno en medio mínimo de sales suplementado con 3% y 10% de NaCl utilizando las condiciones de excitación y emisión determinadas en los objetivos anteriores. Determinar a partir de ella la sensibilidad y linealidad.

- Construir la curva de calibración de emisión de los HPA`s naftaleno, fenantreno, fluoranteno y pireno en medio mínimo de sales suplementado con 3% y 10% de NaCl utilizando las condiciones de excitación y emisión determinadas en los objetivos anteriores. Determinar a partir de ella la sensibilidad y linealidad.

- Construir la curva de calibración sincrónica de los HPA`s naftaleno, fenantreno, fluoranteno y pireno en medio mínimo de sales suplementado con 3% y 10% de NaCl a partir de la $\Delta\lambda$ adecuada determinada en los objetivos anteriores. Determinar a partir de ella la sensibilidad y linealidad.

- A partir de las curvas de calibración (excitación, emisión y sincrónica) y de la matriz (cultivos bacterianos de *Kocuria rosea*, *Microbacterium testaceum* y *Kocuria palustris*) determinar los límites de detección de cada hidrocarburo en cada cultivo bacteriano.

- Determinar la concentración residual de los hidrocarburos policíclicos aromáticos (Naftaleno, Fenantreno, Fluoranteno y Pireno) en cultivos bacterianos de *Kocuria rosea* utilizando la fluorescencia de emisión, excitación y sincrónica.

CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO

2.1 Fluorescencia

La fluorescencia fue descrita por George G. Stokes en 1852, es un tipo particular de emisión de luz en el que las sustancias absorben energía en forma de radiación electromagnética con una longitud de onda determinada, y luego emiten parte de esa energía, también en forma de radiación electromagnética, de longitud de onda diferente a la incidente (generalmente $\lambda_{\text{emisión}} > \lambda_{\text{incidente}}$) [1, 18]. El ciclo completo es muy breve, transcurre en tiempos del orden de los nanosegundos, por lo que puede considerarse prácticamente instantáneo [18]. Es este tiempo tan corto lo que diferencia a la fluorescencia de otro conocido fenómeno luminoso, la fosforescencia.

El mecanismo típico de fluorescencia implica tres pasos secuenciales, llamados respectivamente absorción, disipación no radiativa y emisión. Estos tres procesos están representados en la figura 1, conocida como diagrama de Jablonski.

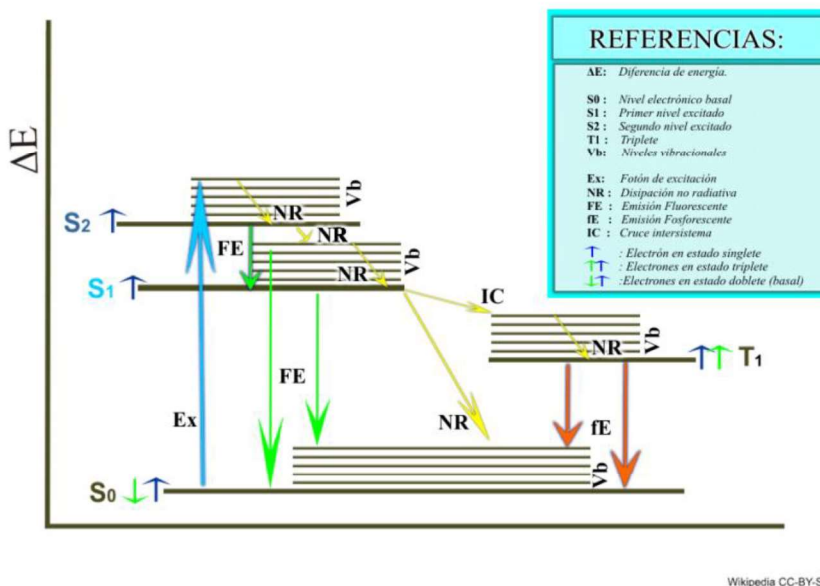


Figura 1. Diagrama de Jablonski en el que se representan los tres pasos involucrados en el fenómeno de fluorescencia. (Tomado de:

<https://es.wikipedia.org/wiki/Fluorescencia>)

El diagrama de Jablonski, nombrado así en honor al físico polaco Aleksander Jabłoński, ilustra los estados electrónicos de una molécula y las transiciones que se pueden producir entre esos estados cuando la molécula absorbe un fotón [18]. La molécula que se encuentra en el estado energético basal singlete (S_0) absorbe radiación electromagnética (Ex) y se transfiere un electrón de S_0 a estados vibracionales (Vb) excitados de los estados singletes más energéticos S_1 o S_2 . Seguidamente ocurre disipación no radiativa (NR) y el electrón alcanza el nivel vibracional 0 del estado excitado, es decir, llega al estado vibracional base S_1 o S_2 . Una vez allí, la molécula se desexcita haciendo caer al electrón del nivel excitado S_2 a S_1 , o de S_1 al nivel base S_0 , con la consiguiente emisión de un fotón (FE). Este fenómeno de desexcitación es conocido como fluorescencia. En ocasiones puede ocurrir que, si la molécula además de los estados excitados singletes cuenta con estados tripletes (T), ocurra un cruce intersistemas (IC) y el electrón excitado brinque del estado S_1 o S_2 a uno de los Tripletes (T_1), por lo que la emisión electromagnética final ocurre entre el estado T_1 y el S_0 ; en este caso el fenómeno se llama fosforescencia.

La relación entre el número de fotones emitidos con respecto a los absorbidos se conoce como eficiencia cuántica. Aquellas moléculas con alta eficiencia cuántica son susceptibles de ser determinadas analíticamente por espectroscopia de fluorescencia [1]. Este tipo de espectroscopía se basa en hacer incidir sobre la muestra una luz, generalmente en el rango del ultravioleta, y determinar la luz que emite la muestra. La intensidad de la luz emitida es directamente proporcional a la concentración de la muestra [1, 18].

De manera general, los compuestos con electrones deslocalizados (como los hidrocarburos policíclicos aromáticos) tienen alta eficiencia cuántica, por lo que el fenómeno de fluorescencia puede utilizarse para su cuantificación analítica. La técnica analítica que se utiliza para este fin se llama espectrofluorimetría [1, 18].

2.2 Espectrofluorimetría de excitación, emisión y sincrónica

La figura 2 muestra el diagrama de un espectrofluorímetro. Tradicionalmente se registra el espectro de excitación o el de emisión de la muestra analizada.

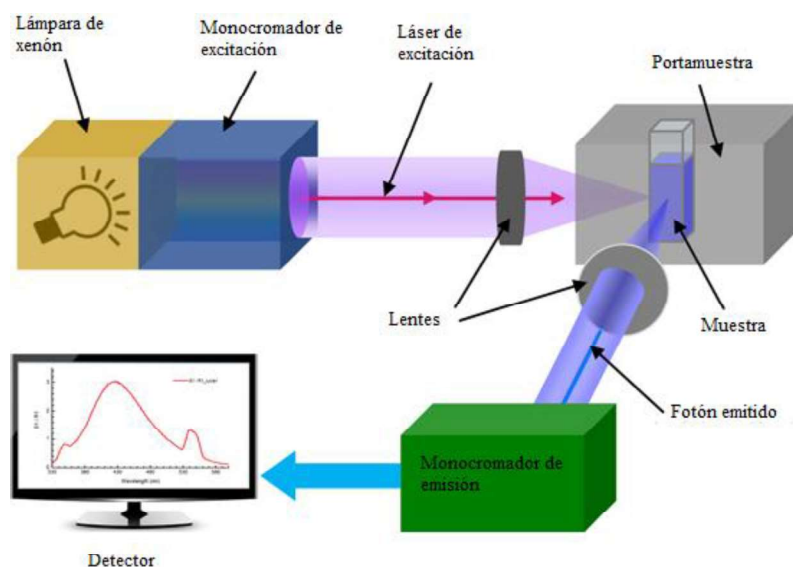


Figura 2. Representación esquemática de un espectrofluorímetro (Figura adaptada de <http://iopscience.iop.org/article/10.1088/0957-4484/25/43/435703>).

Si el espectro de interés es el de excitación, el monocromador de emisión se fija a una longitud de onda determinada, y el monocromador de excitación realiza un barrido de longitudes de onda. La intensidad de luz que llegue al monocromador de emisión variará acorde a la longitud de onda de excitación; de esta manera se colecta el espectro de excitación de la muestra. Para registrar el espectro de emisión se procede de manera contraria, se fija la longitud de onda con el monocromador de excitación y se realiza un barrido con el monocromador de emisión [20-21].

Si se varían simultáneamente el monocromador de excitación y el de emisión de manera tal que entre ellos siempre haya una diferencia constante ($\Delta\lambda$), y se registra el espectro obtenido en esas condiciones, entonces la modalidad de espectrofluorimetría utilizada es la sincrónica [22].

La modalidad excitación-emisión se caracteriza por su alta sensibilidad, pero debido a que varios hidrocarburos policíclicos aromáticos tienen estructura química similar, sus espectros son parecidos. Este tipo de modalidad de fluorescencia no es adecuada para el análisis de muestras de más de un hidrocarburo. Por otro lado, la fluorescencia sincrónica no es tan sensible como la anterior, pero es más selectiva porque forma bandas más definidas y finas, resultando una mayor selectividad por el estrechamiento de las bandas espectrales y la simplificación del espectro [20-22]. Por lo tanto, esta modalidad garantiza una mayor precisión en el análisis. Mediante la combinación de diferentes $\Delta\lambda$ es posible determinar hidrocarburos policíclicos aromáticos en mezclas de ellos [19-22].

2.2.1. Variables que afectan la Espectroscopía de fluorescencia

Una gran variedad de procesos, tales como reacciones en estado excitado, transferencia de energía, formación de complejos y *quenching* por colisiones moleculares, puede provocar una desactivación fluorescente. El oxígeno molecular y los iones yoduro y cloruro son desactivadores químicos muy conocidos [18].

✓ Solvente

Existe interacción entre las moléculas del soluto y disolvente, transferencia de electrones entre fluoróforos y disolvente en función de la polaridad de éste. El espectro de emisión de fluorescencia puede disminuir debido al disolvente que contiene átomos pesados.

✓ Temperatura

La disolución a alta temperatura disminuye la intensidad de fluorescencia, provocando una colisión intermolecular y pérdida de energía.

✓ pH

El espectro de fluorescencia de muchos compuestos aromáticos que contienen grupos funcionales ácidos o básicos es sensible al pH. Los cambios en la emisión

de los compuestos de este tipo provienen del número de especies resonantes diferentes que están asociadas con las formas ácidas o básicas de las moléculas.

✓ Oxígeno disuelto

Es uno de los problemas más molestos de la espectrofluorimetría, ya que a menudo reduce la intensidad de emisión de una disolución fluorescente.

2.3 Hidrocarburos

Son compuestos formados por cadenas de átomos de carbono e hidrogeno con una estructura química tal, que determina su clasificación. Entre ellos se encuentran los hidrocarburos alifáticos, formados por cadenas lineales o ramificadas, que pueden encontrarse saturados (alcanos) o insaturados (alquenos y alquinos). Otros hidrocarburos poseen una o varias cadenas cíclicas, y pueden ser saturados (ciclo alcanos) o con uno o más anillos bencénicos (aromáticos). Son compuestos abundantes en la naturaleza y poseen diversos orígenes, pero el de mayor interés para el hombre es el petróleo [6, 23-25].

Se pueden originar de la combustión incompleta de la materia orgánica en las chimeneas, los motores automotrices y los procesos industriales, así como de emisiones petrogénicas derivadas de procesos no relacionados con la combustión [23-25].

Los Hidrocarburos se clasifican de la siguiente manera [26]:

- ✓ Hidrocarburos biogénicos: sintetizados por casi todas las plantas, animales terrestres y marinos, incluyendo a la microbiota, bacterias, plancton marino, diatomeas, algas y plantas superiores
- ✓ Hidrocarburos antrópicos: son el resultado de actividades humanas. Los procesos de combustión industrial tales como la quema del carbón, de combustibles fósiles, y del petróleo refinado contribuyen con la contaminación, principalmente debido al humo que generan.

2.3.1. Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos

Son un numeroso grupo de sustancias químicas derivadas del benceno, estos se encuentran en el petróleo, el carbón y en depósitos de alquitrán, también se producen por la utilización de combustibles. La gasolina está constituida aproximadamente por 70 % de compuestos alifáticos saturados y 30 % de hidrocarburos aromáticos como el benceno, tolueno e isómeros del xileno, algunos de ellos se usan en medicamentos o para fabricar tinturas y pesticidas [27-29].

Los hidrocarburos aromáticos son líquidos o sólidos incoloros, blancos o amarillo-verde pálido a temperatura ambiente y sus puntos de ebullición están cercanos a los de los cicloalcanos correspondientes [6]. Los compuestos aromáticos son poco polares o no polares y, por lo mismo, no se disuelven en agua. La unión de dos anillos bencénicos produce hidrocarburos policíclicos aromáticos, estos compuestos son de gran interés ya que afectan la salud humana, han sido identificados como carcinógenos, mutágenos y teratógenos [30-36].

Naftaleno

Este hidrocarburo, llamado también alquitrán blanco, es un sólido blanquecino que predomina en los combustibles fósiles. Al quemar tabaco o madera se produce el naftaleno (también denominado naftalina) que tiene un olor tan fuerte que puede resultar desagradable. La exposición (por inhalación, por contacto con la piel, contacto con los ojos, por ingestión) a naftaleno produce dolor de cabeza, debilidad, náuseas, vómitos, sudoración, confusión mental, ictericia, orina oscura, dolor abdominal, diarrea, convulsiones y pérdida del conocimiento [30].

Una exposición prolongada o repetible de naftaleno puede provocar anemia hemolítica crónica y cataratas. Es una sustancia posiblemente carcinógena para los seres humanos, su ingestión provoca la muerte, por lo que se recomienda vigilancia médica. En el medio acuático es muy tóxico [30].

Fenantreno

El nombre fenantreno es la combinación de fenil y antraceno. Es un sólido cristalino incoloro a blanco con olor ligero, que suministra la estructura básica aromática de los esteroides. Es subproducto de la combustión incompleta de la madera y combustibles fósiles por lo que se encuentra en el aire y el agua, así como en el humo del cigarrillo. Se utiliza en colorantes, explosivos, investigaciones y en la elaboración de fármacos. Es un conocido irritante, y fotosensibilizador de la piel. [31, 35].

Fluoranteno


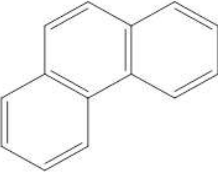
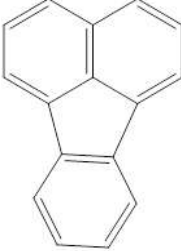
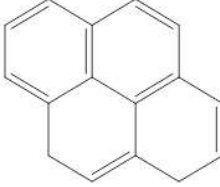
Hidrocarburo de color amarillo claro que está presente en el alquitrán de hulla, en el humo el tabaco y en la atmósfera. Se produce durante la incineración incompleta del carbón, el petróleo, el gas, la madera, etc. Es casi insoluble en agua, pero soluble en alcohol, éter, benceno y ácido acético. Se ingiere por inhalación al respirar el aire que lo contiene, o a través de la piel, pero ésta vía es más lenta. Al igual que todos los HAP, puede encontrarse en todos los tejidos del cuerpo que contienen grasa, aunque tiende a almacenarse principalmente en los riñones y el hígado. No es una sustancia cancerígena, pero sus isómeros si lo son [33].

Pireno

El pireno es un sólido incoloro e inodoro que se forma durante la combustión incompleta de compuestos orgánicos. Se bioacumula en crustáceos, peces, algas y en moluscos. Se descompone al calentarse produciendo humos irritantes. Se puede absorber por inhalación, a través de la piel y por ingestión. Sus efectos de exposición no han sido investigados adecuadamente. [34].

Las principales características físicas de estos hidrocarburos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Principales características físicas de los Hidrocarburos Policíclicos Aromaticos

| | Naftaleno | Fenantreno | Fluoranteno | Pireno |
|-----------------------------|---|---|--|---|
| Estructura química |  |  |  |  |
| Densidad | 1.14 g/cm ³ | 1.18 g/cm ³ | 1.25 g/cm ³ | 1.27 g/cm ³ |
| Masa molar | 128.17 g/mol | 178.23 g/mol | 202.26 g/mol | 202.25 g/mol |
| Punto de fusión | 80.26°C | 101°C | 110.8°C | 145-148°C |
| Punto de ebullición | 218°C | 332°C | 375°C | 404°C |
| Solubilidad en agua a 25 °C | 31.6 mg/L | 1.6 mg/L | 0.265 mg/L | 0.135 mg/L |

2.4 Contaminación con Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos en México

Los seres humanos dependen del ambiente para satisfacer sus necesidades de supervivencia, de salud, de bienestar; de tal forma que las alteraciones en la atmósfera ocasionan grandes daños en la salud de las personas y el planeta. El Golfo de México es uno de las regiones petroleras más grandes del mundo. El desarrollo de la industria petrolera en el sureste de México ha generado una gran contaminación en su entorno, ocasionada por derrames que afectan a varios componentes de los ecosistemas. Esta contaminación marina por petróleo y sus derivados en las costas mexicanas es un problema de gran importancia ecológica en la actualidad [36-40].

Además de la contaminación debida a la extracción de petróleo del mar, en México existen otras fuentes generadoras de contaminación por hidrocarburos, teniendo tres principales: Petróleos Mexicanos (PEMEX), Comisión Federal de Electricidad (CFE) y Ferrocarriles Nacionales de México (FNM), siendo el estado de Campeche el que ocupa el primer lugar en las concentraciones de hidrocarburos dispersos en aguas costeras y marinas [37-38].

En la zona costera los hidrocarburos pueden presentarse en concentraciones altas, lo que indica procesos de contaminación por petróleo como resultado, posiblemente, de filtraciones naturales, derrames accidentales, desechos de refinerías y lavado de buques-tanque, así como por la vía atmosférica. La contaminación por hidrocarburos afecta la flora, fauna y microorganismos del suelo, el crecimiento de las plantas y la existencia y sobrevivencia de los animales que se alimentan de estas [36-40].

Es evidente que la contaminación en el agua se ha intensificado al mismo ritmo en que se desarrollan las actividades de uso del petróleo como recurso energético, el aumento de los transportes marítimos y de las actividades de perforación, lo cual ha provocado el incremento de accidentes ambientales de diferentes proporciones [37-38].

La mayoría de los HPA`s son contaminantes distribuidos ampliamente en el ambiente marino; cada año ingresan al medio marino alrededor de 230,000 toneladas de estos compuestos. Estas sustancias se han estudiado de forma muy intensa debido al carácter carcinogénico y mutagénico que presentan [41]. En México existen políticas de recuperación de áreas dañadas por contaminación, la PROFEPA maneja criterios de limpieza para la restauración de suelos contaminados [4-5]

2.5 Métodos analíticos en química analítica

La química analítica es la rama de la química que tiene como finalidad la detección y estudio de la composición química de un material o muestra, mediante diferentes métodos de laboratorio. Se divide fundamentalmente en química analítica cuantitativa, cualitativa y de caracterización [1].

Los métodos de cuantificación se clasifican en [1]:

- Métodos químicos clásicos (se basan en reacciones químicas):
 - ✓ Análisis volumétrico
 - ✓ Análisis gravimétrico
- Métodos fisicoquímicos (se basan en interacciones físicas) o instrumentales:
 - ✓ Métodos espectrométricos
 - ✓ Métodos electroanalíticos
 - ✓ Métodos cromatográficos.

Los métodos espectrométricos son los métodos instrumentales basados en la interacción de la radiación electromagnética con un analito para identificarlo o determinar su concentración; estos métodos emplean técnicas tanto espectroscópicas como no espectroscópicas. Las técnicas espectroscópicas son aquellas en las que el analito sufre procesos de absorción, emisión o luminiscencia, el resto corresponde a técnicas no espectroscópicas. A su vez, las técnicas espectroscópicas pueden ser atómicas o moleculares, en dependencia de si el proceso espectroscópico ocurre a nivel atómico o molecular [1].

2.5.1. Validación de un método analítico

El desarrollo de un método analítico tiene como objetivo la cuantificación única del analito de interés en una matriz. La validación del método asegura que el mismo es apropiado para el análisis en cuestión y que los resultados obtenidos son

fiables y consistentes, es decir, la validación de un método analítico es el proceso por el cual se establece, mediante estudios de laboratorio, que las características de desempeño del método cumplen con los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas [42-44].

Las características o parámetros analíticos que se buscan durante el proceso de validación son [42-44]:

- ✓ Exactitud: Es el grado de concordancia entre el resultado y un valor de referencia certificado.
- ✓ Precisión: expresión del grado de comparabilidad entre resultados individuales cuando el método se lleva a cabo en las mismas condiciones experimentales. (repetitividad o reproducibilidad).
- ✓ Sensibilidad: capacidad para discriminar pequeñas diferencias de concentraciones del analito.
- ✓ Límite de detección: concentración correspondiente a una señal de magnitud igual al blanco más 3 veces la desviación estándar del blanco.
- ✓ Límite de cuantificación: concentración correspondiente a una señal de magnitud igual al blanco más 10 veces la desviación estándar del blanco.
- ✓ Intervalo dinámico: Intervalo de concentraciones entre el límite de cuantificación y el límite de linealidad.
- ✓ Especificidad: verificación de la capacidad del método de estimar de forma unívoca los analitos en presencia de los demás componentes.
- ✓ Robustez: capacidad del método de permanecer invariable después de pequeñas variaciones deliberadas del analito aplicadas al método.

Los métodos analíticos basados en fluorescencia suelen ser sensibles, de bajo límite de detección y cuantificación e intervalo dinámico estrecho, la exactitud, precisión, especificidad y robustez dependen mucho del analito y de la matriz en cuestión [43].

2.6 Métodos Analíticos para la Determinación de HPA

2.6.1. Espectrometría de fluorescencia

Los métodos de fluorescencia han sido utilizados para la detección y determinación de hidrocarburos en diferentes matrices debido a su alta sensibilidad y al alto rendimiento cuántico de estos compuestos. En el 2013 se utilizó esta técnica en su modalidad emisión- excitación para la cuantificación de benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, dibenzo[a,h]antraceno, benzo[g,h,i]perileno e indeno[1,2,3-c,d]-pireno [45-47]. Dissanayake y Galloway, utilizaron la fluorescencia sincrónica para cuantificar naftaleno, pireno y benzo(a)pireno [48], Lara-Severino y colaboradores utilizaron los tres métodos para determinar la concentración residual de antraceno en cultivos bacterianos [9-10].

2.6.2. Cromatografía de gases

La cromatografía de gases (CG) es probablemente la técnica más utilizada en la separación y determinación de hidrocarburos policíclicos aromáticos. Para lograr la separación de hidrocarburos no volátiles y no polares por CG, los compuestos a analizar deben estar en fase de vapor (lo cual se logra al volatilizar la muestra antes de introducirla en el inyector del cromatógrafo). La separación se efectúa mediante una combinación de factores, que incluyen punto de ebullición, polaridad y diferencias de afinidad entre los diferentes componentes de la muestra y la columna, y mediante el uso de un gas acarreador inerte (He o N₂) [1]. La principal ventaja de este método es que identifica y cuantifica el tipo de petróleo presente en la muestra, aunque la identificación del tipo de producto no es siempre sencilla.

2.6.3. Cromatografía líquida

Es una técnica que también se utiliza para la separación de componentes en una mezcla. Consiste en una fase estacionaria no polar (columna) y una fase móvil, que es la solución portadora de la muestra, que se inyecta en la columna. Los

componentes de la solución emigran de acuerdo a las interacciones no-covalentes de cada uno de los compuestos con la columna. Estas interacciones químicas, determinan la separación de los componentes de la muestra. Se utilizan diferentes detectores en dependencia de la naturaleza de los compuestos a determinar [1].

2.7 Actinomicetos: *Kocuria rosea*, *Microbacterium testaceum* y *Kocuria palustris*

2.7.1. Actinomicetos

Los actinomicetos son un grupo de bacterias (microorganismos unicelulares), filamentosas, que tienen similitud con los hongos por su morfología, tipo de reproducción y crecimiento en medios de cultivos sólidos y líquidos, son bacterias Gram positivas debido a que tienen en su pared celular peptidoglicano y son resistentes a la penicilina [49].

2.7.2. *Kocuria rosea*

El nombre *Kocuria* es en honor al microbiólogo esloveno Miroslav Kocur, y *rosea* vino de "rosa". La *Kocuria rosea* era conocida como *Micrococcus rosea*, pero en 1995 fue reclasificada a su nombre actual [50]. Esta especie de actinobacteria se ha aislado principalmente de muestras de agua y suelo. Mahjoubi y colaboradores [13] la aislaron en medio de sales minerales de Bushnell Hass (BHMS) complementado con 1% de petróleo de sedimentos y agua de mar recolectada cerca de una refinería en Túnez. Los autores también evaluaron su capacidad para la producción de biosurfactantes y concluyeron que podría ser una candidata potencial para la biorremediación. Ahmed y colaboradores [51] aislaron *K. rosea* en medio de agua de mar artificial (ASW) a partir de muestras de agua y suelo contaminadas con hidrocarburos en Pakistán. En ese trabajo reportaron la capacidad de *K. rosea* para crecer en naftaleno, fenantreno y fluoranteno y para degradar el primero. Lara-Severino y colaboradores aislaron *K. rosea* de una muestra de suelo que contenía NaCl al 1% y pH 8.3, encontrando que la misma era capaz de biotransformar al hidrocarburo policíclico aromático antraceno [9, 10]

2.7.3. *Microbacterium testaceum*

La especie *Microbacterium testaceum* se aisló por primera vez de arrozales chinos y se clasificó en el género *Aureobacterium*, pero posteriormente se reclasificó en el género *Microbacterium* [52]. De Vasconcellos y colaboradores [53] aislaron el género *Microbacterium sp.* de pozos de petróleo costeros en caldo nutritivo y reportaron su capacidad para degradar dihidro-fenantreno. Lara-Severino y colaboradores aislaron *M. testaceum* de un suelo que contenía NaCl al 3% y pH 8,6; y demostraron su capacidad para biotransformar antraceno [9, 10]. Hasta donde sabemos, no existen otros trabajos sobre el aislamiento de *M. testaceum* en ambientes contaminados.

2.7.4. *Kocuria palustris*

La especie *Kocuria palustris* fue descrita por Kovács y colaboradores [54] después de haber sido aislado originalmente de *Typha angustifolia*. En 2007, Mariano y colaboradores [55] aislaron *K. palustris* del suelo de una estación de servicio en medio PCA (recuento en placa), y un año después, Mariano y colaboradores [56] reportaron la capacidad de esta cepa de degradar diesel comercial. Hasta donde sabemos, no hay otros informes sobre su aislamiento de otros entornos. Lara-Severino y colaboradores aislaron *K. palustris* de un suelo que contenía NaCl al 3% a pH 8,4; y demostraron su capacidad para biotransformar al antraceno.

2.7.5. *Bacteria haloalcalotolerantes*

Existen microorganismos capaces de desarrollarse en ambientes con condiciones extremas, como los que se caracterizan por su alta concentración de sal y valores altos de pH. De acuerdo con las condiciones fisiológicas de salinidad y de pH requeridas para su crecimiento óptimo, éstos se clasifican como halófilos, halotolerantes, alcalófilos o alcalotolerantes. Los microorganismos halófilos son aquellos que requieren determinadas concentraciones de NaCl para crecer y vivir

[57], los halotolerantes pueden crecer en medios con muy bajas concentraciones de NaCl, incluso cero o bien tan altas como un 25 % [58]; un microorganismo alcalófilo o alcalotolerante es el que requiere o tolera, respectivamente para su crecimiento óptimo, un valor de pH de 9 o más alto [59]. Un haloalcalófilo es el que necesita tanto una concentración de NaCl determinada (hasta 30 %) y un pH alcalino (pH 9) [54]; por otro lado, un microorganismo haloalcalotolerante es el que puede vivir ya sea en ausencia o en presencia de sal, incluso puede tolerar altas concentraciones de NaCl (hasta 25 %) y también es capaz de crecer de manera óptima en un amplio rango de pH (8-9 o superior) [9-11].

CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales y reactivos

- Espectrofluorómetro (Horiba, Fluoromax-3)
- Cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico para fluorescencia
- Balanza analítica (ADAM)
- Micropipetas 1000 μL , 200 μL
- Gradilla
- Tubos de ensayo
- Frascos de Erlenmeyer de 125 mL con tapa de rosca
- Matraz volumétrico de 10 mL
- Cajas de Petri
- Papel parafilm
- Agua destilada
- Metanol (JT BAKER)
- Acetona (FERMONT)
- Naftaleno (Sigma Aldrich 98%)
- Fenantreno (Sigma Aldrich 98%)
- Fluoranteno (Sigma Aldrich 98%)
- Pireno (Sigma Aldrich 98%)
- Cloruro de sodio: NaCl (Sigma Aldrich 99%)
- Proteosa peptona (BD Bacto)
- Glucosa (Reasol)
- Extracto de levadura (BD Bioxon)
- Agar Bacteriológico (BD Bioxon)
- Sulfato de amonio: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Allied Chemical)
- Hidrógeno fosfato de amonio (Na_2HPO_4) (JT Baker)
- Hidrógeno fosfato de potasio (K_2HPO_4) (JT Baker),
- Sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (JT Baker),

- Cloruro de calcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Fermont),
- Cloruro de hierro (III) monohidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (Fermont)
- Molibdato de amonio monihidratado ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot \text{H}_2\text{O}$) (Monterey Reactivo Analítico)
- Solución Crómica: 6 gramos de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (Monterey) disueltos en el menor volumen de agua destilada posible, completado a 200 mL con H_2SO_4 (conc) (JT Baker)
- Cepas haloalcalotolerantes de los actinomicetos *Kocuria rosea*, *Microbacterium testaceum* y *Kocuria palustris*.

3.2 Metodología

Todo el material de vidrio utilizado fue previamente lavado con detergente, sumergido en solución crómica, enjuagado con abundante agua, seguido de un enjuague con HNO₃ (4 mol/L) y enjuague final con agua destilada.

3.2.1 Reactivación de las cepas

3.2.1.1. Cepas: Se utilizaron tres cepas de actinomicetos haloalcalotolerantes aisladas de suelos alcalinos de Veracruz cercanos a actividad petrolera, y previamente identificadas por la secuencia 16 rRNA [9]; Las cepas toleran los siguientes rangos de pH y %NaCl: *Kocuria palustris* (0–25%; pH 5–12), *Kocuria rosea* (0–10%; pH 5–11); *Microbacterium testaceum* (0–10%; pH 5–11), sin embargo, el crecimiento óptimo de estas cepas es *Kocuria palustris* (10% NaCl); *Kocuria rosea* y *Microbacterium testaceum* (3% NaCl); todas a pH 8. En este trabajo las cepas fueron siempre cultivadas en sus condiciones óptimas para garantizar la máxima actividad bacteriana, las mismas están depositadas en el GenBank con las secuencias KP100512, KP100513 y KP100514.

3.2.1.2. Medio para microorganismos halófilos (MH): Este medio se preparó como lo reporta Lara-Severino y colaboradores [9-11]; se disolvieron conjuntamente en agua destilada las cantidades necesarias de los siguientes componentes para obtener las concentraciones finales respectivas: Extracto de levadura 10 g/L, Proteosa- Peptona 5 g/L; Glucosa 1 g/L, y Agar Bacteriologico 18 g/L. Esta solución fue suplementada con 3% ó 10% de NaCl, la suplementada con 3% de NaCl se llamó medio MH-3% y en ella se cultivaron las cepas *Kocuria rosea* y *Microbacterium testaceum*, la suplementada con 10% de NaCl se llamó medio MH-10% y en ella se cultivó la cepa de *Kocuria palustris*, ambos medios fueron ajustados a pH 8 y se esterilizaron en autoclave a 120°C durante 15 minutos dejándolos enfriar a temperatura ambiente antes de ser utilizados.

3.2.1.3. Sembrado de las cepas: Una vez preparados los medios MH-3% y MH-10% (sección 3.2.1.2), estos se dejaron enfriar a temperatura ambiente, cuidando de que no solidificaran en el matraz, los mismos se vertieron en cajas de Petri en la campana, para evitar contaminación, y se dejaron solidificar; posteriormente las cepas se sembraron en el medio correspondiente (*Kocuria rosea* y *Microbacterium testaceum* en el MH-3%, y *Kocuria palustris* en el MH-10%) utilizando la técnica de estría cruzada, y se dejaron en incubación, se revisaron cada 24 h durante 7 días para comprobar el crecimiento bacteriano. Para determinar la pureza de cada una se les realizó la tinción de Gram para observar su morfología.

3.2.2. Determinación de las condiciones experimentales para la determinación de los hidrocarburos por fluorescencia

3.2.2.1. Medio de sales mínimo (MSM): Este medio se preparó como lo reporta Lara-Severino y colaboradores [9-11], se disolvieron conjuntamente en agua destilada las cantidades necesarias de las siguientes sales para obtener las concentraciones finales respectivas: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1000 mg/L, Na_2HPO_4 800 mg/L, K_2HPO_4 200 mg/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 200 mg/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 100 mg/L, $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 5 mg/L y $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1 mg/L). Esta solución de sales fue suplementada con 3% ó 10% de NaCl. La suplementada con 3% de NaCl se llamó medio MSM-3% y en ella se cultivaron las cepas *Kocuria rosea* y *Microbacterium testaceum*, la suplementada con 10% de NaCl se llamó medio MSM-10% y en ella se cultivó la cepa de *Kocuria palustris*, ambos medios fueron ajustados a pH 8 y se esterilizaron en autoclave a 120 °C durante 15 minutos dejándolos enfriar a temperatura ambiente antes de ser utilizados.

3.2.2.2. Preparación de soluciones estándares de los hidrocarburos naftaleno, fenantreno, fluoranteno y pireno: En una balanza analítica se pesaron 0.05 g de cada hidrocarburo (naftaleno, fenantreno, fluoranteno y pireno), los cuales se disolvieron en un volumen mínimo de metanol y se completó el volumen a 10 mL con el mismo metanol utilizando un matraz volumétrico. A partir de estas

soluciones iniciales de 5000 ppm se prepararon las soluciones estándares intermedias como se describe a continuación.

En el caso de naftaleno, fenantreno y fluoranteno, se prepararon:

- a) dos soluciones de 10mL, de concentraciones 500 y 50 ppm en metanol (dilución 1:10 y 1:100 respectivamente) a partir de los patrones de 5000 ppm),
- b) tres soluciones de 10mL, de concentración 5 ppm cada una preparadas a partir de 100 μ L de las soluciones de 500 ppm completadas con metanol, MSM-3% y 10%, respectivamente,
- c) tres soluciones de 10mL, de concentración 1 ppm cada una preparadas a partir de 200 μ L de las soluciones de 50 ppm completadas con metanol, MSM-3% y 10%, respectivamente.
- d) tres soluciones de 10mL, de concentración 0.5 ppm cada una, preparadas a partir de 100 μ L de las soluciones de 50 ppm.

En el caso del pireno se prepararon soluciones más diluidas y se procedió de la siguiente manera:

- e) dos soluciones de 10 mL, de concentraciones 500 y 50 ppm en metanol (dilución 1:10 y 1:100 respectivamente) a partir del patrón de 5000 ppm),
- f) una solución de 10 mL de concentración 5 ppm en metanol (dilución 1:100) a partir de la de 500 ppm,
- g) tres soluciones de 10 mL, de concentración 0.5 ppm cada una preparada a partir de 100 μ L de la solución de 50 ppm completadas con metanol, MSM-3% y 10% respectivamente,
- h) tres soluciones de 10 mL, de concentración 0.1 ppm cada una preparadas a partir de 200 μ L de las soluciones de 5 ppm completadas con metanol, MSM-3% y 10% respectivamente,
- i) tres soluciones de 10 mL, de concentración 0.05 ppm cada una, preparadas a partir de 100 μ L de las soluciones de 5 ppm.

3.2.2.3. Selección de las bandas de excitación, emisión y sincrónicas:

Todos los espectros de excitación, emisión y sincrónicos de este trabajo se registraron utilizando como condiciones instrumentales las siguientes: tiempo de integración de 0.5 s, e incremento de 2 nm. Los espectros de excitación se registraron utilizando como slits 0.5 mm, en los espectros de emisión y sincrónicos las slits utilizadas fueron de 2 nm; en todos los casos se utilizó una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico para fluorescencia (con sus cuatro lados transparentes).

Se obtuvieron los espectros de fluorescencia de excitación, emisión y sincrónicos de las soluciones de 0.5 ppm de los hidrocarburos naftaleno, fenantreno y fluoranteno y de 0.05 ppm de pireno preparadas en metanol, MSM-3% y 10%. Las condiciones particulares del registro de los espectros de excitación y emisión fueron encontradas experimentalmente en el laboratorio y se muestran en la Tabla 2.

En el caso de los espectros sincrónicos estos se registraron variando el valor de $\Delta\lambda$ de 10 a 100.

Tabla 2. Condiciones de determinación de los hidrocarburos fenantreno, fluoranteno y pireno en los medios MSM-3% y 10% por fluorescencia.

| Hidrocarburo | Modo Excitación | Modo Emisión | Modo sincrono |
|---------------------|--|--|---|
| Fenantreno | λ_{exc} : (240-340) nm λ_{exc} : 252 nm λ_{emi} : 363 nm | λ_{emi} : (320-420) nm λ_{emi} : 363 nm λ_{exc} : 252 nm | λ = 293 nm $\Delta\lambda$ = 70 nm |
| Fluoranteno | λ_{exc} : (250-350) nm λ_{exc} : 285 nm λ_{emi} : 460 nm | λ_{emi} : (410-510) nm λ_{emi} : 460 nm λ_{exc} : 285 nm | λ = 365 nm $\Delta\lambda$ = 80 nm |
| Pireno | λ_{exc} : (250-350) nm λ_{exc} : 334 nm λ_{emi} : 393 nm | λ_{emi} : (350-450) nm λ_{emi} : 393 nm λ_{exc} : 334 nm | λ = 334 nm $\Delta\lambda$ = 40 nm |

3.2.3. Sensibilidad y límite de detección en la determinación de fenantreno, fluoranteno y pireno por fluorescencia

3.2.3.1. Preparación de las curvas de calibración de los hidrocarburos naftaleno, fenantreno, fluoranteno y pireno. Determinación de la sensibilidad.

La Tabla 3 muestra la preparación de las soluciones patrones utilizadas para la construcción de las curvas de calibración de los hidrocarburos naftaleno, fenantreno y fluoranteno en ambos medios de cultivo, MSM-3% y 10%. La preparación de las soluciones de partida 1 y 5 ppm, preparadas en MSM-3% o MSM-10%, fue anteriormente descrita en la sección 3.2.2.2.

En el caso del pireno, las soluciones estándares de partida fueron las de 0.1 y 0.05 ppm preparadas en MSM-3% y 10% (preparación descrita en la sección 4.2.2). Se tomaron los mismos volúmenes señalados en las columnas dos y tres de la tabla 3, obteniéndose las concentraciones finales de los patrones en el rango 2 a 100 µg/L. En todos los casos las soluciones patrones fueron preparadas por triplicado.

Tabla 3. Preparación de las soluciones patrones para la construcción de las curvas de calibración (n = 3).

| Solución estándar de partida preparada en MSM-3% o MSM-10% | Volumen tomado de la solución estándar de partida (µL) | Volumen añadido de medio MSM-3% o MSM-10% (µL) | Concentración final del patrón µg/L |
|--|--|--|-------------------------------------|
| 1 µg/L | 0 | 3000 | 0 |
| | 60 | 2940 | 20 |
| | 120 | 2880 | 40 |
| | 180 | 2820 | 60 |
| | 240 | 2760 | 80 |
| | 300 | 2700 | 100 |
| | 600 | 2400 | 200 |
| 5 µg/L | 240 | 2760 | 400 |
| | 360 | 2640 | 600 |
| | 480 | 2520 | 800 |
| | 600 | 2400 | 1000 |

Se registraron los espectros de fluorescencia de excitación, emisión y sincrónico de cada solución, utilizando las condiciones reportadas en la Tabla 2. Con los valores de fluorescencia promediados para cada solución y los valores de estas soluciones patrones se construyeron las curvas de calibración correspondiente a cada hidrocarburo en cada medio (MSM-3% y 10%). Las curvas se ajustaron a un modelo lineal y utilizando el método de los mínimos cuadrados se encontró la mejor ecuación de la recta. La pendiente de dicha recta es el valor de la sensibilidad en $\mu\text{g/L}$ para la determinación del hidrocarburo en cuestión. El intercepto de cada una fue el valor del blanco correspondiente (MSM-3% o 10%) a las condiciones de registro del espectro.

3.2.3.2. Preparación del pre-inóculo de las cepas de actinobacterias: Una asada de cada cepa proveniente de un cultivo sólido (medio agar) fue trasvasada a un frasco de Erlenmeyer que contenía 80mL del medio MH correspondiente. Alícuotas de 3mL fueron tomadas a varios intervalos de tiempo y trasvasadas a la cubeta del espectrofotómetro (Globe CS-200PC) donde se determinó la densidad óptica a 600nm. A partir de estos datos se construyeron las curvas de crecimiento hasta alcanzar la fase estacionaria. Una vez determinada la fase exponencial de la curva, se estableció que el tiempo en el cual se alcanza la mitad de esta fase sería el establecido para tomar el inóculo a sembrar en los medios MSM-3% y 10%.

3.2.3.3. Inoculación de los medios MSM con las cepas de actinobacterias y obtención de los sobrenadantes (señal de la matriz): Una vez sembrado el pre-inóculo en el medio MH correspondiente, al tiempo en el cual se alcanza la mitad de la fase exponencial se tomó 1 mL, el cual fue ajustado con el medio MSM correspondiente hasta obtener una lectura de densidad óptica a 600 nm de 0.25 (correspondiente a 0.5 unidades nefelométricas (NTU)). Un mL de la suspensión ajustada a 0.5 NTU fue inoculado en 120 mL de los medios MSM-3% y 10%, contenidos en frascos de Erlenmeyer con tapa de rosca, según correspondiera. Los frascos se cubrieron con papel metálico para alejarlos de la luz. Se tomaron

alícuotas de 3 mL de los cultivos bacterianos a los 15 min, 20 min, 50 min, 1.5 h, 2.5 h, 4.5 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 144 h y 168 h y se centrifugaron a 5000 rpm por 5 min para separar el sobrenadante de la biomasa. Todos los cultivos bacterianos se prepararon por triplicado.

Se registraron los espectros de fluorescencia de excitación, emisión y sincrónico de cada solución de acuerdo a las condiciones indicadas en la Tabla 2. A partir de la señal máxima encontrada en las longitudes de onda correspondientes a las bandas de excitación, emisión y sincronos de los hidrocarburos, se determinó el límite de detección, a partir de la ecuación:

$$\text{Lím. Det} = \frac{[\text{máxima señal} + 3 * (\text{desviación estándar de la máxima señal})]}{\text{sensibilidad}}$$

Donde sensibilidad es la pendiente de la curva de calibración. Para las cepas *Kocuria rosea* y *Microbacterium testaceum* se utilizaron las curvas de calibración de los hidrocarburos en MSM-3% y en el caso de la *Kocuria palustris* en MSM-10%.

3.2.4. Determinación de la concentración residual de fenantreno, fluoranteno y pireno en cultivos de *Kocuria rosea* por fluorescencia de excitación, emisión y sincrónica.

3.2.4.1. Preparación de cultivos bacterianos de *Kocuria rosea*: Un volumen de 120µL de la solución 500ppm de los hidrocarburos fenantreno y fluoranteno y de la solución de 50 ppm de pireno se transfirieron a tres frascos de Erlenmeyer con tapa de rosca respectivamente (un frasco para cada hidrocarburo). Cada frasco se completó a 119mL con MSM-3%. Un mL de pre-inóculo de *Kocuria rosea*, ajustado a 0.5 NTU (densidad óptica de 0.25 a 600nm) se añadió a cada frasco de Erlenmeyer para completar 120mL de cultivo bacteriano que contenía 0.5ppm de los hidrocarburos fenantreno, fluoranteno y 0.05ppm de pireno respectivamente. Los frascos de Erlenmeyer se cubrieron con papel metálico para alejarlos de la luz. Se tomaron alícuotas de 3 mL de los cultivos bacterianos a los 15 min, 24 h,

72 h, 96 h y 144h y se centrifugaron a 5000rpm por 5min para separar el sobrenadante de la biomasa. Todos los cultivos bacterianos suplementados con hidrocarburos se prepararon por triplicado (tres cultivos bacterianos por cada hidrocarburo).

Se registraron los espectros de excitación, emisión y síncronos de cada uno de los sobrenadantes colectados, utilizando las condiciones descritas en la Tabla 2 para cada hidrocarburo. La concentración residual de los hidrocarburos en el tiempo se determinó a partir de los datos colectados.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Reactivación de las cepas:

Las características morfológicas de las cepas reactivadas en medio MH después de 7 días de incubación y crecimiento abundante fueron: presencia de pequeña o mediana elevación de los bordes, colonias suaves de color crema o amarilloso, con forma circular o irregular, opacas o brillosas y con ausencia de micelio. No hay pigmento difuso al medio y, en el microscopio, se observaron como cocoides únicos y en hebras bacilos pequeños o células filamentosas ramificadas. Todas fueron Gram positivas. Estas características, coinciden con las reportadas por Lara-Severino y colaboradores [9] cuando fueron inicialmente aisladas de suelos cercanos a áreas con actividad petrolera del estado de Veracruz. Esta coincidencia indica que las cepas fueron reactivadas sin presencia de contaminación.

4.2. Determinación de las condiciones experimentales para la determinación de los hidrocarburos por fluorescencia

Aunque uno de los objetivos de este trabajo era implementar las condiciones de determinación de naftaleno en los medios MSM-3% y 10%, esto no fue posible, debido a que el naftaleno se evaporaba muy rápido de las soluciones o porque las concentraciones evaluadas no fueron lo suficientemente sensibles para detectarlo. En cualquier caso, este hidrocarburo se eliminó del estudio.

En la Tabla 2 se muestran los valores experimentales óptimos encontrados en el laboratorio, de longitudes de onda de excitación y de emisión para los hidrocarburos en estudio. Se registraron los espectros de emisión de cada hidrocarburo en MSM-3% y 10% a las longitudes de onda de excitación conocidas, y así se ajustaron la λ_{emi} y λ_{exc} particulares para el estudio. A continuación se analiza cada hidrocarburo por separado.

Fenantreno: El primer espectro registrado fue la emisión 0.5 ppm de fenantreno en MSM-3% y 10% utilizando una $\lambda_{exc} = 250\text{nm}$. Dicho espectro se muestra en la figura 3.

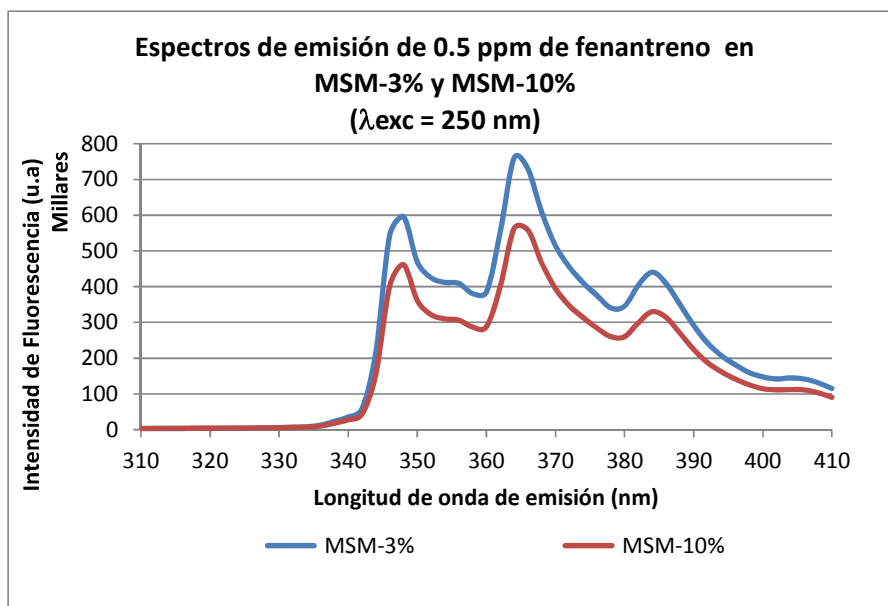


Figura 3. Espectros de emisión de 0.5 ppm de fenantreno con $\lambda_{exc} = 250\text{ nm}$.

De la Figura 3 se puede observar que la banda de emisión más intensa en el espectro es la correspondiente a la longitud de onda de 363 nm. Aunque la concentración en ambos casos es la misma (0.5 ppm) es esperado que la intensidad de fluorescencia sea menor en el medio MSM-10% que en el MSM-3%, pues la salinidad afecta negativamente a la intensidad de fluorescencia. Sin embargo, la banda de emisión de 363 nm no cambia de forma o posición con el aumento de la salinidad, por lo que se seleccionó como λ_{emi} del fenantreno. Con la banda de emisión más intensa, se registró el espectro de excitación del fenantreno en nuestras condiciones, que se muestra en la Figura 4.

La Figura 4 muestra la banda de excitación del fenantreno visible en los medios MSM-3% y 10%. Las dos bandas más intensas aparecen a los 252nm y los 294nm.

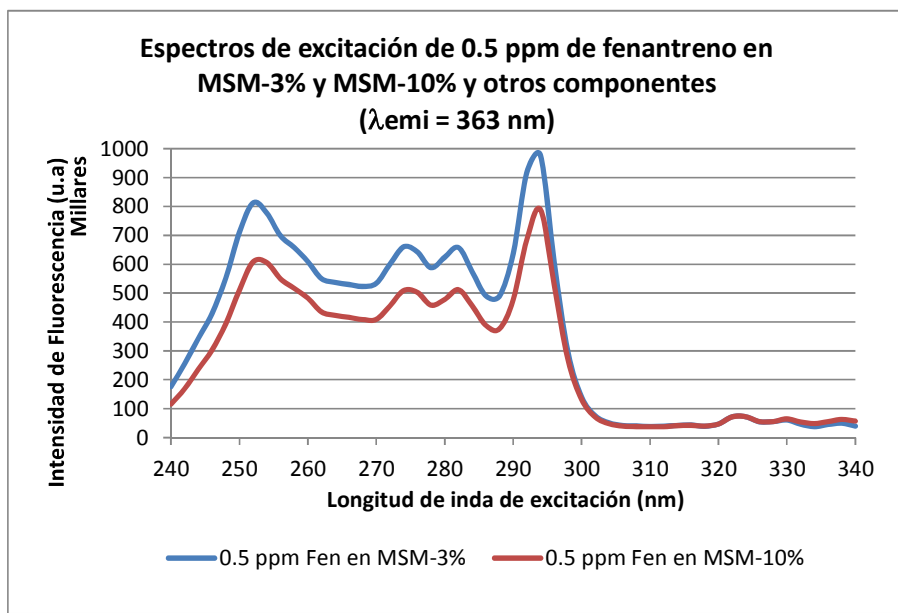


Figura 4. Espectros de excitación de 0.5 ppm de fenantreno con $\lambda_{emi} = 363$ nm.

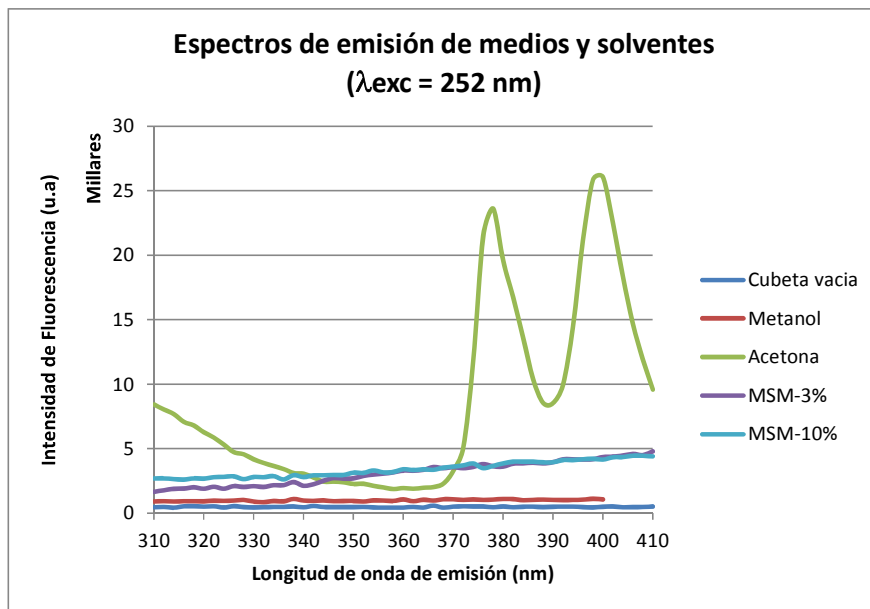


Figura 5. Espectros de emisión de los medios MSM-3%, MSM-10%, acetona y metanol con $\lambda_{exc} = 252$ nm.

Para decidir cuál de las dos utilizar como longitud de onda de excitación (252nm o 294nm) se analizaron los espectros de excitación y emisión de los solventes y medios sin hidrocarburos (señal del blanco). Las Figuras 5 y 6 muestran los espectros de emisión y excitación de los medios MSM-3% y 10%, además de la

acetona y el metanol, en las mejores condiciones de determinación de fenantreno en estos medios, con $\lambda_{emi} = 363 \text{ nm}$ y $\lambda_{exc} = 252 \text{ nm}$. La Figura 5 muestra que los medios MSM-3% y 10% son transparentes a la longitud de onda de excitación de 252nm. Es decir, no tienen una señal de fluorescencia lo suficientemente intensa como para interferir significativamente en la señal del fenantreno.

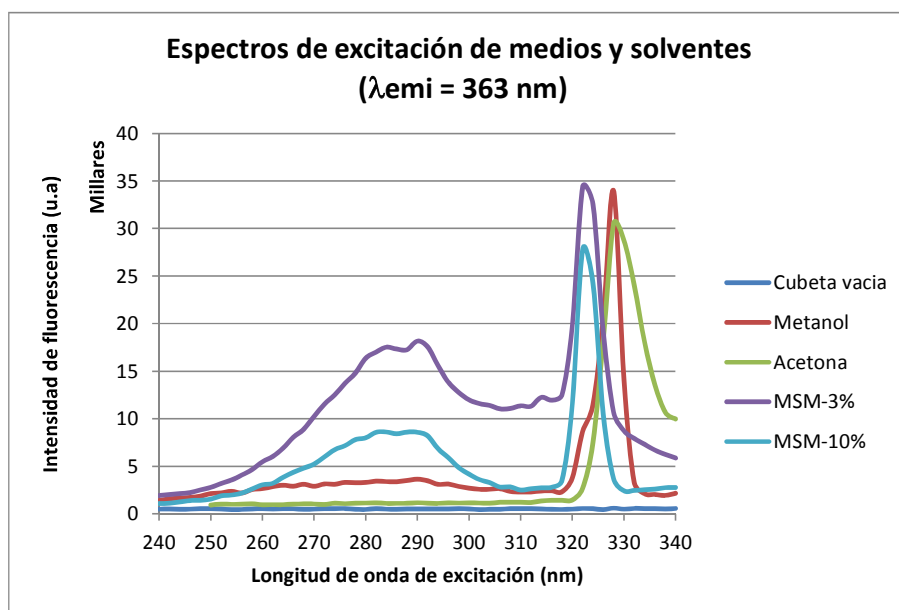


Figura 6. Espectros de excitación de los medios MSM-3%, MSM-10%, acetona y metanol con $\lambda_{emi} = 363 \text{ nm}$.

La Figura 6 muestra que los medios MSM-3% y 10% se excitan menos a la longitud de onda de 252nm que a 294nm, por tanto, las condiciones de determinación de este hidrocarburo en este trabajo se establecieron como $\lambda_{exc} = 252 \text{ nm}$ y $\lambda_{emi} = 363 \text{ nm}$.

Se registraron además los espectros de excitación y emisión de los solventes acetona y metanol en las condiciones de determinación del fenantreno. Esto se hizo con la finalidad de determinar cuál solvente es mejor, desde el punto de vista de su transparencia a la fluorescencia, para disolver al hidrocarburo. Aun cuando la influencia de estos solventes sería mínima pues las soluciones de trabajo se preparan en MSM-3% y 10% a partir de unos pocos mL del hidrocarburo disuelto

en el solvente, se prefirió utilizar al solvente que aporta menos señal de fondo. Tanto la acetona como el metanol tienen una intensidad de fluorescencia mínima a $\lambda_{exc} = 252\text{nm}$ como lo muestra la figura 6, pero la señal de fluorescencia de emisión de la acetona se incrementa mucho a los 365-370nm, como lo muestra la figura 5, lo que podría interferir con la señal de emisión del fenantreno a 363nm. Por esta razón se decidió disolver el fenantreno en metanol.

Finalmente, se determinaron las mejores condiciones de determinación de fenantreno por fluorescencia sincrónica. Para ello se tomaron las soluciones de 0.5ppm de fenantreno en MSM-3% y 10% y se les registraron los espectros sincrónicos variando el $\Delta\lambda$, hasta encontrar la más adecuada. Los resultados se muestran en las Figuras 7 y 8.

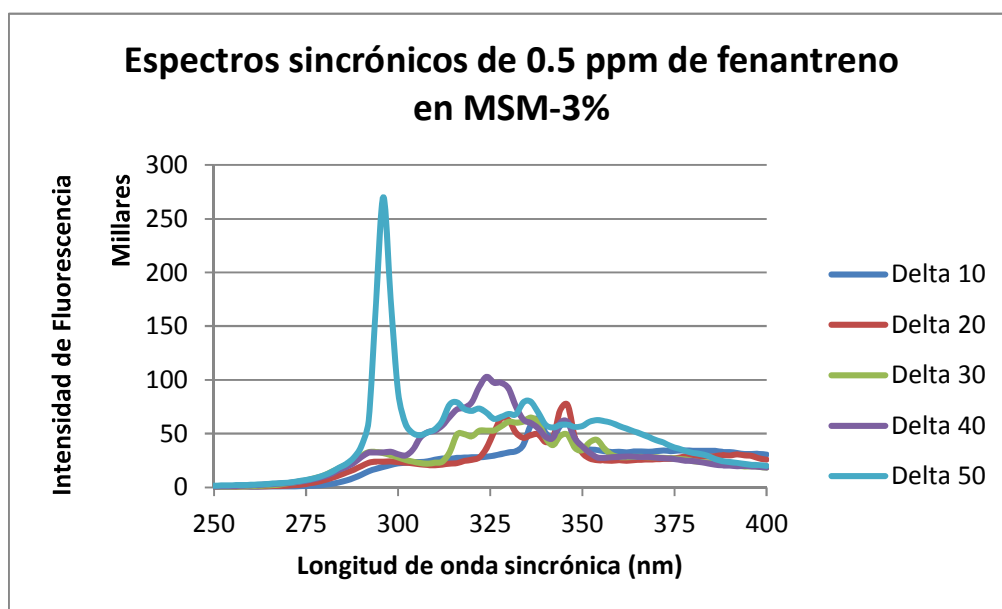


Figura 7A Espectros sincrónicos de 0.5 ppm de fenantreno en MSM-3% a diferentes $\Delta\lambda$ (10-50).

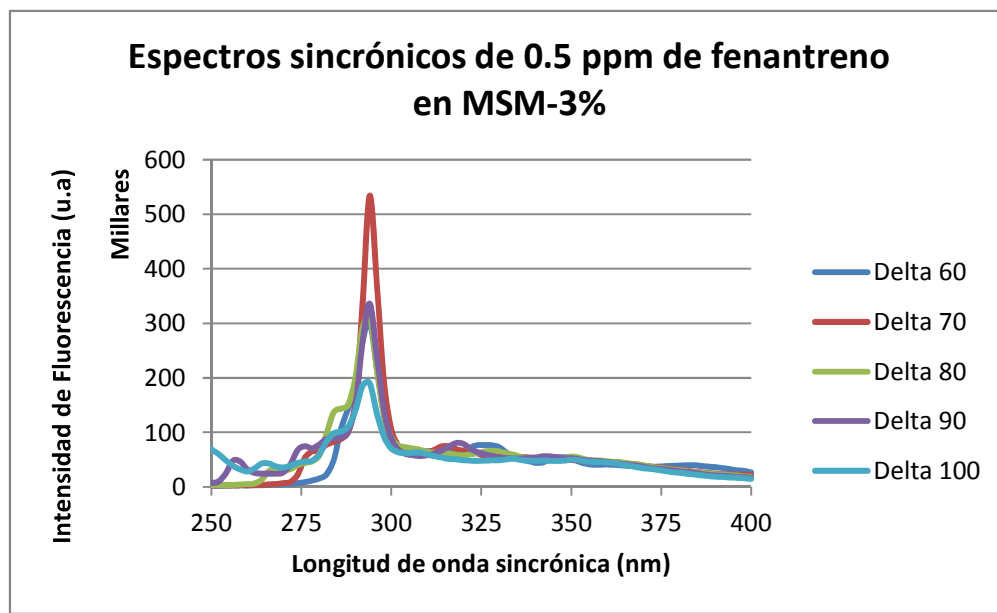


Figura 7B. Espectros sincrónicos de 0.5 ppm de fenantreno en MSM-3% a diferentes $\Delta\lambda$ (60-100).

La Figura 7 muestra que el espectro del fenantreno en MSM-3% más intenso corresponde a la λ sincrónica 294nm con un $\Delta\lambda = 70$ nm. Estas condiciones corresponden al momento en que coincide el monocromador de excitación y el de emisión en una diferencia de 70nm cuando el de excitación está en 294nm y el de emisión está en 363nm. Estas longitudes de onda coinciden con las bandas de excitación y emisión más intensas del fenantreno.

La Figura 8 muestra los espectros sincrónicos de 0.5 ppm de fenantreno, pero en MSM-10% a diferentes $\Delta\lambda$.

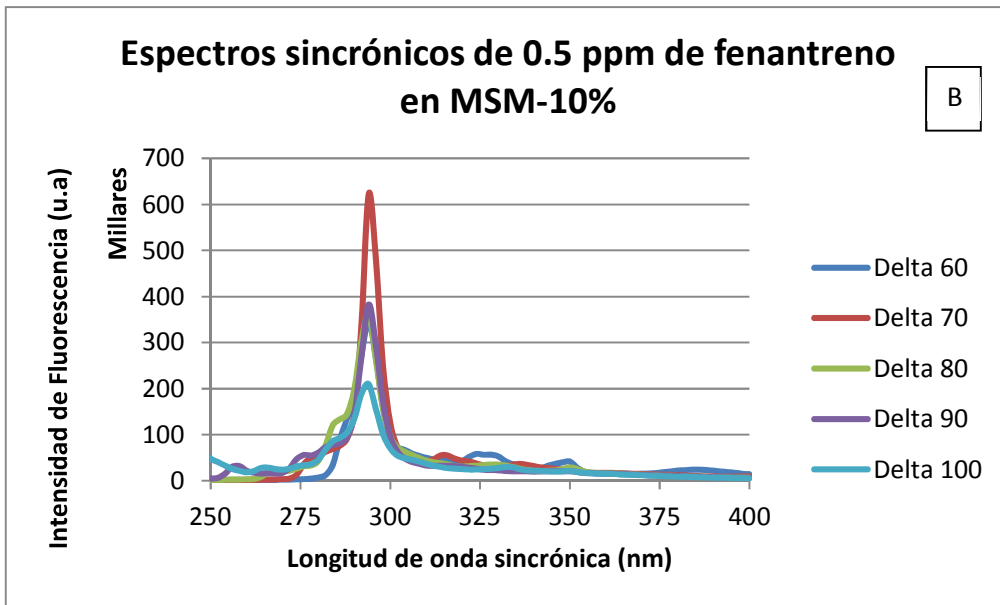
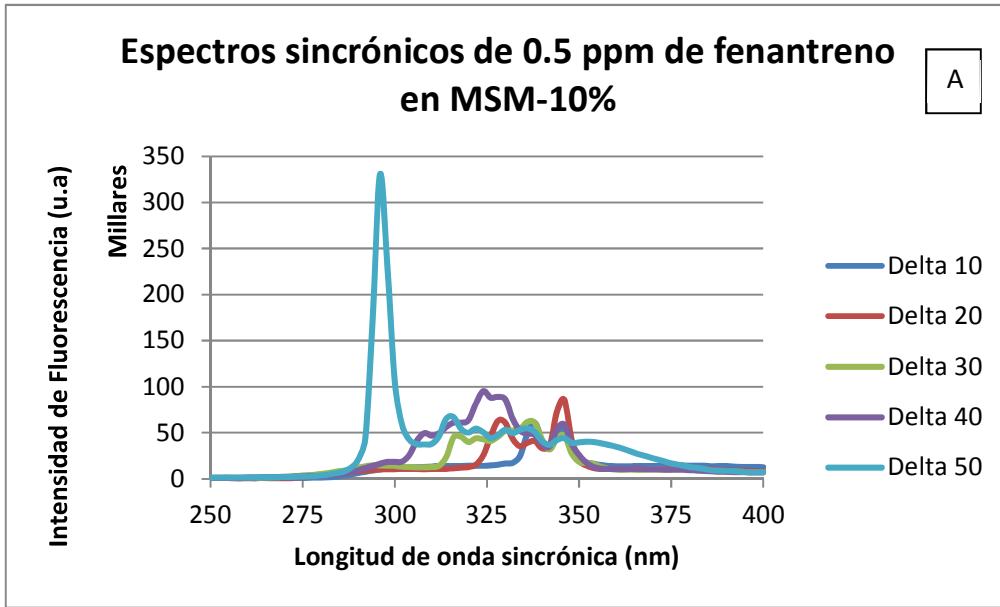


Figura 8 (A)(B). Espectros sincrónicos de 0.5 ppm de fenantreno en MSM-10% a diferentes $\Delta\lambda$.

Como se muestra en la Figura 8, la $\Delta\lambda = 70\text{nm}$ es, nuevamente, la que proporciona mayor intensidad en la señal de fenantreno en esta modalidad. Para conocer el comportamiento de los medios MSM-3% y 10% sin hidrocarburo en estas condiciones, también se registró el espectro sincrónico de ambos medios pero únicamente con la $\Delta\lambda = 70\text{nm}$. Los resultados se muestran en la Figura 9.

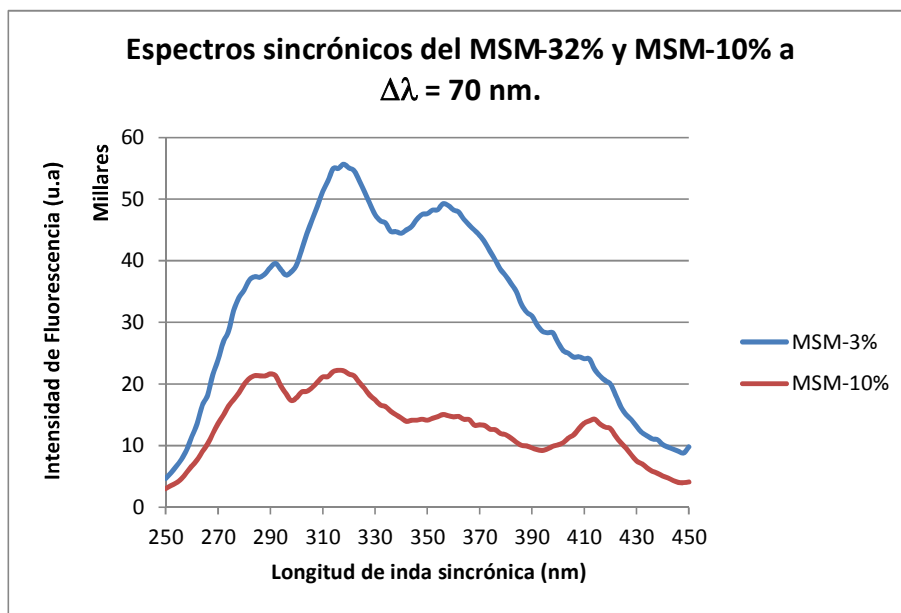


Figura 9. Espectro sincrónico de los medios MSM-3% y MSM-10% a $\Delta\lambda=70\text{nm}$.

La Figura 9 muestra que aunque a 294nm (longitud de onda sincrónica del fenantreno) la señal de fluorescencia no es despreciable, tampoco tiene una contribución significativa, por lo que un $\Delta\lambda=70\text{nm}$ es adecuado para la determinación del fenantreno por esta modalidad de fluorescencia. El hecho que los espectros de los medios no muestren la longitud de onda sincrónica (294 nm) es una evidencia que esa señal sincrónica se debe al fenantreno y no a los medios.

Fluoranteno: Con los otros dos hidrocarburos en estudio, fluoranteno y pireno, se procedió de igual manera a como se hizo con el fenantreno. La Figura 10 muestra el espectro de emisión registrado de 0.5ppm de fluoranteno en MSM-3% y 10% utilizando la $\lambda_{\text{exc}} = 280\text{nm}$, comúnmente empleada para este hidrocarburo.

La Figura 10 muestra que no hay una banda de emisión estrecha y bien definida, por el contrario, se presenta una banda ancha cuyo valor máximo está alrededor de 460nm. De manera similar al caso del fenantreno, la intensidad de fluorescencia es menor en el medio MSM-10% que en el MSM-3%, debido a la salinidad de la muestra. La banda ancha de emisión con máximo en 460 nm no

cambia de forma o posición con el aumento de la salinidad, por lo que se seleccionó como λ_{emi} del fluoranteno, y con ella se registró el espectro de excitación del fluoranteno, que se muestra en la Figura 11.

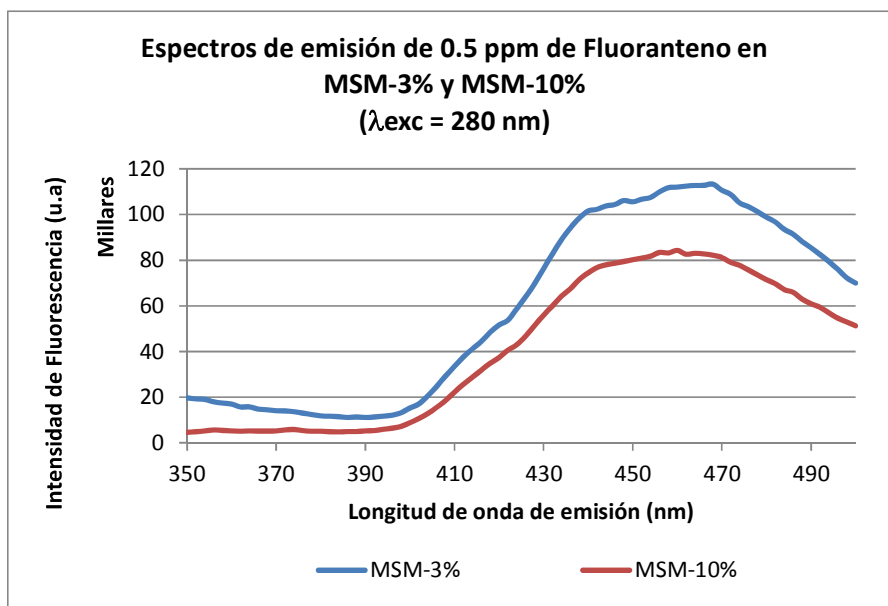


Figura 10. Espectros de emisión de 0.5 ppm de fluoranteno con $\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$.

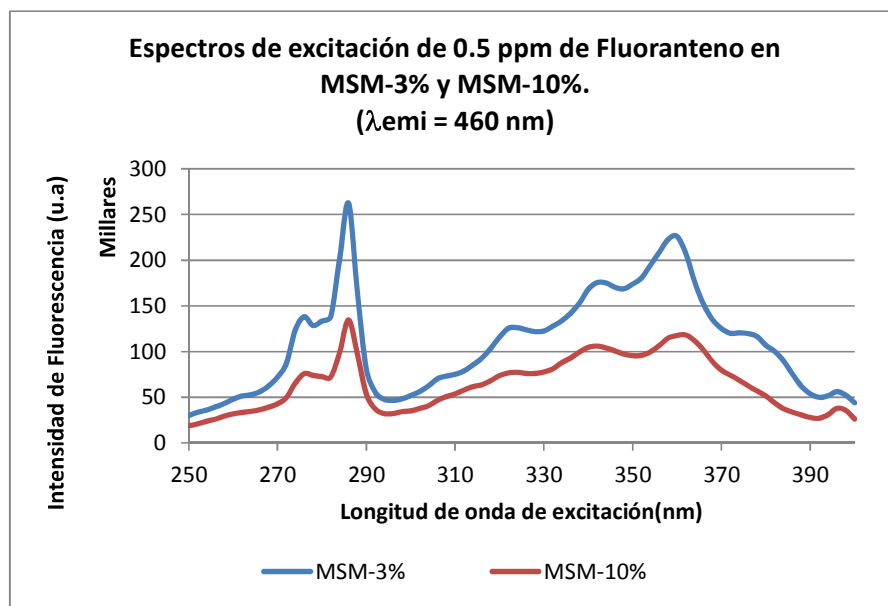


Figura 11. Espectros de excitación de 0.5 ppm de fluoranteno con $\lambda_{emi} = 460 \text{ nm}$.

La Figura 11 muestra las bandas de excitación del fluoranteno en los medios MSM-3% y 10%. Las dos bandas más representativas aparecen a los 285nm y los 360nm. La banda de 285nm es más intensa y resolutive y no hay corrimiento de ella con el cambio de la salinidad, por lo que fue la seleccionada para utilizar en la excitación del fluoranteno. Para corroborar la ausencia de interferencia de los solventes y medios sin hidrocarburos (señal blanco) se registraron los espectros de excitación y emisión en las mejores condiciones de determinación de fluoranteno en estos medios, con $\lambda_{emi} = 460\text{nm}$ y $\lambda_{exc} = 285\text{nm}$. Los espectros se muestran en las figuras 12 y 13.

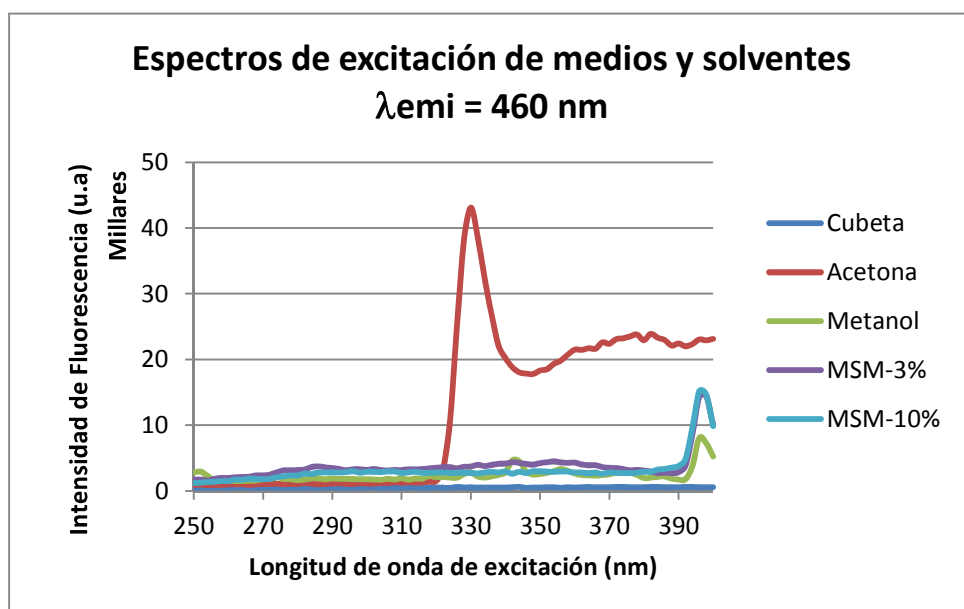


Figura 12. Espectros de excitación de los medios MSM-3%, MSM-10%, acetona y metanol con $\lambda_{emi} = 460 \text{ nm}$.

De la Figura 12 se observa claramente que ninguno de los medios y solventes en estudio interfieren en la señal de excitación del fluoranteno ($\lambda_{exc} = 285\text{nm}$), lo cual indica que la aportación del blanco es despreciable. Sin embargo, la señal de 360nm del fluoranteno se ve interferida por la acetona. La aportación de estos medios y solventes al espectro de emisión (Figura 13) también es bastante baja, pues a 460nm prácticamente no hay señal de ninguno, excepto del MSM 3%, pero muy baja.

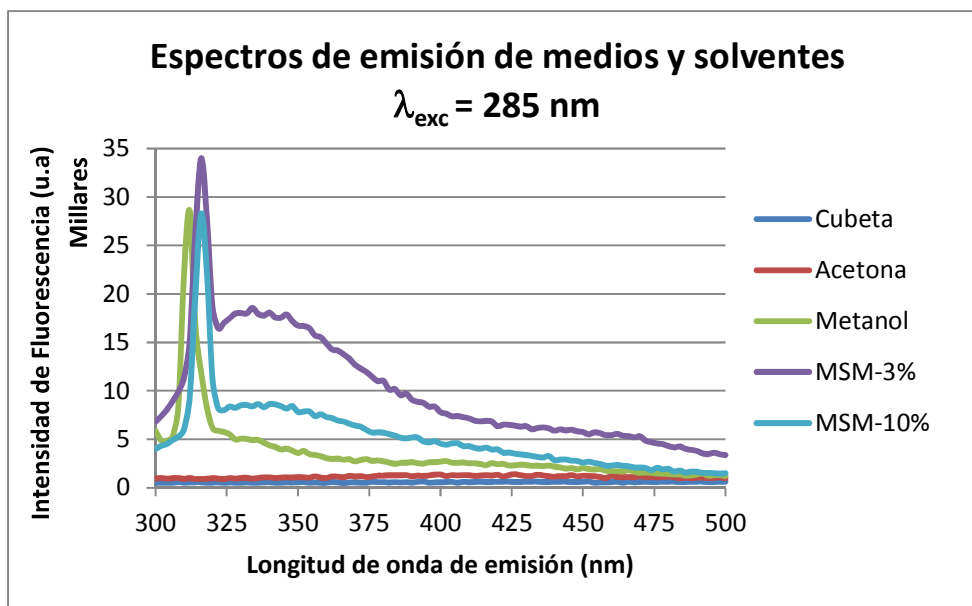


Figura 13. Espectros de emisión de los medios MSM-3%, MSM-10%, acetona y metanol con $\lambda_{exc} = 285$ nm.

Por tanto, no hay una interferencia a considerar por parte de los medios MSM-3% y 10% en la señal del fluoranteno en las condiciones escogidas, y el metanol es una mejor opción para disolver al fluoranteno que la acetona ya que el metanol no tiene una contribución importante a las señales de excitación o emisión del fluoranteno.

Los resultados de la determinación del fluoranteno en MSM-3% y MSM-10% por fluorescencia sincrónica se muestran en las Figuras 14 y 15. La Figura 14 muestra el comportamiento en MSM-3%. Las $\Delta\lambda$ más sensibles son 80, 90 y 100 nm. En este caso se escogió la λ sincrónica de 365 nm con $\Delta\lambda = 80$ nm (aunque no es la más sensible), pues esa $\Delta\lambda$ no presenta de manera pronunciada el hombro de 340 nm, por lo que la banda (el pico) está más definido.

Resultados similares se obtienen al analizar la figura 15, la cual muestra los espectros sincrónicos del fluoranteno a diferentes $\Delta\lambda$ en medio MSM-10%. En este

caso, otra vez la $\Delta\lambda = 80$ nm fue la escogida para la determinación de este hidrocarburo.

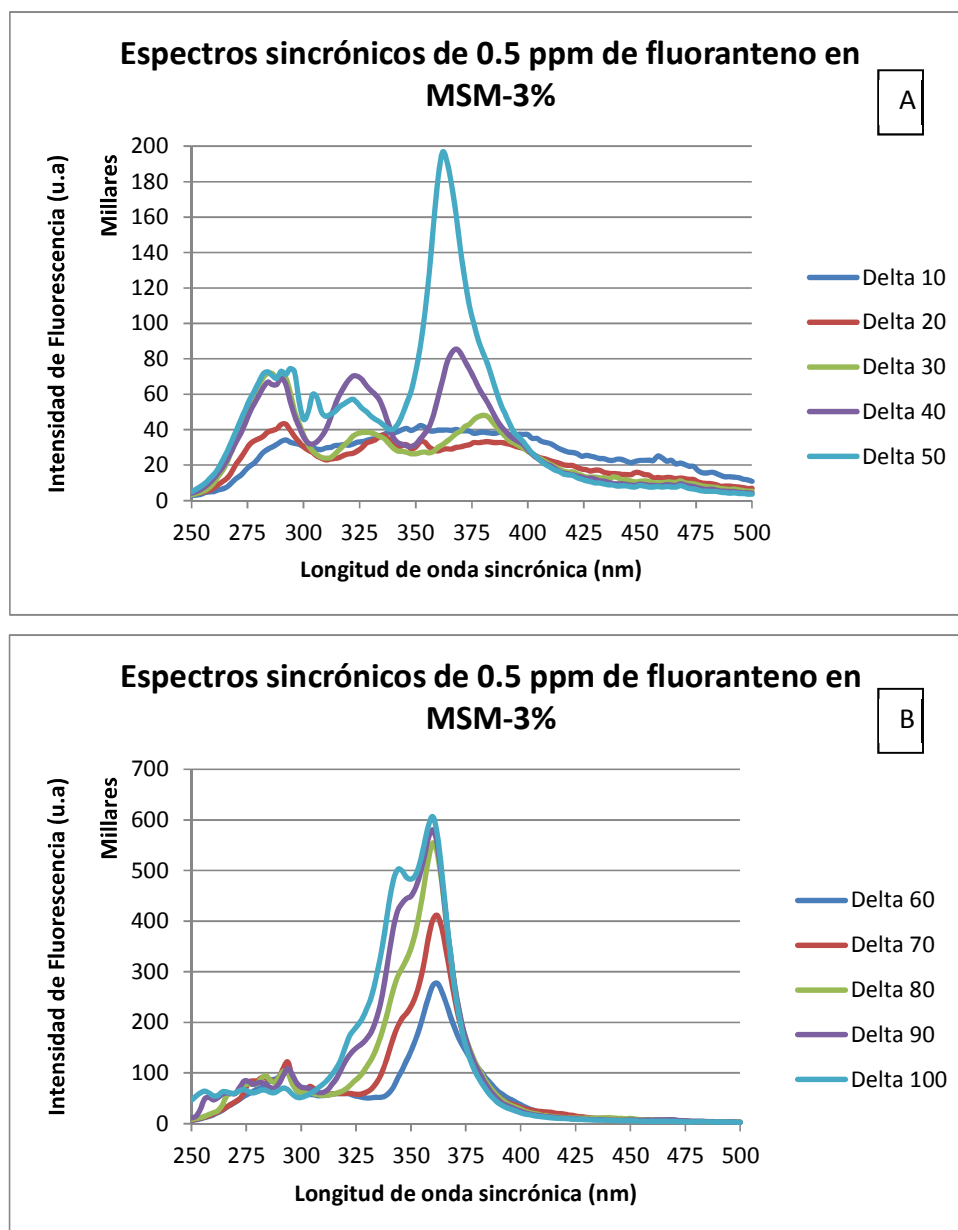


Figura 14 (A)(B). Espectros sincrónicos de 0.5 ppm de fluoranteno en MSM-3% a diferentes $\Delta\lambda$.

Para conocer el comportamiento de los medios MSM-3% y 10% sin hidrocarburo en las condiciones de determinación de fluoranteno por fluorescencia sincrónica,

se registró el espectro sincrónico de ambos a la $\Delta\lambda = 80\text{nm}$. Los resultados se muestran en la Figura 16.

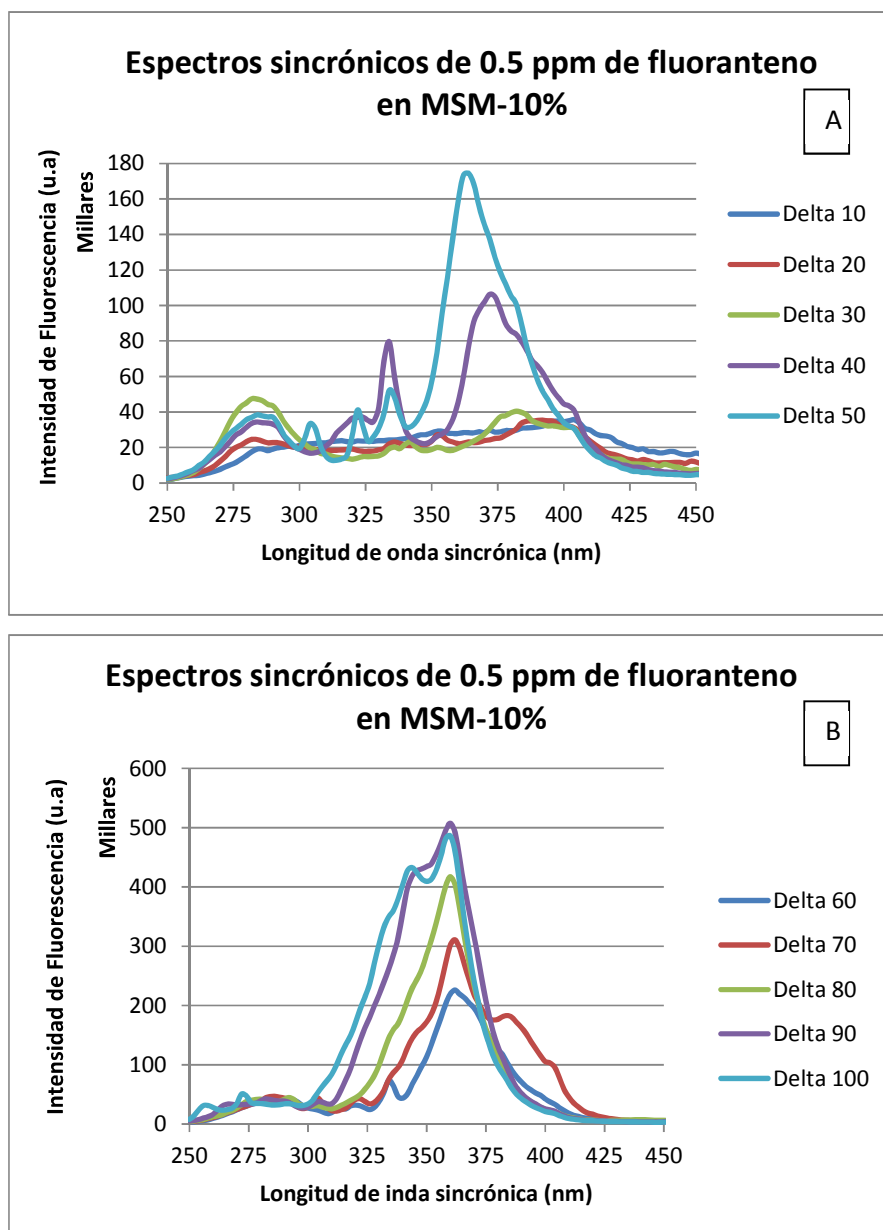


Figura 15 (A)(B). Espectros sincrónicos de 0.5 ppm de fluoranteno en MSM-10% a diferentes $\Delta\lambda$.

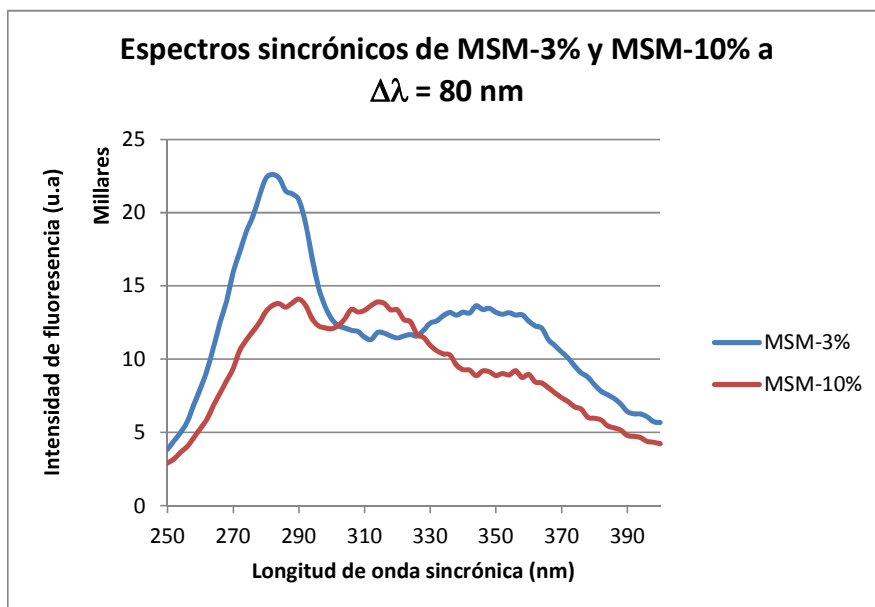


Figura 16. Espectros sincrónicos de los medios MSM-3% y MSM-10% a $\Delta\lambda=80\text{nm}$.

La Figura 16 muestra que, aunque a 365nm (longitud de onda sincrónica del fluoranteno) la señal de fluorescencia no es despreciable, tampoco tiene una contribución significativa, por lo que un $\Delta\lambda=80\text{nm}$ es adecuado para la determinación del fluoranteno por esta modalidad de fluorescencia. El hecho que los espectros de los medios no muestren la longitud de onda sincrónica (365nm) es una evidencia que esa señal sincrónica se debe al fluoranteno y no a los medios.

Pireno: De manera similar a los casos anteriores se procedió con el pireno. La figura 17 muestra el espectro de emisión registrado de 0.05 ppm de pireno en MSM-3% y 10% utilizando la $\lambda_{\text{exc}}=335\text{nm}$, usada comúnmente para este hidrocarburo.

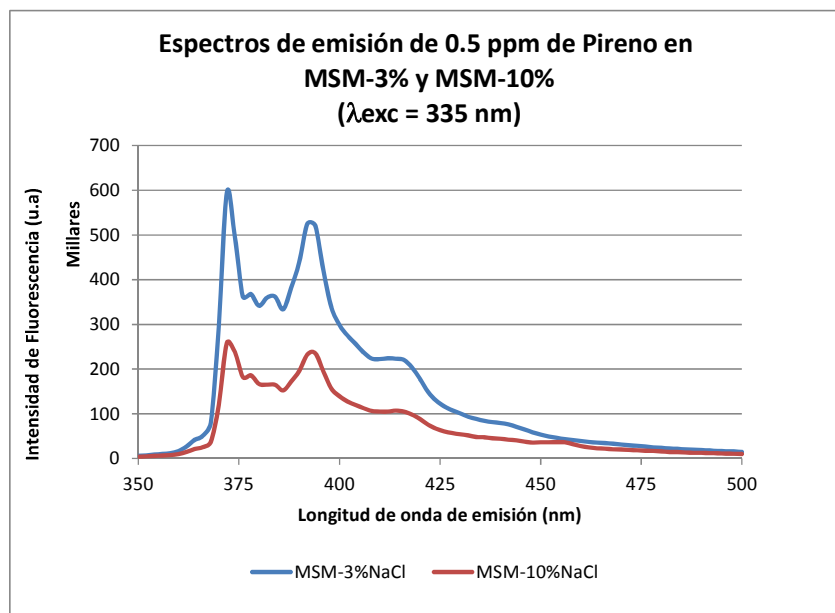


Figura 17. Espectros de emisión de 0.05 ppm de pireno con $\lambda_{exc} = 335$ nm.

La Figura 17 muestra dos bandas bien definidas de emisión, una a 372nm y la otra a 393nm de intensidades comparables. Igual que en los casos anteriores, la intensidad de fluorescencia es menor en el medio MSM-10% que en el MSM-3%, debido a la salinidad de la muestra. Las bandas de emisión no cambian de forma o posición con el aumento de la salinidad, por lo que cualquiera de ellas podría establecerse como λ_{emi} del pireno. Para decidir cuál de ellas seleccionar, se registraron los espectros de excitación de los medios MSM-3% y 10% a esas longitudes de emisión, a fin de determinar posibles interferencias con la señal del pireno (Figura 18).

En la Figura 18 se muestra una banda de excitación de los medios MSM-3% y 10% a 330nm, cuando el espectro de excitación se registra a la λ de emisión de 372nm. Sin embargo, si el espectro de excitación de los medios se registra a 393nm de emisión, la banda de excitación se corre a 346nm. Como la excitación del pireno está alrededor de 335nm, se debe evitar la excitación de los medios a 330nm, pues provocaría interferencia.

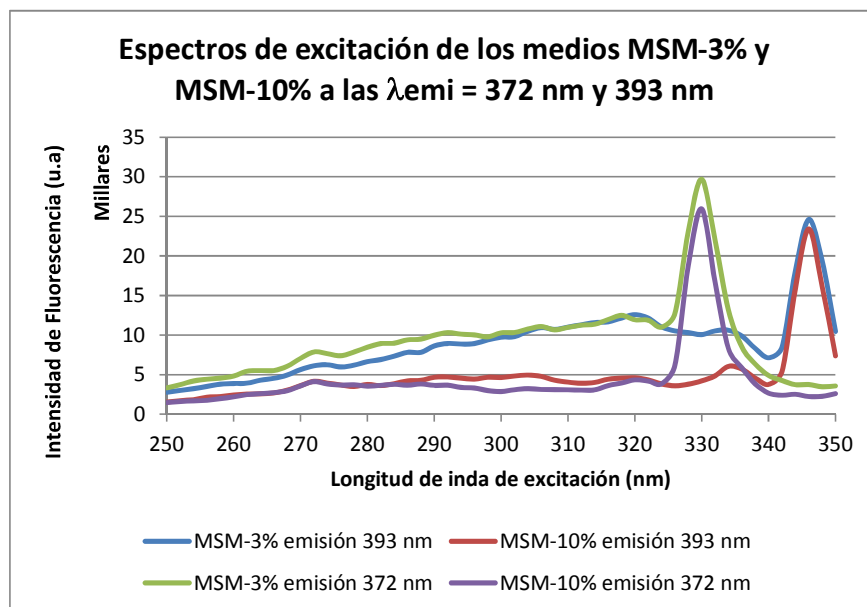


Figura 18. Espectros de excitación de los medios MSM-3% y MSM-10% registrados a las λ de emisión del pireno 372 nm y 393 nm.

Debido a la explicación anterior, se escogió la banda de emisión de 393nm como la adecuada para la determinación de pireno. A esta longitud de onda la excitación de los medios MSM-3% y 10% no es despreciable pero es mínima. Una vez establecida la longitud de onda de emisión del pireno (393nm), se registró su espectro de excitación para establecer con precisión la longitud de onda de excitación de este hidrocarburo. El espectro de excitación con $\lambda_{emi} = 393nm$ se muestra en la figura 19.

La Figura 19 muestra las bandas de excitación del pireno en los medios MSM-3% y 10%. La banda más representativa e intensa aparece a los 334nm, muy cercana a la reportada de 335nm. Está bien definida y no hay corrimiento de ella con el cambio de la salinidad. Por tanto, esta banda se escogió para utilizar en la excitación del pireno. Para corroborar que no había interferencia de los solventes y medios sin hidrocarburos (señal del blanco) se registraron los espectros de excitación y emisión en las mejores condiciones de determinación de pireno en estos medios, con $\lambda_{emi} = 393nm$ y $\lambda_{exc} = 334nm$. Los espectros se muestran en las Figuras 20 y 21.

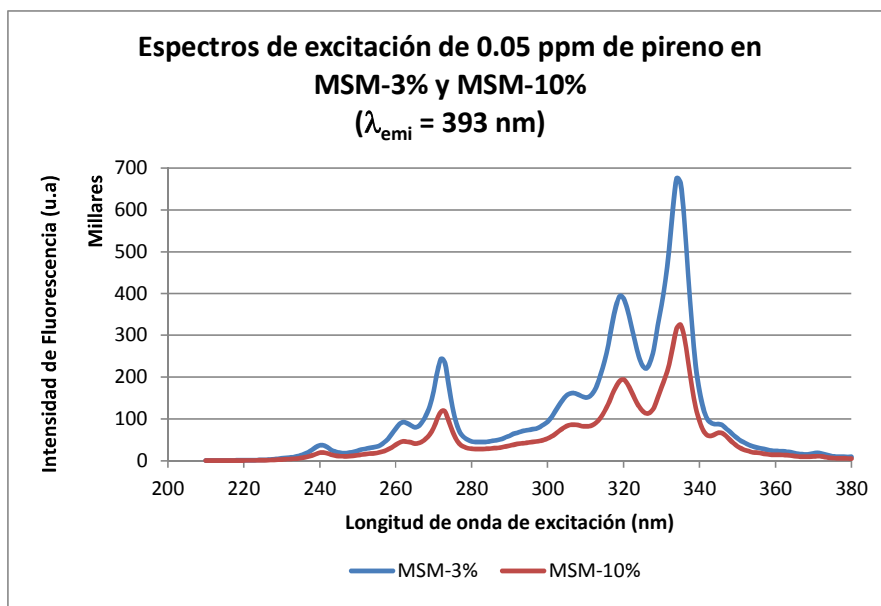


Figura 19. Espectros de excitación de 0.05 ppm de pireno con $\lambda_{emi} = 393 \text{ nm}$.

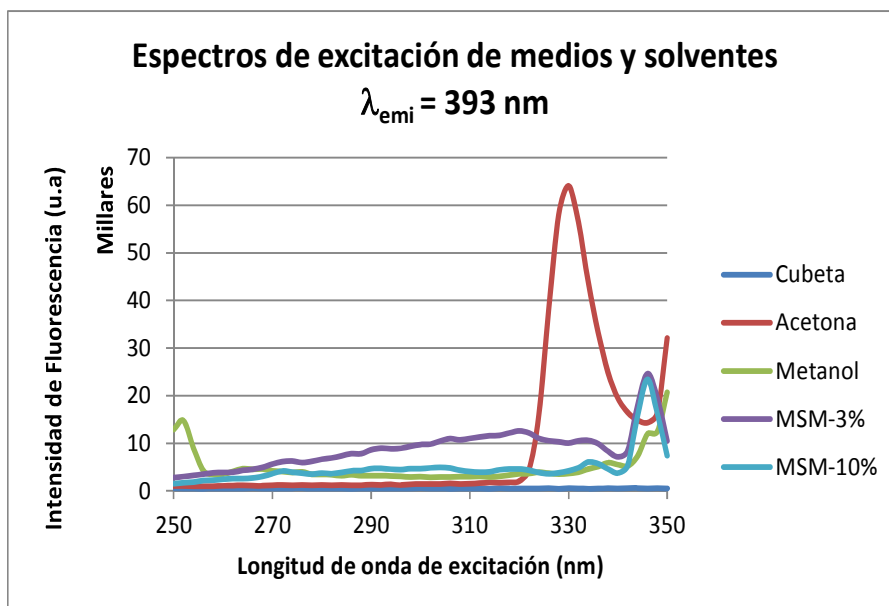


Figura 20. Espectros de excitación de los medios MSM-3%, MSM-10%, acetona y metanol con $\lambda_{emi} = 393 \text{ nm}$.

Este espectro (Figura 20) muestra que la acetona tiene una banda de excitación en 334nm, coincidiendo con la del pireno, peor lo que no es un buen solvente para disolverlo pues provoca interferencia. El metanol sin embargo es transparente en

estas condiciones. Se sabía de antemano que los medios MSM-3% y 10% no provocaban interferencias en estas condiciones.

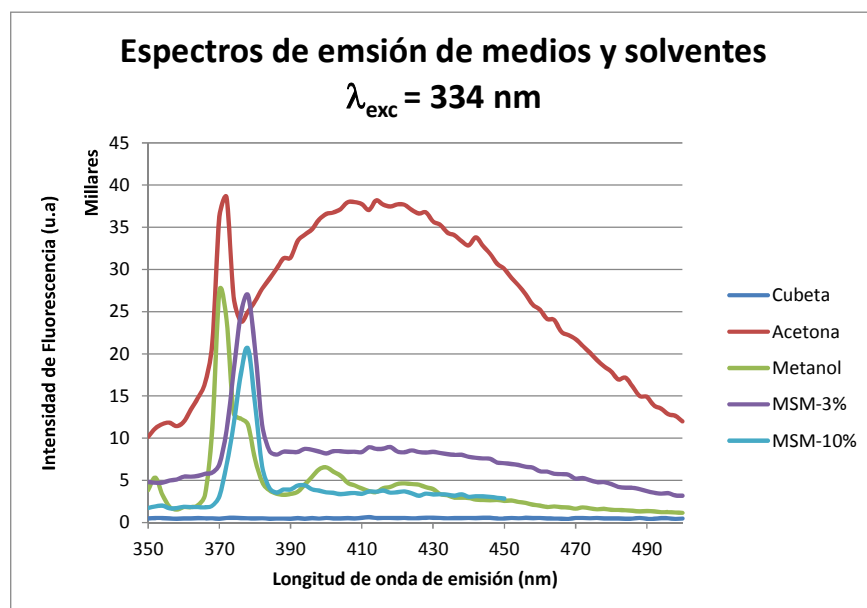


Figura 21. Espectros de emisión de los medios MSM-3%, MSM-10%, acetona y metanol con $\lambda_{exc} = 334$ nm.

La Figura 21 corrobora los resultados obtenidos de la figura 18. Una vez más se demuestra que si la longitud de onda de excitación es 334nm, los medios MSM-3% y 10% interfieren, pues presentan bandas de emisión en 378nm, la cual interferiría con la banda de emisión de 372nm del pireno. Por lo tanto se confirma una vez más que la longitud de onda para la determinación del pireno debe ser 393 nm.

La Figura 21 también muestra que la acetona presenta una banda intensa y ancha de emisión cuando se excita a 334nm. Ésta cubre tanto las longitudes de onda de 372nm como la de 393nm, por tanto la acetona, definitivamente, no puede considerarse como solvente para disolver al pireno. El metanol, por su lado, tiene una emisión en 372nm (coincidente con la del pireno) pero es transparente a la longitud de onda de 393nm (no interfiere), por lo tanto es el solvente escogido para disolver al hidrocarburo.

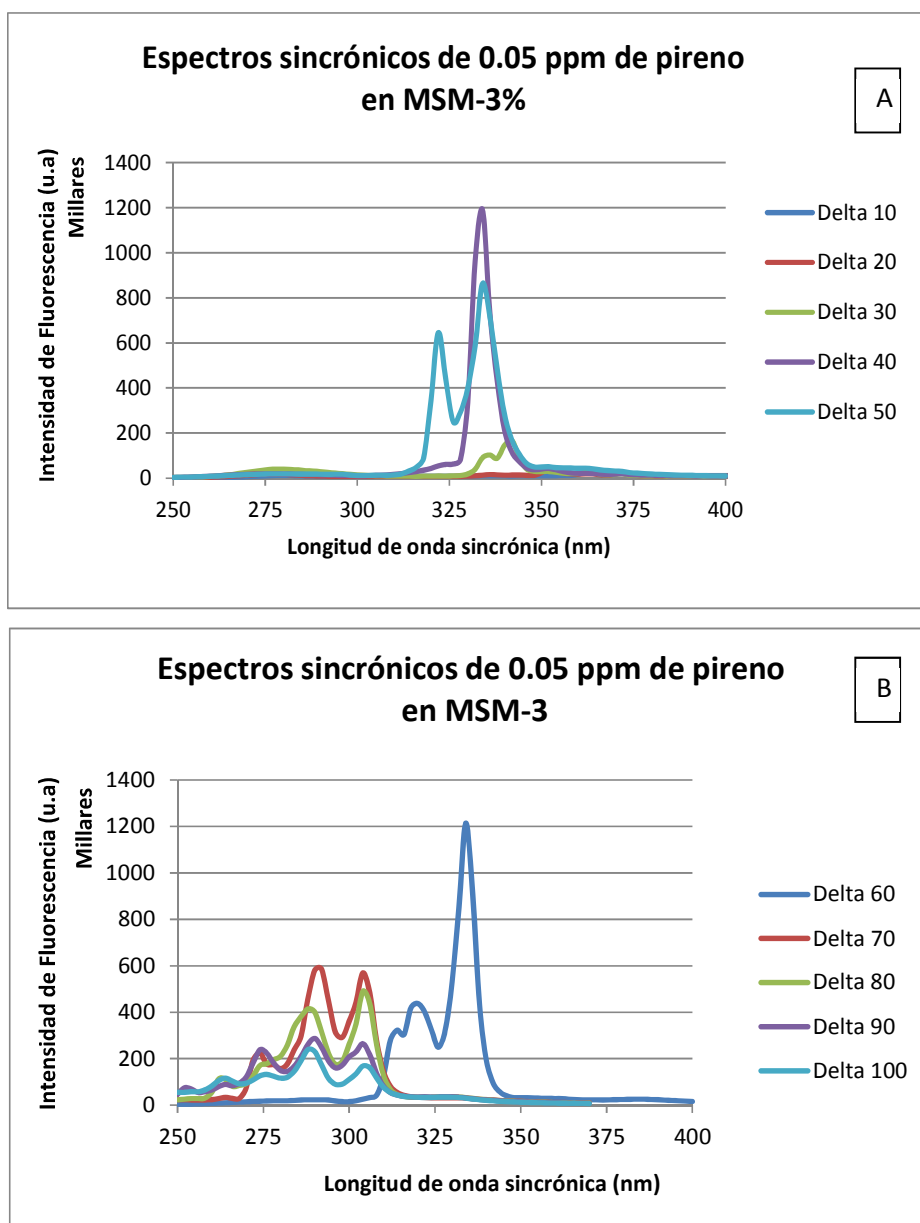


Figura 22 (A)(B). Espectros sincrónicos de 0.05 ppm de pireno en MSM-3% a diferentes $\Delta\lambda$.

En el caso de la determinación de pireno en MSM-3% y 10% por fluorescencia sincrónica, los resultados se muestran en las figuras 22 (A)(B) y 23 (A)(B). La Figura 22 (A) y (B) muestra el comportamiento en MSM-3%. Las $\Delta\lambda$ más sensibles son 40 y 60nm. En este caso se escogió la λ sincrónica de 334nm con $\Delta\lambda = 40$ nm

pues esa $\Delta\lambda$ solo muestra una banda (pico) bien definido, lo cual es la situación ideal para cuantificar.

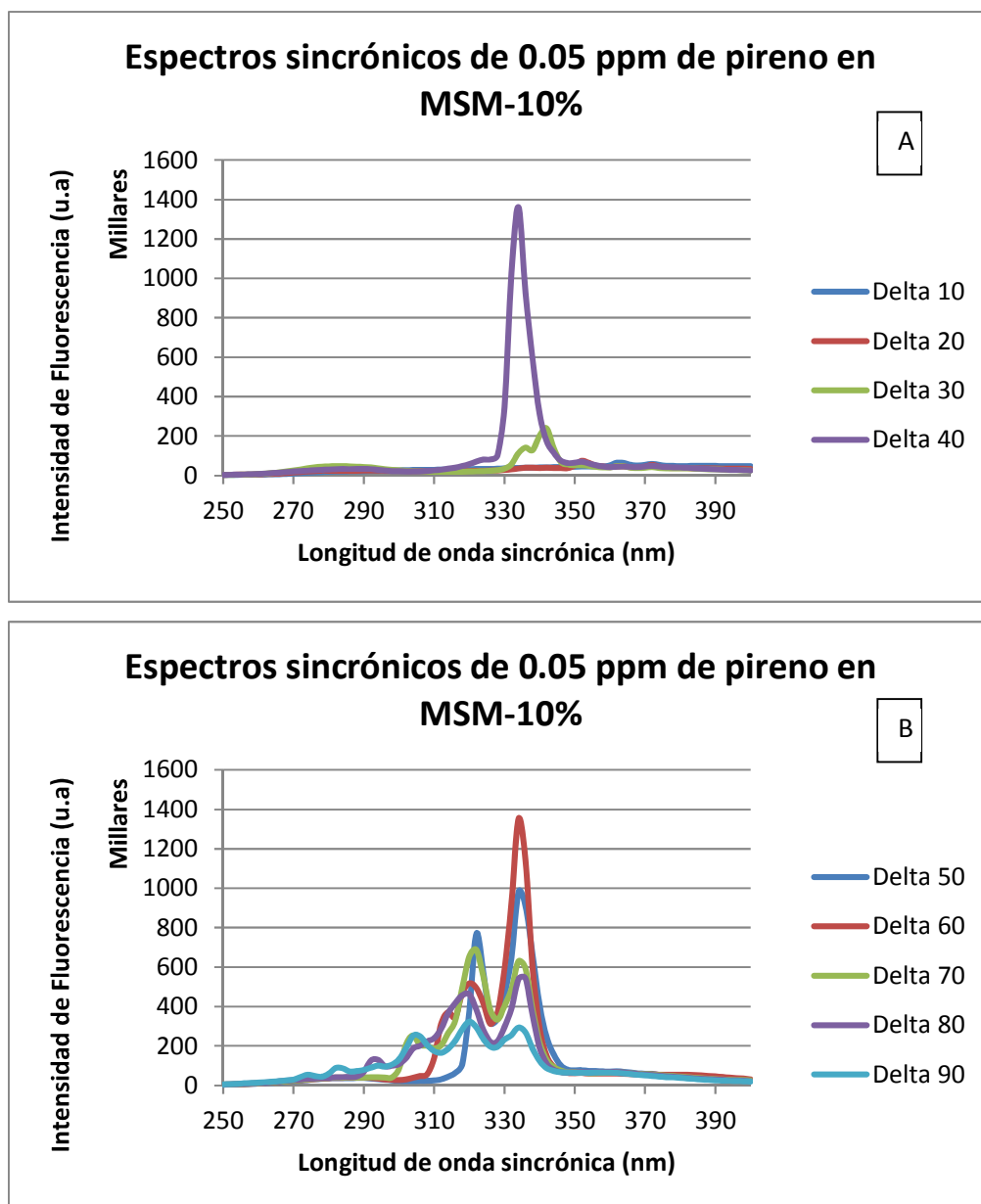


Figura 23 (A)(B). Espectros sincrónicos de 0.05 ppm de pireno en MSM-10% a diferentes $\Delta\lambda$.

Resultados similares se obtienen al analizar la figura 23, la cual corresponde a los espectros sincrónicos del pireno a diferentes $\Delta\lambda$ en medio MSM-10%. En este

caso, otra vez la $\Delta\lambda = 40\text{nm}$ fue la escogida para la determinación de este hidrocarburo, y la longitud de onda sincrónica 334nm.

La figura 24 muestra el comportamiento de los medios MSM-3% y 10% sin hidrocarburo en las condiciones de determinación de pireno por fluorescencia sincrónica. Se registró el espectro sincrónico a la $\Delta\lambda = 40\text{nm}$ de los medios MSM-3% y 10% respectivamente.

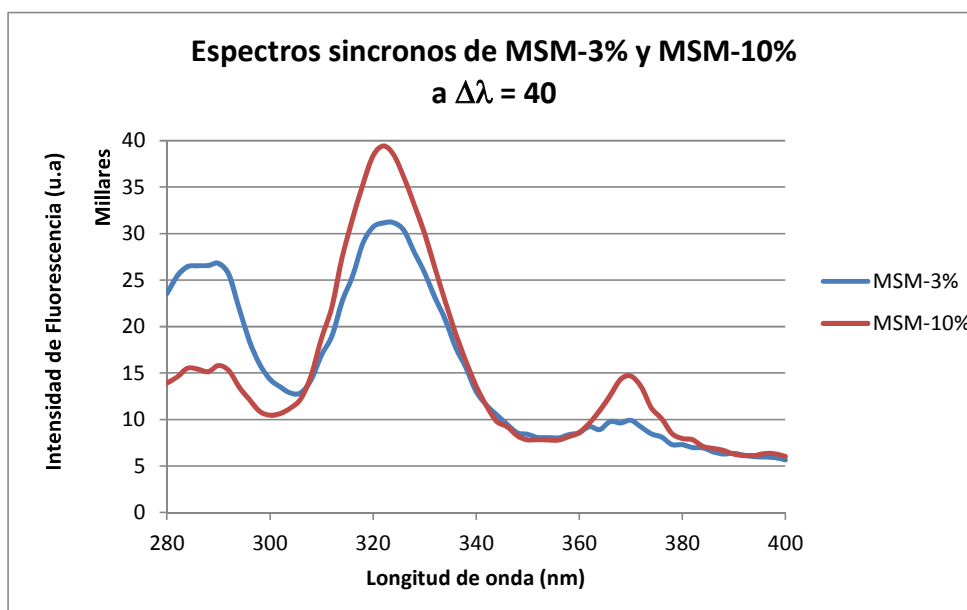


Figura 24. Espectros sincrónicos de los medios MSM-3% y MSM-10% a $\Delta\lambda=40\text{nm}$.

4.2.1 Conclusiones parciales

Debido a las características ópticas de los solventes (longitudes de onda de excitación y emisión) el metanol resulta mucho mejor que la acetona, pues interfiere menos en la determinación de los hidrocarburos. Por esa razón es el solvente escogido para disolver inicialmente a al fenantreno, fluoranteno y pireno. Las condiciones de determinación de los hidrocarburos en estudio por los tres métodos de fluorescencia empleados son las siguientes:

Tabla 4. Condiciones óptimas de determinación de los HPA utilizadas en este trabajo.

| | Fluorescencia de excitación-emisión | Fluorescencia sincrónica |
|-------------|---|---|
| Fenantreno | $\lambda_{exc} = 252 \text{ nm}$, $\lambda_{emi} = 363 \text{ nm}$ | $\Delta\lambda = 70 \text{ nm}$, $\lambda_{sinc} = 293 \text{ nm}$ |
| Fluoranteno | $\lambda_{exc} = 285 \text{ nm}$, $\lambda_{emi} = 460 \text{ nm}$ | $\Delta\lambda = 80 \text{ nm}$, $\lambda_{sinc} = 365 \text{ nm}$ |
| Pireno | $\lambda_{exc} = 334 \text{ nm}$, $\lambda_{emi} = 393 \text{ nm}$ | $\Delta\lambda = 40 \text{ nm}$, $\lambda_{sinc} = 334 \text{ nm}$ |

4.3 Sensibilidad y límite de detección en la determinación de fenantreno, fluoranteno y pireno por fluorescencia

4.3.1 Sensibilidad

Para determinar la sensibilidad de las determinaciones espectrofluorométricas de cada hidrocarburo se construyeron curvas de calibración de soluciones patrones de estos HPA y sus respectivas señales de fluorescencia por cada modalidad estudiada (excitación, emisión y sincronos). Las Tablas 5-10 muestran dichas curvas, donde las pendientes representan la sensibilidad en cada caso. Se muestra, además, la relación de las concentraciones (R conc) con la respectiva relación de fluorescencia (R fluo) para comprobar linealidad en la curva construida.

La Tabla 5 muestra las curvas de calibración del fenantreno en el medio MSM-3%. De la tabla se deduce que la fluorescencia sincrónica es la más sensible, seguida de la de excitación y finalmente la de emisión.

La Tabla 6 es consistente con los resultados de la Tabla 5, en este caso nuevamente la fluorescencia sincrónica resultó ser la más sensible, seguida de la fluorescencia de excitación y finalmente la de emisión. Al comparar los datos de una misma modalidad entre las tablas 5 y la 6, los valores de la Tabla 5 siempre son superiores, esto se debe al factor salinidad (a mayor salinidad menor sensibilidad cuando se compra la misma modalidad de fluorescencia). En todos los casos, las tres curvas son lineales en el rango de concentraciones de (0-1000) ppb, según lo indicado por la relación de las concentraciones y de la fluorescencia (parámetros R: Conc y R: Fluo).

Tabla 5. Curvas de calibración de fenantreno en MSM-3% por fluorescencia de excitación, emisión y sincrónica.

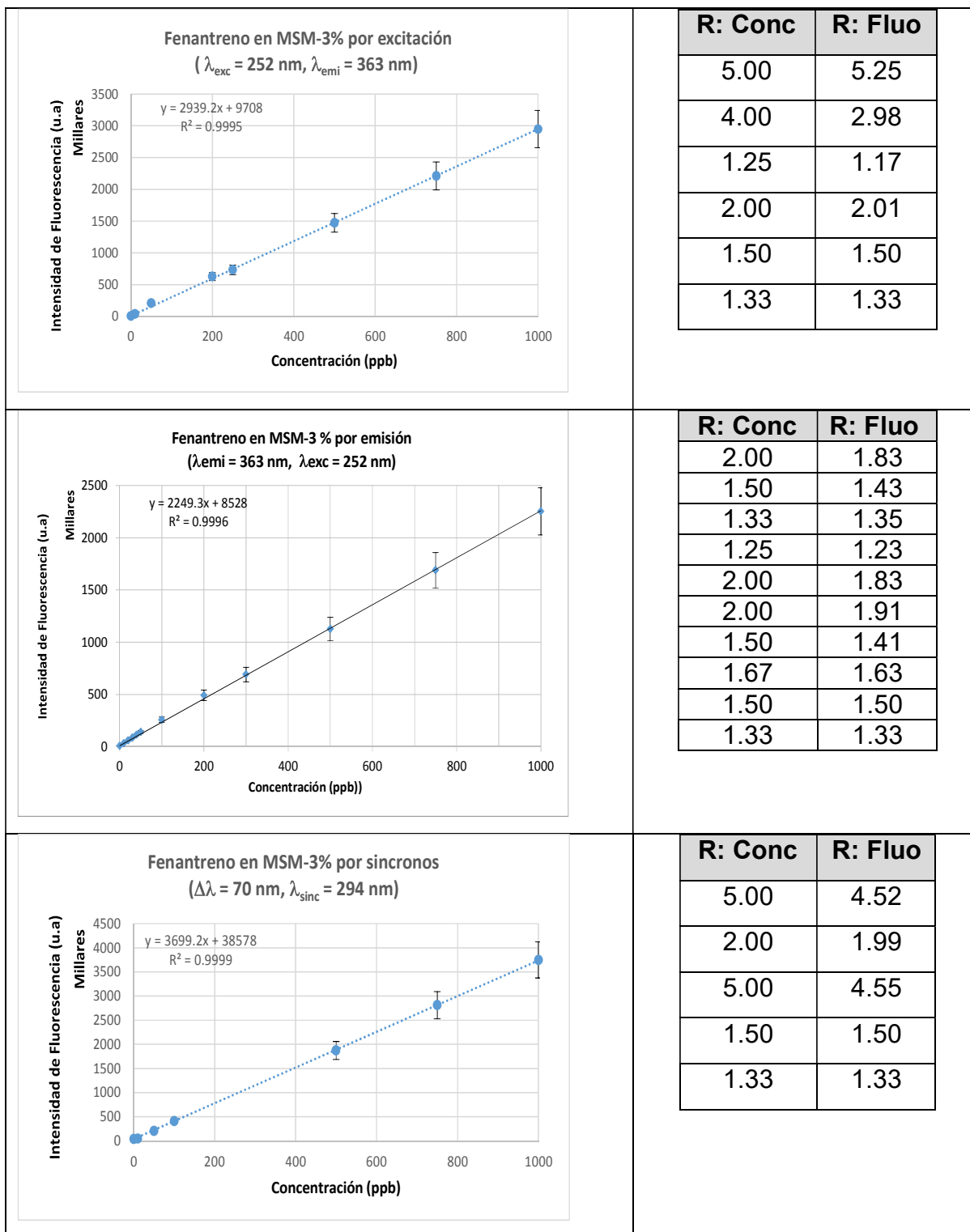
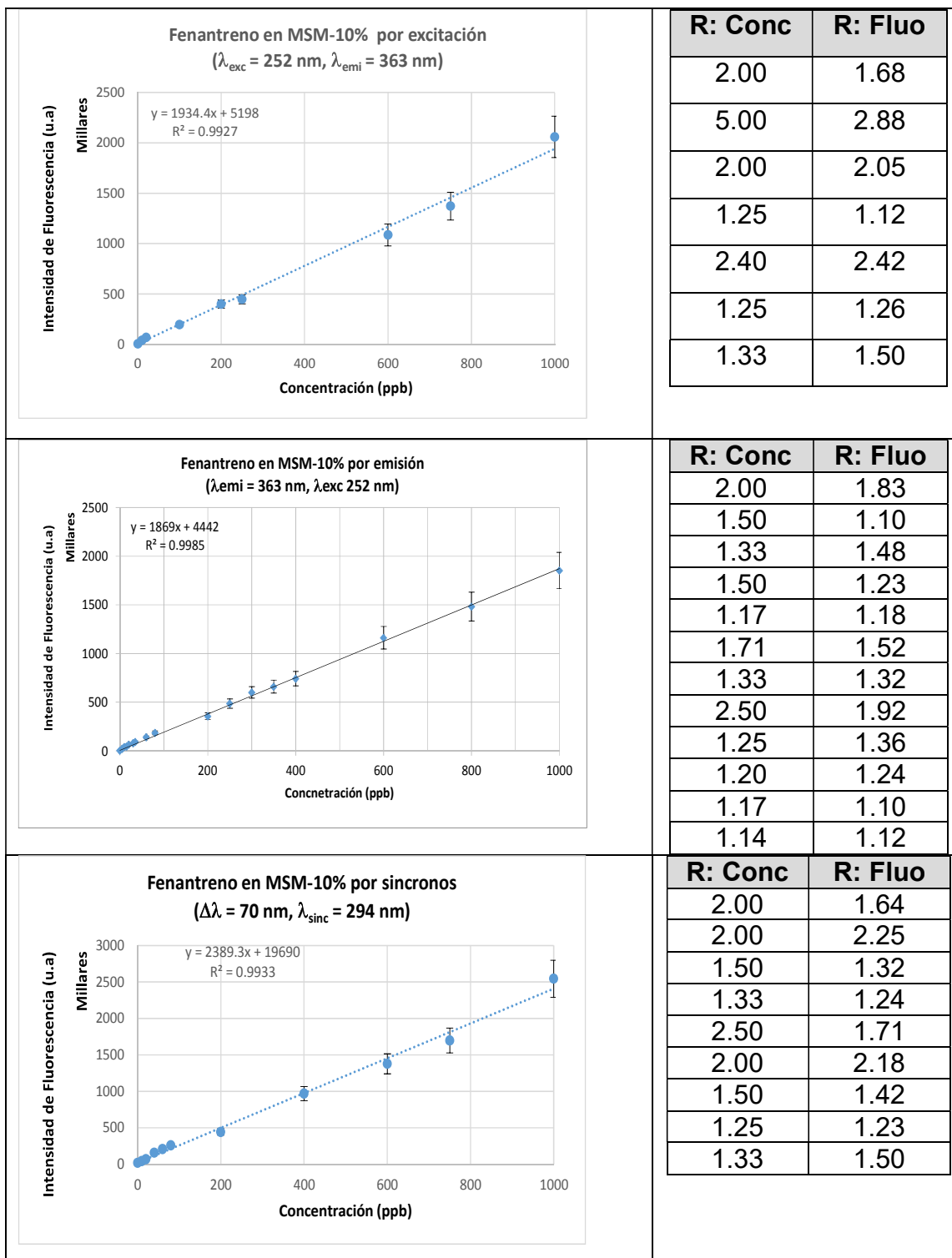


Tabla 6. Curvas de calibración de fenantreno en MSM-10% por fluorescencia de excitación, emisión y sincrónica.



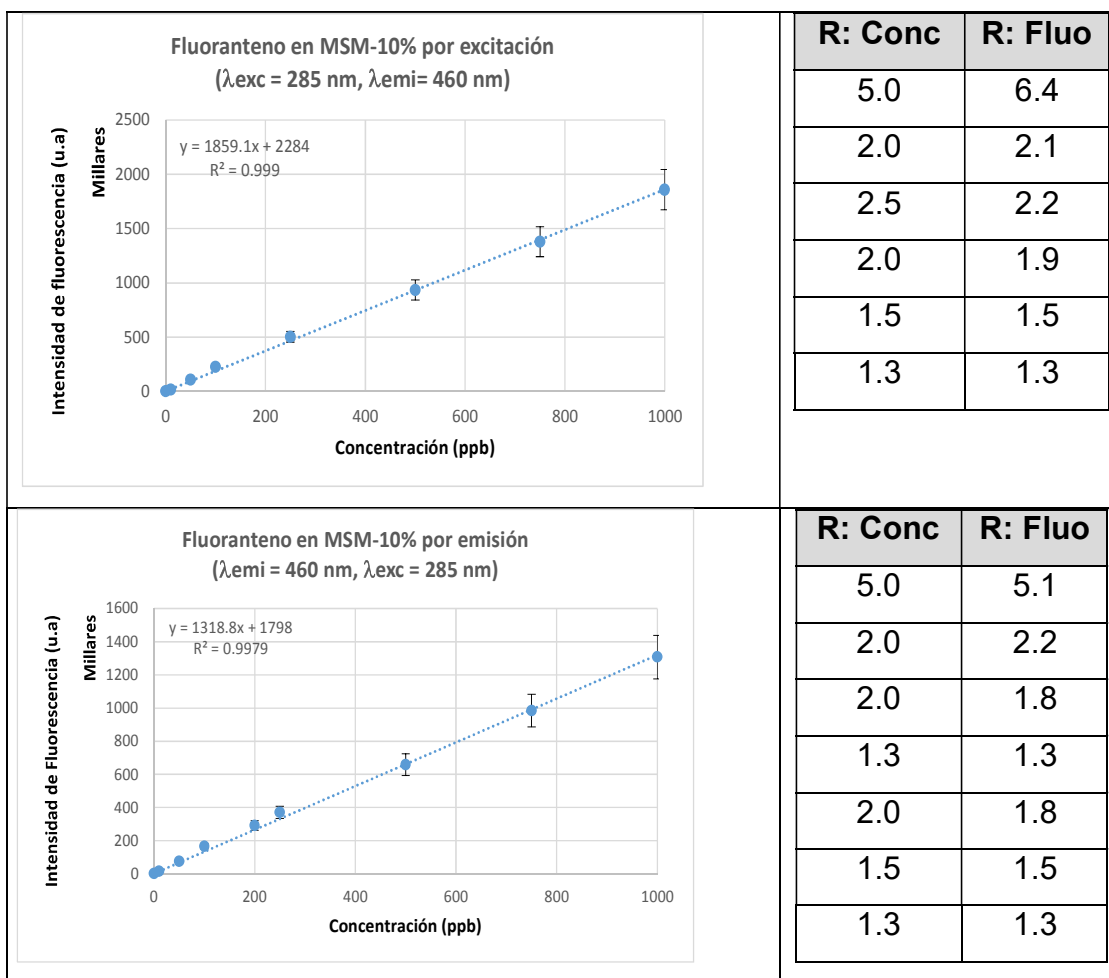
La Tabla 7 muestra las curvas de calibración del fluoranteno en medio MSM-3% por las tres modalidades de fluorescencia en estudio.

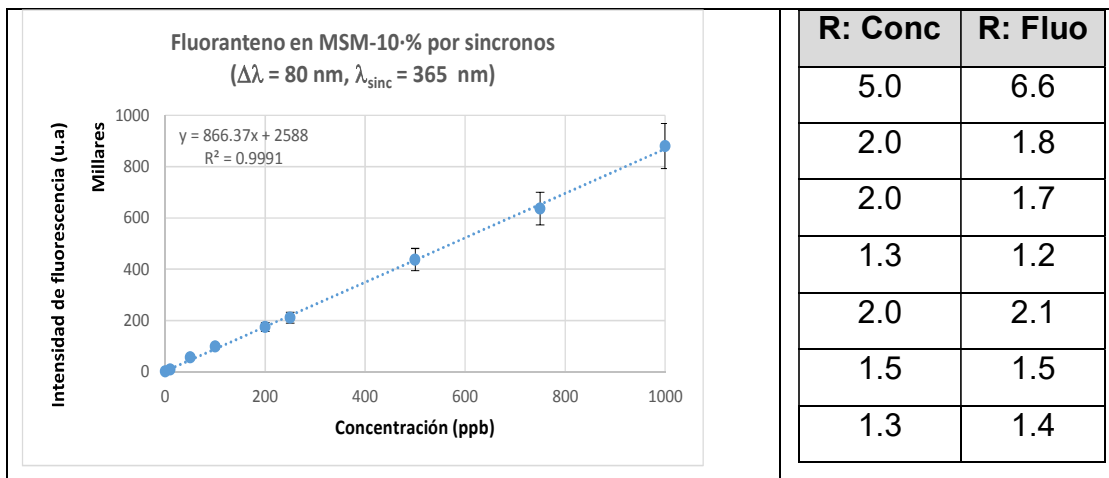
Tabla 7. Curvas de calibración de fluoranteno en MSM-3% por fluorescencia de excitación, emisión y sincrónica.

| <p style="text-align: center;">Fluoranteno en MSM-3% por excitación ($\lambda_{exc} = 285 \text{ nm}$, $\lambda_{emi} = 460 \text{ nm}$)</p> <p style="text-align: center;">Intensidad de fluorescencia (u.a) Millares</p> <p style="text-align: center;">Concentración (ppb)</p> | <table border="1"> <thead> <tr> <th>R: Conc</th> <th>R: Fluo</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>5.0</td><td>3.7</td></tr> <tr><td>2.0</td><td>2.2</td></tr> <tr><td>2.0</td><td>2.2</td></tr> <tr><td>1.3</td><td>1.3</td></tr> <tr><td>2.0</td><td>2.0</td></tr> <tr><td>1.5</td><td>1.5</td></tr> <tr><td>1.3</td><td>1.3</td></tr> </tbody> </table> | R: Conc | R: Fluo | 5.0 | 3.7 | 2.0 | 2.2 | 2.0 | 2.2 | 1.3 | 1.3 | 2.0 | 2.0 | 1.5 | 1.5 | 1.3 | 1.3 |
|--|--|---------|---------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| R: Conc | R: Fluo | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5.0 | 3.7 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2.0 | 2.2 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2.0 | 2.2 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1.3 | 1.3 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2.0 | 2.0 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1.5 | 1.5 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1.3 | 1.3 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p style="text-align: center;">Fluoranteno en MSM-3% por emisión ($\lambda_{emi} = 460 \text{ nm}$, $\lambda_{exc} = 285 \text{ nm}$)</p> <p style="text-align: center;">Intensidad de Fluorescencia (u.a) Millares</p> <p style="text-align: center;">Concentración (ppb)</p> | <table border="1"> <thead> <tr> <th>R: Conc</th> <th>R: Fluo</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>5.0</td><td>4.9</td></tr> <tr><td>2.0</td><td>2.0</td></tr> <tr><td>2.0</td><td>2.2</td></tr> <tr><td>1.3</td><td>1.3</td></tr> <tr><td>2.0</td><td>2.0</td></tr> <tr><td>1.5</td><td>1.4</td></tr> <tr><td>1.3</td><td>1.3</td></tr> </tbody> </table> | R: Conc | R: Fluo | 5.0 | 4.9 | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.2 | 1.3 | 1.3 | 2.0 | 2.0 | 1.5 | 1.4 | 1.3 | 1.3 |
| R: Conc | R: Fluo | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5.0 | 4.9 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2.0 | 2.0 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2.0 | 2.2 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1.3 | 1.3 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2.0 | 2.0 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1.5 | 1.4 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1.3 | 1.3 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p style="text-align: center;">Fluoranteno en MSM-3% por sincrónos ($\Delta\lambda = 80 \text{ nm}$, $\lambda_{sinc} = 365 \text{ nm}$)</p> <p style="text-align: center;">Intensidad de Fluorescencia (u.a) Millares</p> <p style="text-align: center;">Concentración (ppb)</p> | <table border="1"> <thead> <tr> <th>R: Conc</th> <th>R: Fluo</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>5.0</td><td>3.5</td></tr> <tr><td>2.0</td><td>2.2</td></tr> <tr><td>2.0</td><td>2.2</td></tr> <tr><td>1.3</td><td>1.3</td></tr> <tr><td>2.0</td><td>2.0</td></tr> <tr><td>1.5</td><td>1.5</td></tr> <tr><td>1.3</td><td>1.3</td></tr> </tbody> </table> | R: Conc | R: Fluo | 5.0 | 3.5 | 2.0 | 2.2 | 2.0 | 2.2 | 1.3 | 1.3 | 2.0 | 2.0 | 1.5 | 1.5 | 1.3 | 1.3 |
| R: Conc | R: Fluo | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5.0 | 3.5 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2.0 | 2.2 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2.0 | 2.2 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1.3 | 1.3 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2.0 | 2.0 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1.5 | 1.5 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1.3 | 1.3 | | | | | | | | | | | | | | | | |

La Tabla 7 indica que la fluorescencia de excitación es la más sensible, seguida de la de emisión y finalmente la sincrónica. Las tres curvas son lineales en el rango de concentraciones de (0-1000) ppb, vale recalcar, que las sensibilidades del fenantreno y fluoranteno en las modalidades excitación y emisión son prácticamente las mismas para el medio MSM-3%, esto podría explicarse por el hecho que ambos hidrocarburos tienen tres anillos aromáticos. El fluoranteno tiene 4 anillos, pero solo 3 de ellos son aromáticos, al igual que el fenantreno. Sin embargo, el fenantreno tiene una sensibilidad en sincrónica mucho mayor que la del fluoranteno. El comportamiento del fluoranteno en el medio MSM-10% se muestra en la Tabla 8.

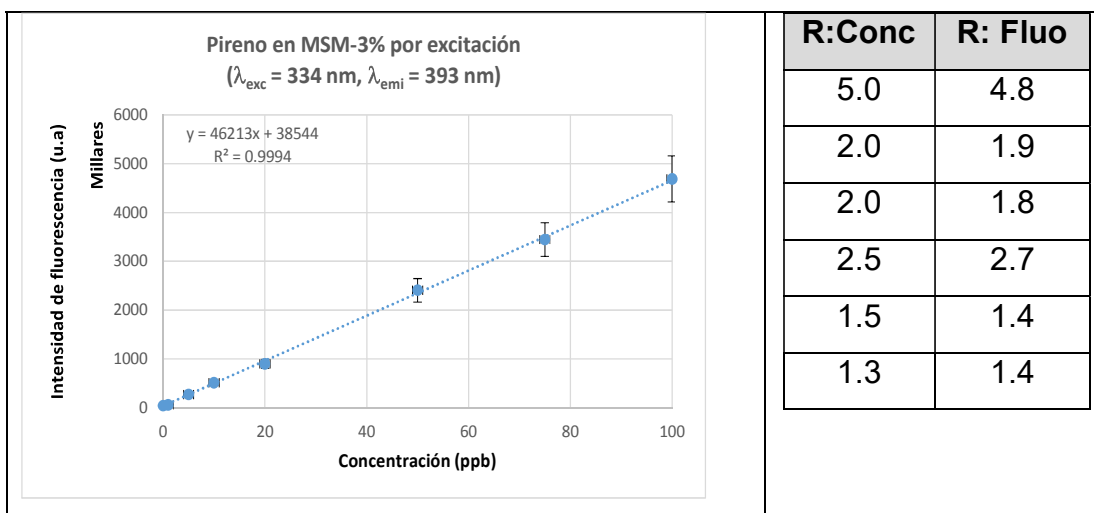
Tabla 8. Curvas de calibración de fluoranteno en MSM-10% por fluorescencia de excitación, emisión y sincrónica.





Los resultados de las curvas de calibración en el caso del pireno se muestran en las Tablas 9 y 10.

Tabla 9. Curvas de calibración de pireno en MSM-3% por fluorescencia de excitación, emisión y sincrónica.



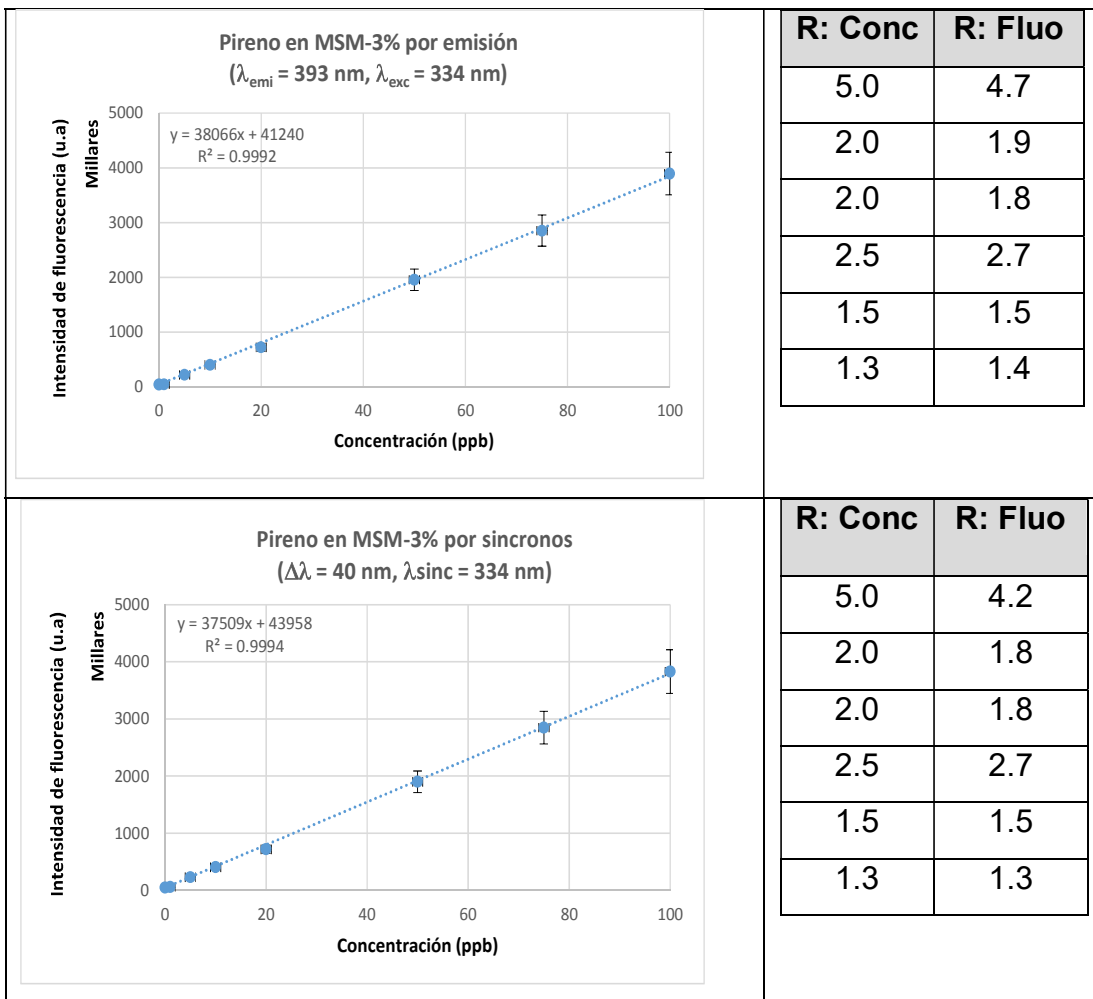
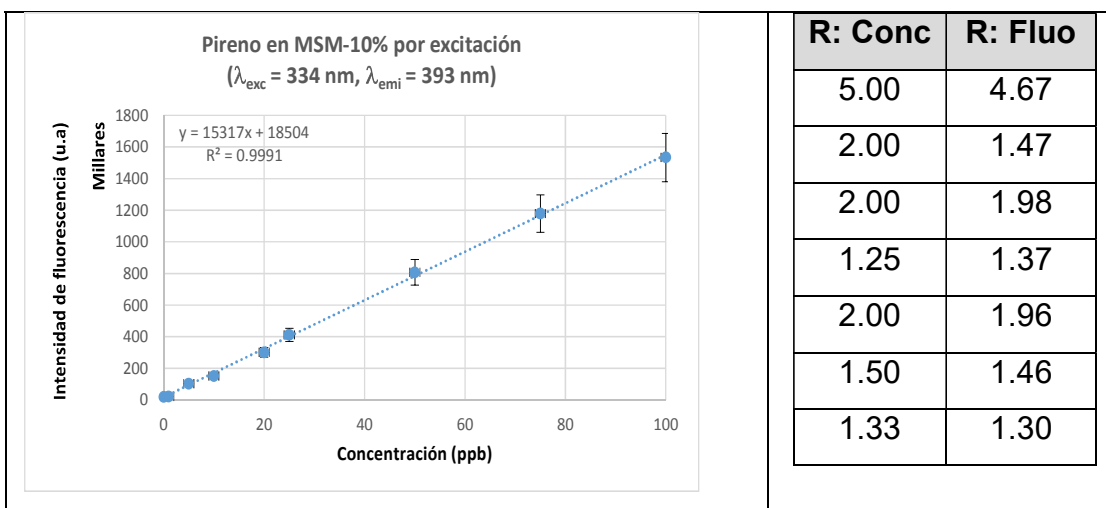
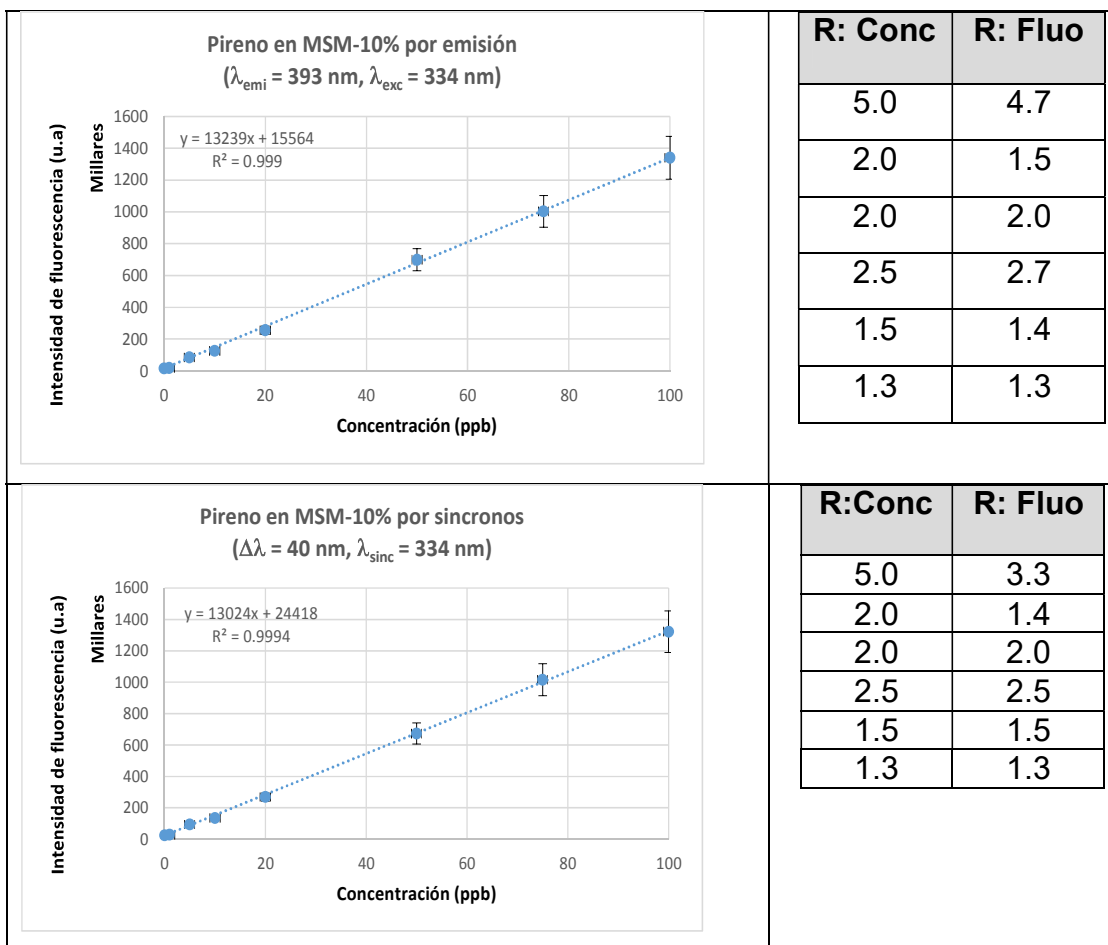


Tabla 10. Curvas de calibración de pireno en MSM-10% por fluorescencia de excitación, emisión y sincrónica.





Las tablas indican que otra vez la fluorescencia de excitación es la más sensible, seguida de la de emisión y finalmente la sincrónica. Las tres curvas son lineales en el rango de concentraciones de (0-100) ppb, en este caso el rango de la curva estudiado fue menor debido a la alta sensibilidad del analito, la cual era esperada teniendo en cuenta que el mismo tiene 4 anillos aromáticos.

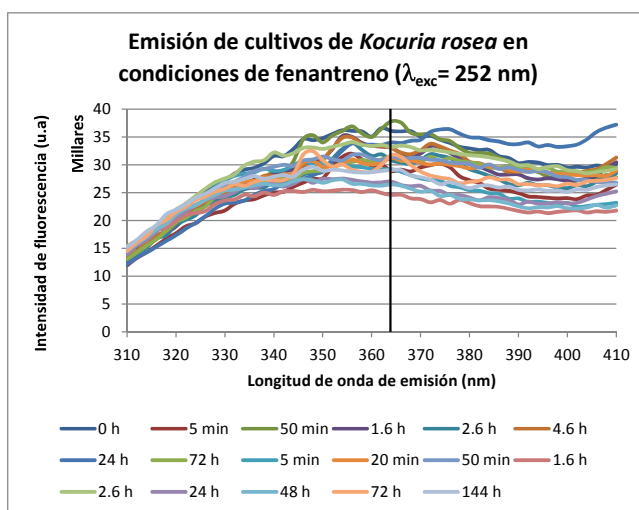
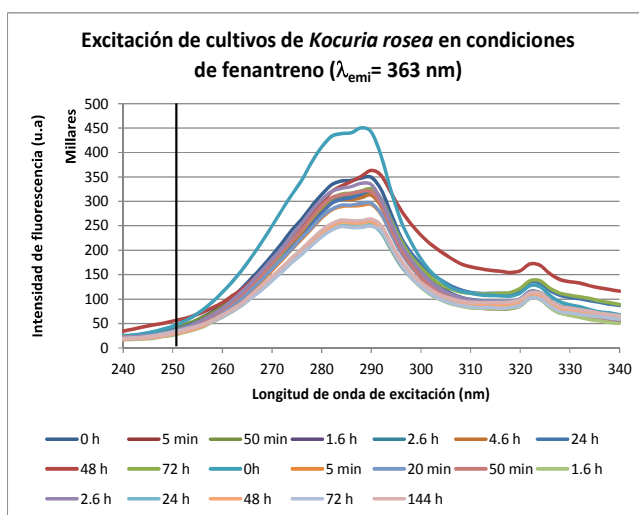
En el caso del pireno, para los dos medios MSM, la diferencia en sensibilidad entre las tres modalidades no es tan marcada como en el caso del fluoranteno. En el pireno la sensibilidad por excitación es mayor que la de emisión, pero la de emisión es comparable a la sincronicos.

4.3.2. Límite de detección

Para calcular el límite de detección de cada cepa con cada hidrocarburo en las diferentes modalidades de fluorescencia, se registraron espectros de los cultivos bacterianos en ausencia del hidrocarburo a diferentes tiempos (espectros de la matriz), utilizando las condiciones de determinación de cada hidrocarburo reportadas en la Tabla 4.

Fenantreno

Los espectros de la figura 25 corresponden a los cultivos de *Kocuria rosea* a diferentes tiempos registrados en condiciones de determinación de fenantreno para las tres modalidades de fluorescencia, pero sin la presencia del hidrocarburo.



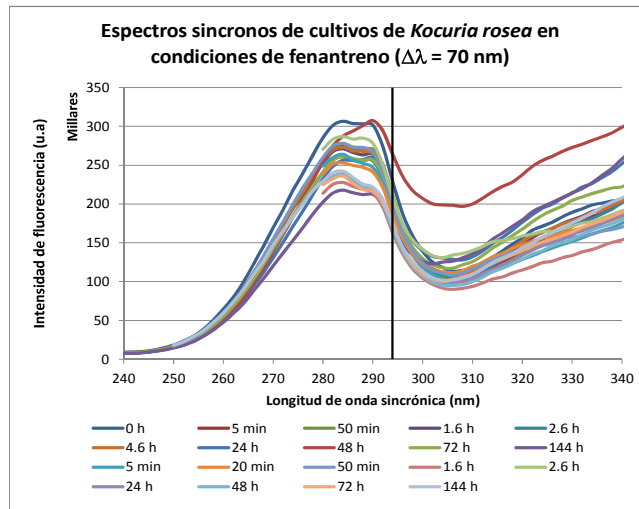


Figura 25. Espectros de cultivos de *Kocuria rosea* sin fenantreno, registrados en condiciones de determinación de fenantreno.

En los mismos aparece indicado con una línea las longitudes de onda a las cuales se lleva a cabo la determinación del fenantreno en cada modalidad de fluorescencia. El conjunto de intensidades de fluorescencia registradas a esas longitudes de ondas corresponde a la señal de la matriz, la mayor de esas intensidades, así como la desviación estándar del conjunto de señales, se utilizaron para calcular el límite de detección del fenantreno en cada modalidad.

De la figura 25 se observa que la menor contribución de la matriz es en la fluorescencia de emisión, seguida muy de cerca de la de excitación, la sensibilidad mayor en la determinación del fenantreno se obtuvo con la fluorescencia sincrónica, pero en esta modalidad la señal de la matriz es unas 5 veces mayor que en el caso de la de excitación-emisión, por lo que el límite de detección estará afectado en esta modalidad.

La figura 26 corresponde a los espectros de los cultivos de *Microbacterium testaceum* a diferentes tiempos registrados en condiciones de determinación de fenantreno para las tres modalidades de fluorescencia, pero sin la presencia del hidrocarburo.

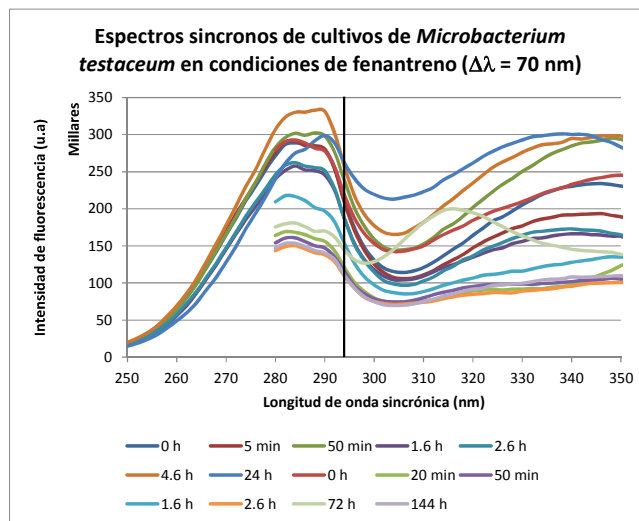
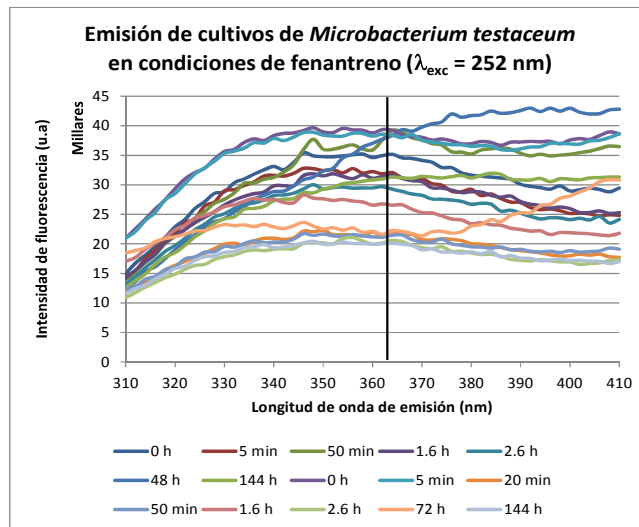
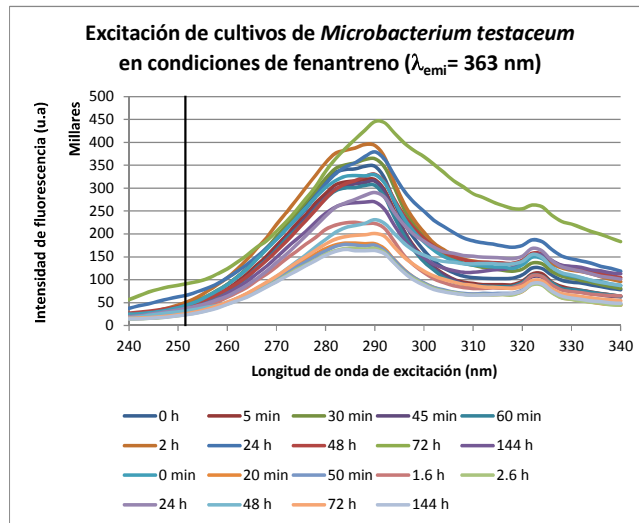
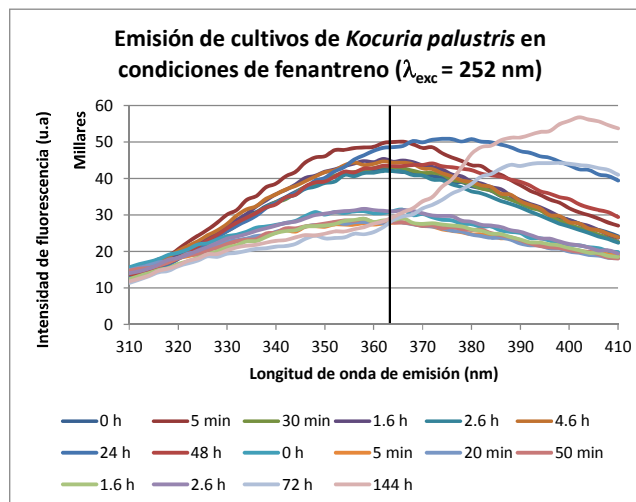
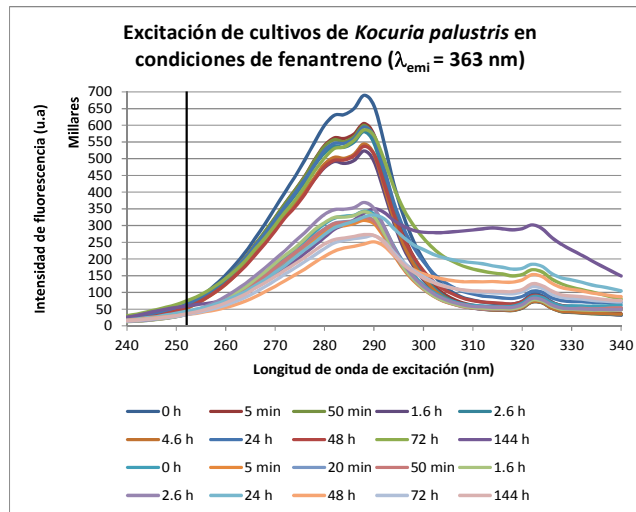


Figura 26. Espectros de cultivos de *Microbacterium testaceum* sin fenantreno, registrados en condiciones de determinación de fenantreno.

Al igual que en el caso anterior, la matriz afecta menos la determinación del fenantreno en las modalidades emisión y excitación. La señal de la matriz en modalidad sincrónica es al menos 2.5 veces mayor que en las otras dos modalidades. La figura 27 muestra la señal de la matriz para el caso de la cepa *Kocuria palustris*.



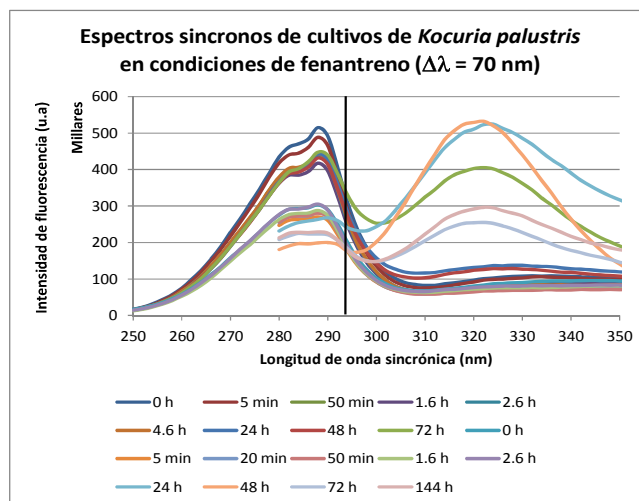


Figura 27. Espectros de cultivos de *Kocuria palustris* sin fenantreno, registrados en condiciones de determinación de fenantreno.

Al igual que en los casos anteriores, la matriz afecta menos la determinación del fenantreno en la modalidad excitación y emisión. Este comportamiento se repitió para las tres cepas. En el caso de esta cepa de *Kocuria palustris*, los espectros muestran un efecto del inóculo, pese a que la siembra de los cultivos siempre se realizó de la misma manera. Este efecto afecta el valor de la desviación estándar de la señal de la matriz, por lo que afectará al límite de detección.

Fluoranteno

Las figuras 28 – 30 muestran el comportamiento de la matriz en el caso de la determinación de fluoranteno. Al igual que en el caso del fenantreno, la señal de la matriz es más intensa en la fluorescencia sincrónica teniendo en cuenta que esta modalidad es la menos sensible, pues el límite de detección en este caso será más elevado que para las otras dos modalidades. Sin embargo, en la modalidad sincrónica no es tan evidente el efecto del inóculo que se observa en el caso de la fluorescencia de excitación y emisión. El comportamiento de la señal matriz en el caso de la *Kocuria rosea* se muestra en la figura 28 y el de *Microbacterium testaceum* se muestra en la figura 29.

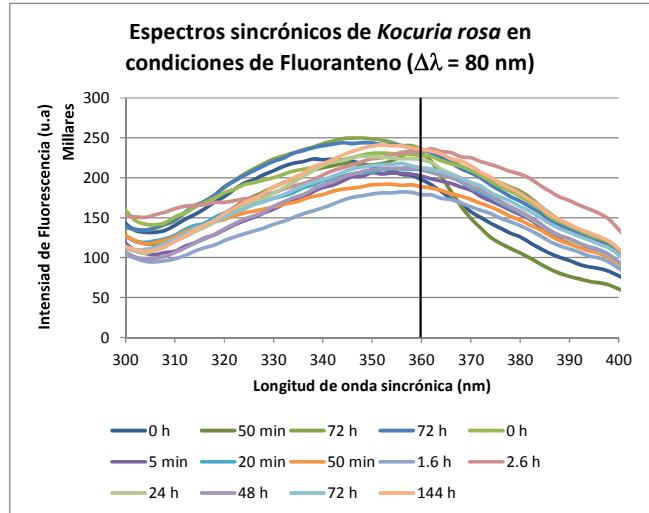
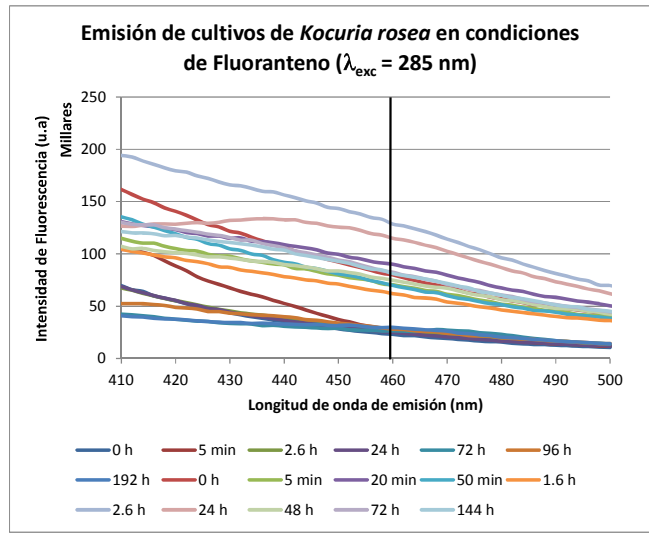
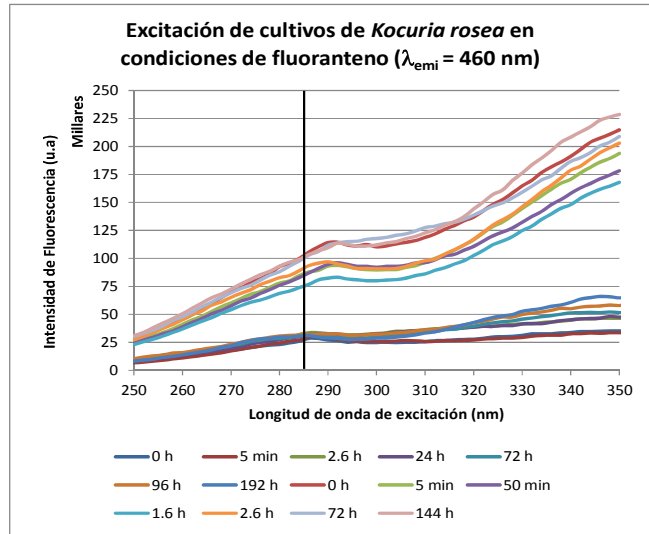


Figura 28. Espectros de cultivos de *Kocuria rosea* sin fluoranteno, registrados en condiciones de determinación de fluoranteno.

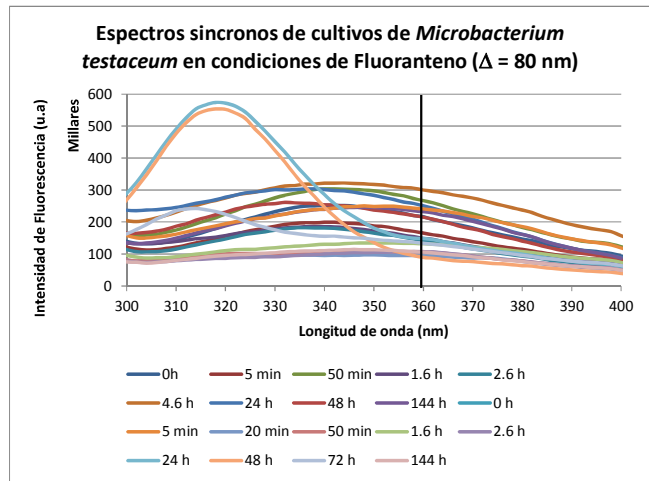
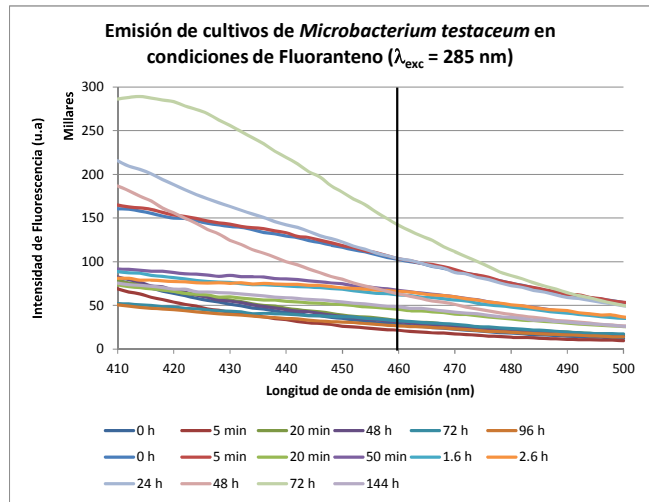
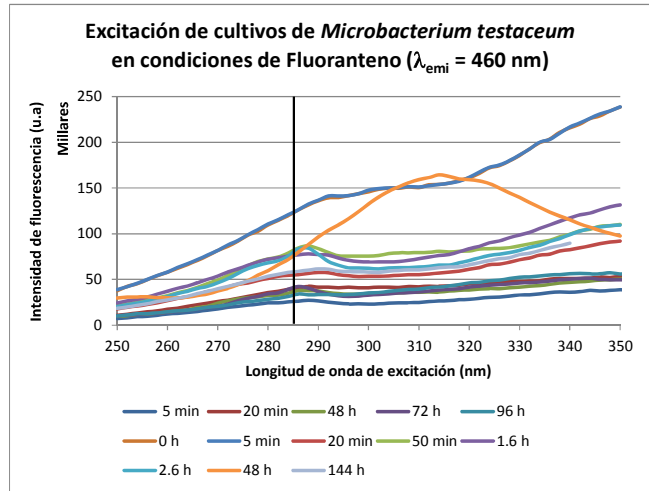
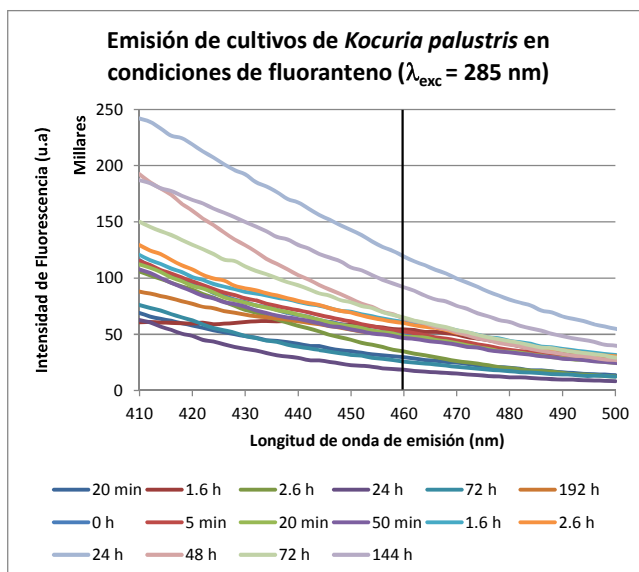
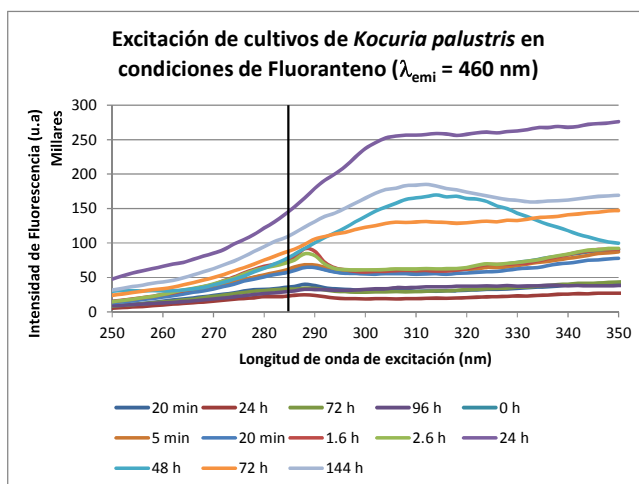


Figura 29. Espectros de cultivos de *Microbacterium testaceum* sin fluoranteno, registrados en condiciones de determinación de fluoranteno.

La figura 29 muestra que el comportamiento de *Microbacterium testaceum* es similar al descrito anteriormente para la cepa *Kocuria rosea* en condiciones de fluoranteno. La mayor señal de la matriz es en modalidad sincrónica, siendo similar la señal para excitación y emisión. Por tanto, el límite de detección en sincronicos no será el mejor.

La figura 30 muestra el comportamiento de la señal matriz en el caso de la cepa *Kocuria palustris* y los resultados obtenidos coinciden con los descritos para las cepas *Kocuria rosea* y *Microbacterium testaceum*.



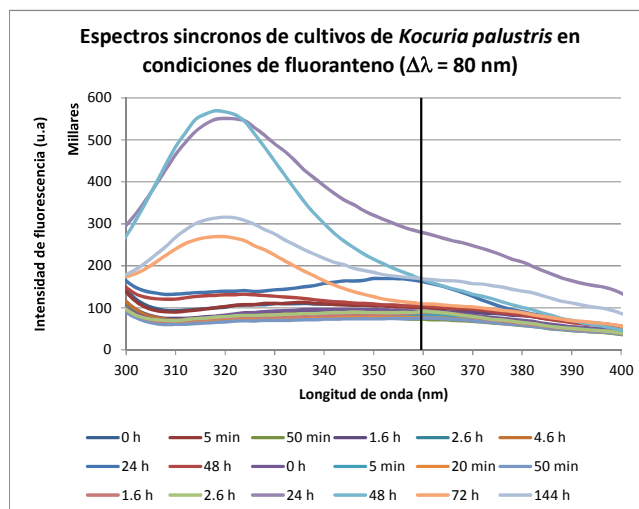


Figura 30. Espectros de cultivos de *Kocuria palustris* sin fluoranteno, registrados en condiciones de determinación de fluoranteno.

Pireno

Las figuras 31– 33 muestran el comportamiento de la matriz en el caso de la determinación de pireno. La figura 31 muestra el comportamiento de la señal de la matriz en el caso de la cepa *Kocuria rosea*. Como puede apreciarse, en el caso del pireno la modalidad sincrónica es la más ventajosa, ya que fue en la que la señal de la matriz fue menor, aunque la diferencia entre esta modalidad y las otras dos no es tan marcada como en el caso del fenantreno. Vale aclarar que en el caso de la fluorescencia de excitación y emisión se ve claramente el efecto del inóculo, particularmente en esta figura se manifiesta que el límite de detección puede disminuirse si hay un buen control del inóculo; el comportamiento de la señal matriz en el caso de la cepa *Microbacterium testaceum* se muestra en la figura 32.

En este caso, los resultados coinciden con los de la figura 311. La fluorescencia sincrónica es la que produce menor señal de la matriz en condiciones de determinación de pireno, los resultados obtenidos en el caso de la cepa *Kocuria palustris* se muestran en la figura 33, y coinciden con los anteriores.

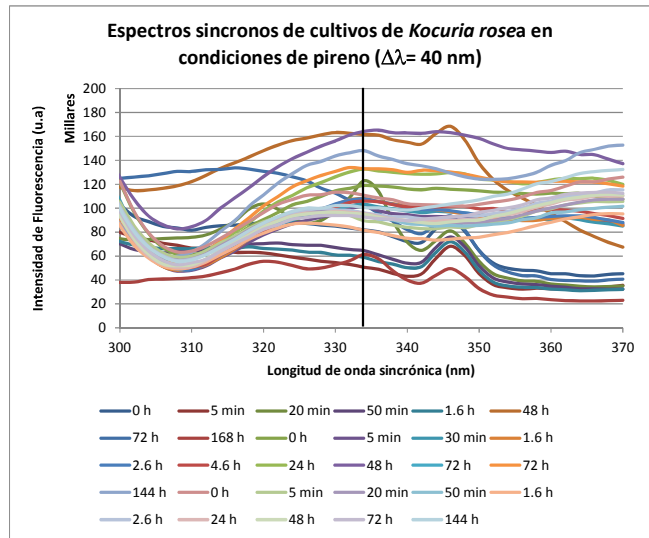
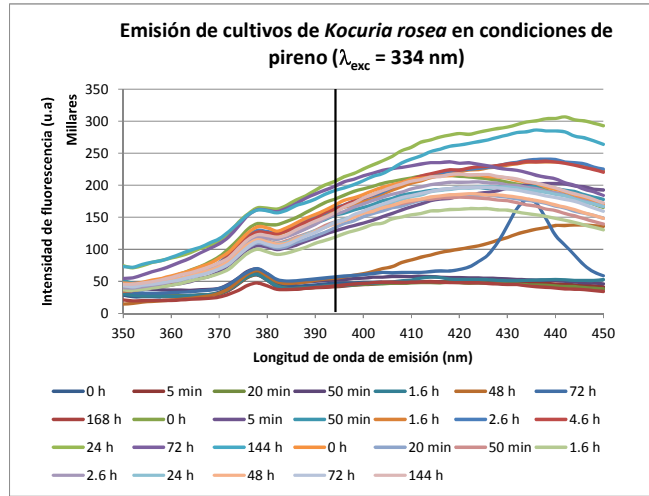
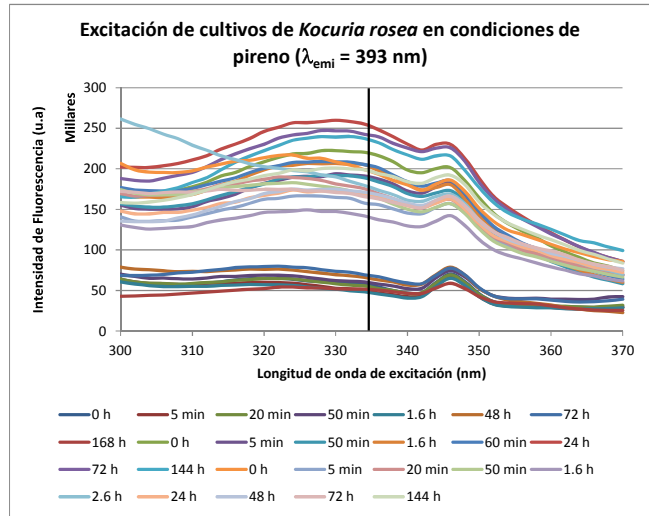


Figura 31. Espectros de cultivos de *Kocuria rosea* sin pireno, registrados en condiciones de determinación de pireno.

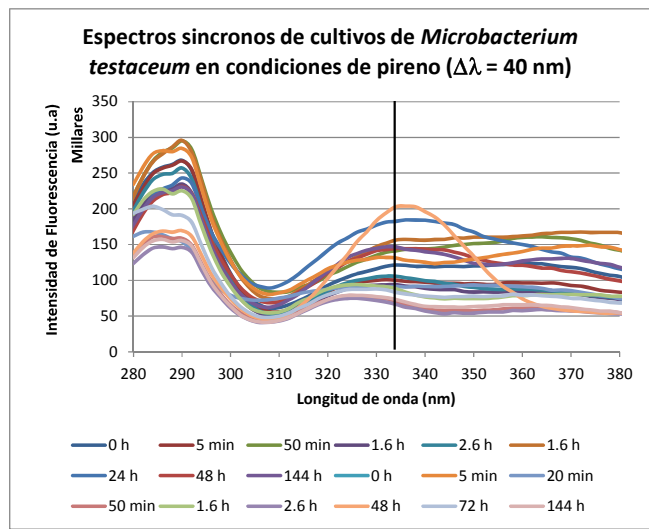
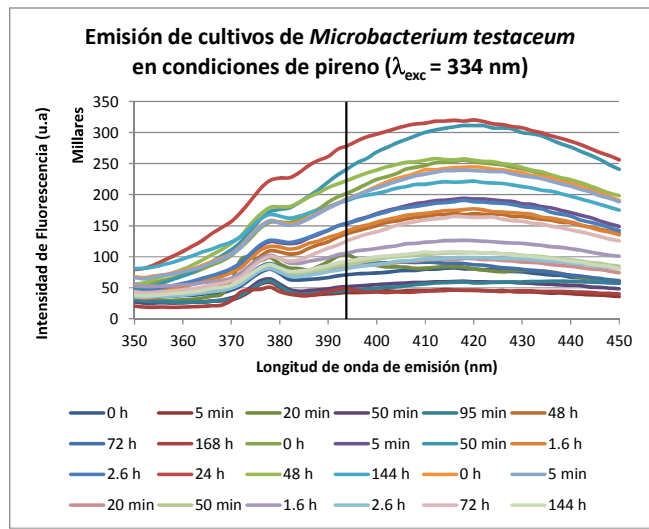
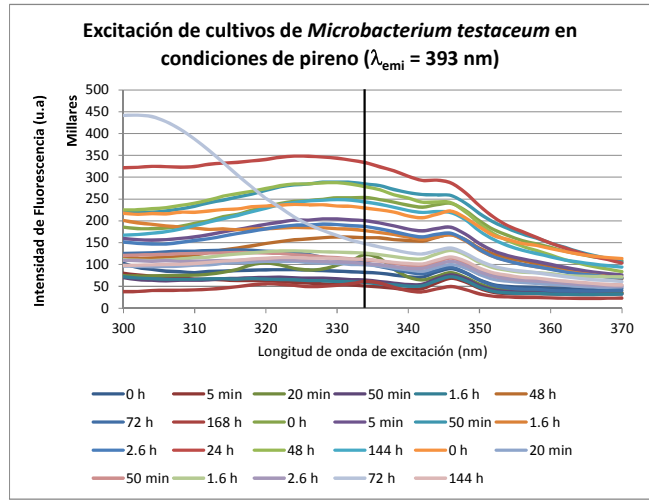


Figura 32. Espectros de cultivos de *Microbacterium testaceum* sin pireno, registrados en condiciones de determinación de pireno.

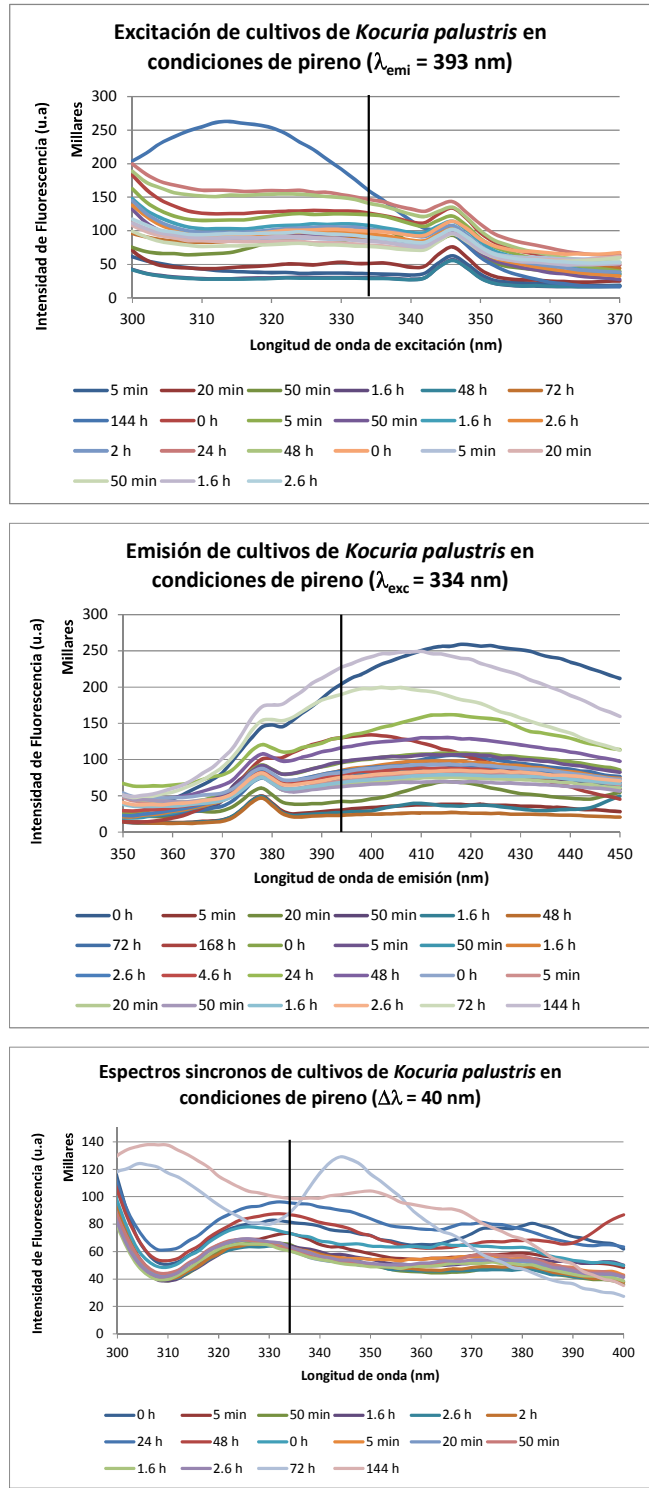


Figura 33. Espectros de cultivos de *Kocuria palustris* sin pireno, registrados en condiciones de determinación de pireno.

Una vez conocida la señal máxima de la matriz en cada caso y la desviación estándar del conjunto de espectros que conforman la matriz, se calculó el límite de detección de cada hidrocarburo con las tres cepas por las tres modalidades utilizando la ecuación descrita en la sección 3.2.3.3. Los resultados se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Límites de detección en la determinación de fenantreno, fluoranteno y pireno por fluorescencia de excitación, emisión y sincrónica en cultivos de actinobacterias en medio MSM altamente salinos.

| Cultivo de actinobacteria | Hidrocarburo | Método | Límite de detección (ppb) |
|----------------------------------|---------------------|---------------|----------------------------------|
| <i>Kocuria rosea</i> | Fenantreno | Excitación | 27 |
| | | Emisión | 62 |
| | | Sincronos | 102 |
| | Fluoranteno | Excitación | 69 |
| | | Emisión | 104 |
| | | Sincronos | 211 |
| | Pireno | Excitación | 10 |
| | | Emisión | 10 |
| | | Sincronos | 7 |
| <i>Microbacterium testaceum</i> | Fenantreno | Excitación | 48 |
| | | Emisión | 27 |
| | | Sincronos | 116 |
| | Fluoranteno | Excitación | 76 |
| | | Emisión | 112 |
| | | Sincronos | 372 |
| | Pireno | Excitación | 13 |
| | | Emisión | 13 |
| | | Sincronos | 9 |
| <i>Kocuria palustris</i> | Fenantreno | Excitación | 62 |
| | | Emisión | 39 |
| | | Sincronos | 215 |
| | Fluoranteno | Excitación | 143 |
| | | Emisión | 147 |
| | | Sincronos | 502 |
| | Pireno | Excitación | 21 |
| | | Emisión | 29 |
| | | Sincronos | 11 |

4.3.3 Conclusiones parciales

Para las tres modalidades de fluorescencia, la sensibilidad de los hidrocarburos fue mayor en el medio MSM-3% que en el MSM-10%. Este efecto fue mayor en el pireno, seguido del fluoranteno y finalmente en el fenantreno. Este resultado concuerda con lo obtenido anteriormente en el caso del antraceno, y está debido al efecto de la salinidad [10], la relación de la intensidad de fluorescencia entre el MSM-3% y el MSM-10% en el caso del fenantreno fue (1.5, 1.2 y 1.3) para la fluorescencia de excitación, emisión y sincrónica respectivamente. En el caso del fluoranteno esta relación fue (1.6, 1.7, 1.6) y en el pireno fue (3.0, 2.9 y 2.9) respectivamente.

La modalidad más sensible en la determinación de los hidrocarburos fluoranteno y pireno fue la excitación, este resultado nuevamente concuerda con el obtenido en el caso del antraceno [10], sin embargo, la modalidad más sensible en el caso del fenantreno fue la sincrónica, resultado no esperado, pues debido a la similitud del antraceno con el fenantreno se esperaba un comportamiento igual al del antraceno. Para los tres hidrocarburos la fluorescencia de excitación fue de 1.03 a 1.4 veces mayor que la de emisión, en el caso del fluoranteno y pireno, la de emisión fue de 1.0 a 1.6 mayor que la sincrónica, estos rangos de valores coinciden con los obtenidos para el antraceno [10]. En el caso del fenantreno, la sincrónica fue de 1.3 a 1.6 mayor que la de emisión.

Al tener en cuenta los límites de detección de cada cepa, se estimó que las mejores modalidades para cada hidrocarburo son las mostradas en la Tabla 12. Al comprobar los resultados de la Tabla 12 con los obtenidos con el antraceno, hay coincidencias con este, en los casos en que la modalidad más adecuada es la excitación.

Sería posible optimizar las condiciones de cuantificación, si en lugar de encontrar un límite de detección general basado en la máxima señal de la matriz a lo largo

de todo el estudio se determinara un límite de detección para cada momento del estudio, es decir determinar el límite de detección a las 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, etc.

Tabla 12. Condiciones óptimas de determinación de los HPA por fluorescencia.

| Cepa | Hidrocarburo | Modalidad | Límite de det. (ppb) |
|---------------------------------|---------------------|------------------|-----------------------------|
| <i>Kocuria rosea</i> | Fenantreno | Excitación | 27 |
| | Fluoranteno | Excitación | 69 |
| | Pireno | Exc, Emi y Sinc | 10, 10, 7 |
| <i>Microbacterium testaceum</i> | Fenantreno | Emisión | 27 |
| | Fluoranteno | Excitación | 76 |
| | Pireno | Exc, Emi y Sinc | 13, 13, 9 |
| <i>Kocuria palustris</i> | Fenantreno | Emisión | 39 |
| | Fluoranteno | Exc, Emi | 143, 147 |
| | Pireno | Sincronos | 11 |

4.4. Determinación de la concentración residual de fenantreno, fluoranteno y pireno en cultivos de *Kocuria rosea* por fluorescencia de excitación, emisión y sincrónica.

Las figuras 34-36 muestran la concentración residual de los hidrocarburos determinadas en cultivos bacterianos de *Kocuria rosea* utilizando las tres modalidades de fluorescencia, en las condiciones de determinación indicadas en la Tabla 4.

Fenantreno

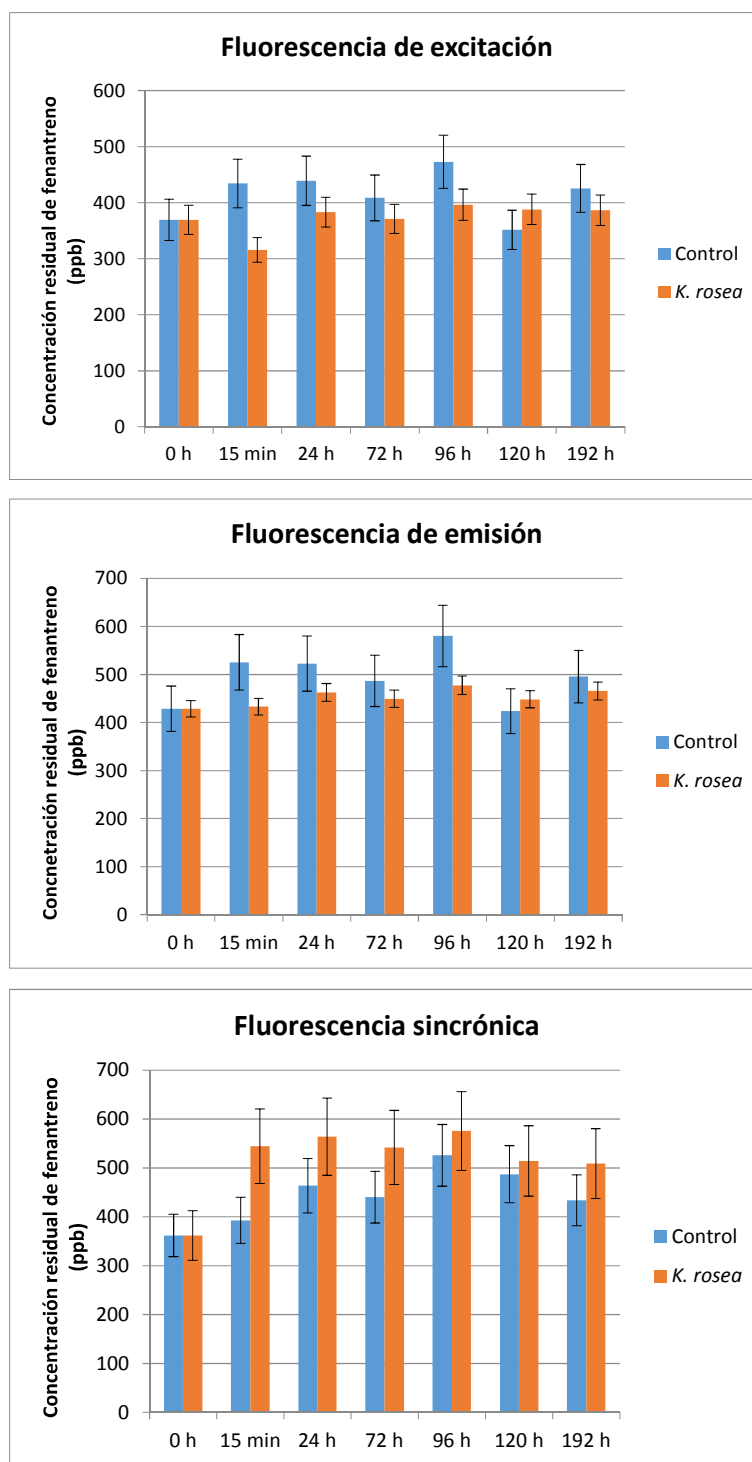


Figura 34. Concentración residual de fenantreno en cultivos de *Kocuria rosea* por fluorescencia de excitación, emisión y sincrónica (n = 3).

Teniendo en cuenta que la misma muestra se midió por las tres modalidades de fluorescencia, es de esperarse que la concentración de fenantreno en las muestras controles sea la misma por las tres modalidades. La concentración promedio en partes por billón del fenantreno en las muestras control en MSM-3% ($n = 3$), teniendo en cuenta todos los tiempos fue: (414 ± 42) , (495 ± 56) , (444 ± 55) por las modalidades de excitación, emisión y sincrónica respectivamente. Como se esperaba, no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) entre estas concentraciones por las tres modalidades.

La figura 34 muestra que no hay disminución significativa de la concentración residual del fenantreno con respecto al tiempo cero en el cultivo bacteriano para los casos de las modalidades excitación y emisión. Lo mismo ocurre con la solución control, aunque esta presentó mayor variación que las muestras. El %RSD de los valores de las concentraciones del hidrocarburo en los cultivos bacterianos en todos los tiempos es 7% y 4% para las modalidades excitación y emisión respectivamente. Para la solución control, el %RSD encontrado fue 10% y 11% para las mismas modalidades.

En el caso de la fluorescencia sincrónica, el %RSD fue mayor tanto para muestras como para controles. Además, hay diferencias significativas en la concentración residual del fenantreno con respecto al tiempo cero entre las muestras, pero no en los controles. La concentración residual de fenantreno pareciera subir en el tiempo en los cultivos bacterianos, lo cual no puede ser pues significaría que la bacteria produce fenantreno. Este aumento es debido a un efecto matriz, que no está presente en el caso de la fluorescencia de excitación o emisión. La composición del cultivo bacteriano va cambiando en el tiempo, debido a los metabolitos y enzimas que estas van produciendo. Este cambio en la matriz no es transparente para la fluorescencia sincrónica. La figura 25, que muestra el espectro de fondo de la matriz (cultivo de *Kocuria rosea*), indica que la señal de fondo es más estable en la fluorescencia de excitación y emisión que en la sincrónica. Por lo tanto, teniendo en cuenta el %RSD obtenido (7%), el límite de detección encontrado (27

ppb), y la estabilidad de la señal de fondo de la matriz (figura 25), se concluye que la mejor modalidad para determinar al fenantreno en este cultivo bacteriano es la fluorescencia de excitación.

Fluoranteno

La figura 35 muestra la concentración residual del fluoranteno en los cultivos de *Kocuria rosea* por las tres modalidades de fluorescencia estudiadas. La concentración promedio en partes por billón del fluoranteno en las muestras control en MSM-3% ($n = 3$), teniendo en cuenta todos los tiempos fue: (261 ± 3) , (277 ± 40) , (460 ± 115) por las modalidades de excitación, emisión y sincrónica respectivamente. No hubo diferencias significativas en estas concentraciones en las modalidades de excitación y emisión, pero sí fue significativamente diferente en el caso de la sincrónica. Esto indica que hay un severo efecto matriz en la modalidad sincrónica, en las condiciones utilizadas. En este trabajo se estudió el $\Delta\lambda$ de 10 a 100 nm. Este resultado indica que este intervalo debe ampliarse a fin de encontrar un $\Delta\lambda$ más adecuado, pues el escogido tiene influencia del medio y no se debe solamente al fluoranteno.

La figura 35 muestra, además, que en las tres modalidades hay un aumento de la concentración residual de fluoranteno en los cultivos bacterianos con el tiempo. Este aumento es debido a un efecto matriz, pues no se espera que la bacteria produzca al hidrocarburo. Sin embargo, si puede ser posible que la bacteria produzca algún metabolito o enzima que se excite o emita en las mismas longitudes de onda del fluoranteno. La variabilidad de la solución control se le atribuye a efectos de volatilización o sublimación de este hidrocarburo. En las condiciones establecidas en este trabajo y para este cultivo bacteriano, ninguna de estas modalidades es adecuada, debido al efecto matriz.

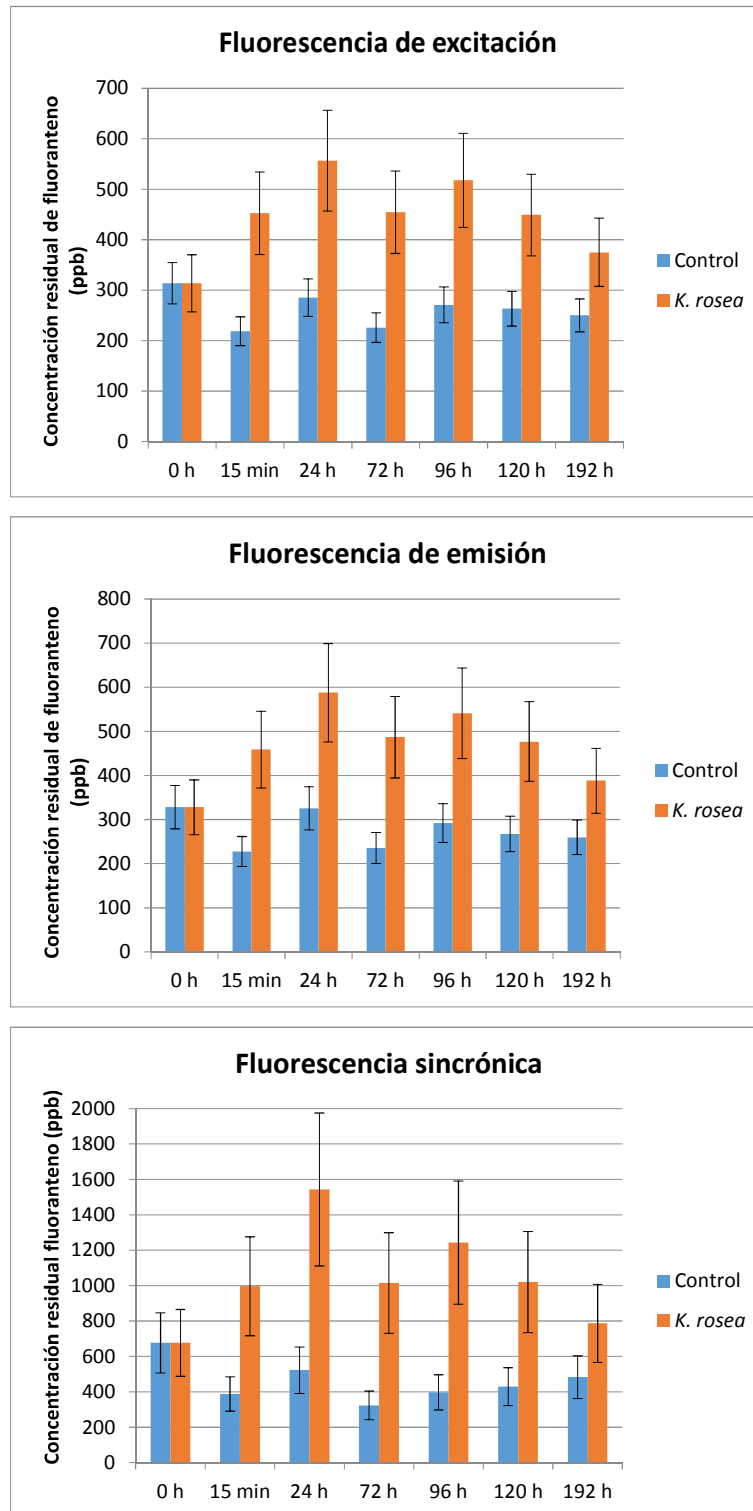


Figura 35. Concentración residual de fluoranteno en cultivos de *Kocuria rosea* por fluorescencia de excitación, emisión y sincrónica (n = 3).

Pireno

La figura 36 muestra la concentración residual del pireno en los cultivos de *Kocuria rosea* por las tres modalidades de fluorescencia estudiadas. La concentración promedio en ppb del pireno en las muestras control en MSM-3% (n = 3), teniendo en cuenta todos los tiempos fue: (97 ± 11), (102 ± 8), (95 ± 7) por las modalidades de excitación, emisión y sincrónica respectivamente. No hubo diferencias significativas entre estas concentraciones por las tres modalidades, como era esperado.

La figura 36 muestra además, que no hay disminución significativa de la concentración residual del pireno con respecto al tiempo cero en el cultivo bacteriano para los tres casos de fluorescencia. Lo mismo ocurre con la solución control. El %RSD de los valores de las concentraciones del hidrocarburo en los cultivos bacterianos en todos los tiempos es 10%, 8% y 4% para las modalidades excitación, emisión y sincrónica respectivamente. Para la solución control, el %RSD encontrado fue 11%, 8% y 8% para las mismas modalidades.

La figura 33, que muestra el espectro de fondo de la matriz (cultivos de *Kocuria rosea*), indica que la señal de fondo es más estable en la fluorescencia de excitación y emisión que en la sincrónica, pero debido a la alta sensibilidad de los tres métodos para este analito, esta diferencia en la estabilidad de la señal de fondo no se ve reflejada en los límites de detección, pues son prácticamente iguales. Por lo tanto, teniendo en cuenta la similitud en los %RSD y los límites de detección obtenidos así como la relativa estabilidad de la señal de fondo de la matriz (figura 33), se concluye que cualquiera de las tres modalidades es igualmente adecuada para determinar al pireno por fluorescencia.

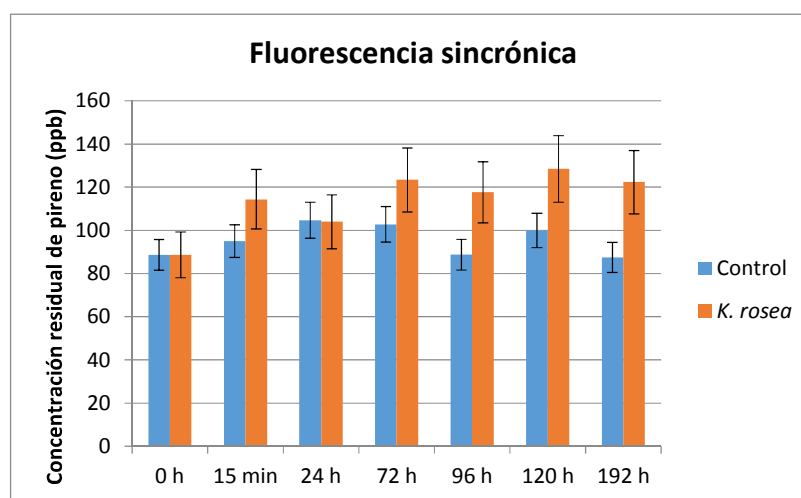
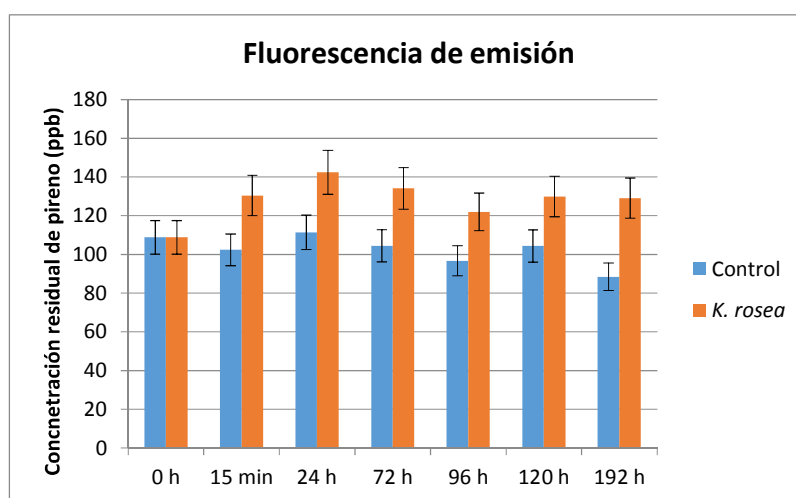
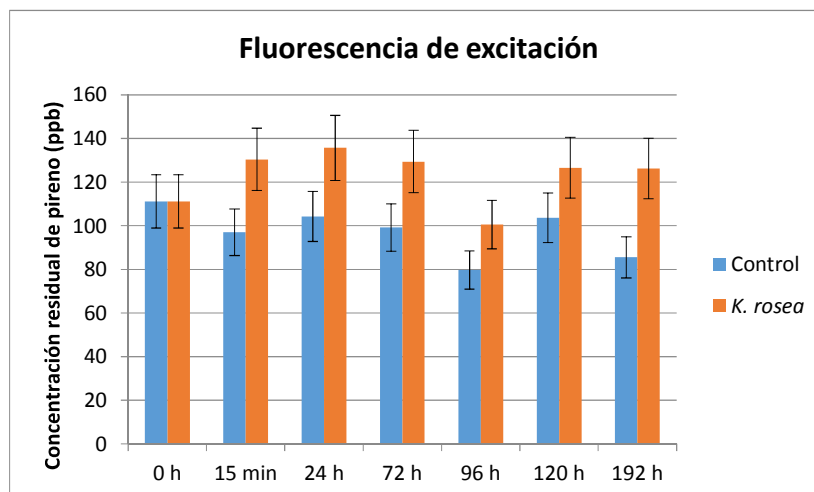


Figura 36. Concentración residual de pireno en cultivos de *Kocuria rosea* por fluorescencia de excitación, emisión y sincrónica (n = 3).

4.4.1 Conclusiones parciales

Para el caso particular de cultivos de *Kocuria rosea* se encontró que la fluorescencia de excitación es la más adecuada para la determinación de la concentración residual de fenantreno. Ninguna de las tres modalidades estudiadas, en las condiciones aquí establecidas, es satisfactoria para la determinación de la concentración residual de fluoranteno en este cultivo bacteriano. Cualquiera de las tres modalidades resulta idónea para la determinación residual de pireno en cultivos de *Kocuria rosea*.

Al parecer, existen metabolitos que se producen en el cultivo bacteriano de la *Kocuria rosea* que interfieren en la determinación de fluoranteno por las tres modalidades estudiadas en las condiciones de determinación aquí establecidas. Es necesario ampliar el intervalo de los $\Delta\lambda$ a fin de estudiar otras condiciones de la fluorescencia sincrónica que permitan cuantificar a este hidrocarburo sin la presencia de un efecto matriz.

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

En este trabajo se determinó la modalidad de fluorescencia que mejor resultado brindó en cuanto a repetibilidad (%RSD), sensibilidad, límite de detección y no influencia de la matriz en la determinación de los hidrocarburos fenantreno, fluoranteno y pireno en medios altamente salinos. Se estudiaron los cultivos bacterianos de *Kocuria rosea*, *Microbacterium testaceum* y *Kocuria palustris*, todas actinobacterias haloalcalotolerantes que tiene su crecimiento óptimo a pH 8 y 3% de NaCl para las dos primeras y 10% de NaCl para la última.

A partir de los espectros de soluciones patrones de cada hidrocarburo en medio mínimo de sales suplementado con 3% de NaCl (MSM-3%) y del propio MSM-3% sin hidrocarburo se determinó la longitud de onda de excitación óptima para cada hidrocarburo. Estas longitudes de onda fueron: 252 nm, 285 nm y 334 nm para el fenantreno, fluoranteno y pireno respectivamente. De manera similar se procedió a determinar la longitud de onda de emisión y estas resultaron ser 363 nm, 460 nm y 393 nm respectivamente. En un rastreo de $\Delta\lambda$ de 10 a 100 nm, con intervalos de 10 nm entre cada uno, se determinó que las mejores condiciones para la fluorescencia sincrónica fueron: fenantreno ($\Delta\lambda = 70$ nm, $\lambda_{\text{sinc}} = 293$ nm), fluoranteno ($\Delta\lambda = 80$ nm, $\lambda_{\text{sinc}} = 365$ nm) y pireno ($\Delta\lambda = 40$ nm, $\lambda_{\text{sinc}} = 334$ nm). Valdría la pena en un estudio futuro evaluar la posibilidad de realizar la determinación simultánea de fenantreno-pireno y fluoranteno-pireno por fluorescencia sincrónica, dada la diferencia entre las $\Delta\lambda$ requeridas para la determinación de estos hidrocarburos.

Con las condiciones anteriormente seleccionadas, se construyeron curvas de calibración para cada modalidad de fluorescencia de cada hidrocarburo en los medios MSM 3% y 10% de NaCl. Las curvas se realizaron en los rangos de concentración de (0-1000) partes por billón para fenantreno y fluoranteno y (0-100) partes por billón para pireno; con cada uno de los HPA's se demostró la linealidad en los rangos trabajados. Para el fluoranteno y pireno el orden de sensibilidades

obtenido fue excitación > emisión > sincrónico. En el caso del fenantreno este fue sincrónico > excitación > emisión. Las diferencias entre las sensibilidades para un mismo hidrocarburo en las tres modalidades fue del orden (1.03 – 1.6) veces. En todos los casos las sensibilidades en el medio MSM-3% fueron de 1.2 a 3.0 veces mayor que la del medio MSM-10%, evidenciando el efecto de la salinidad.

Se determinó el límite de detección de cada hidrocarburo en presencia de la matriz (cultivo bacteriano sin hidrocarburo) para cada modalidad de fluorescencia. Los límites de detección de fenantreno estuvieron en los rangos: excitación (27-62) ppb, emisión (27-62) ppb, sincrónicos (102-215) ppb. Los del fluoranteno fueron: excitación (69-143) ppb, emisión (104-147) ppb, sincrónicos (211-502) ppb; y los del pireno fueron: excitación (10-21) ppb emisión (10-29) ppb, sincrónicos (7-11) ppb. Estos límites de detección podrían mejorarse si se determina uno para cada tiempo muestreado y no uno solo que incluya el conjunto de matrices de todos los tiempos, y controlando el inóculo para evitar un efecto de este. El efecto del inóculo afecta directamente la señal conjunta de la matriz y por ende al límite de detección. No obstante, teniendo en cuenta que esta determinación es en medio altamente salino y no involucra la extracción del hidrocarburo en medio orgánico, los límites obtenidos son satisfactorios. El bajo límite de detección del pireno se debe a la alta sensibilidad de este hidrocarburo, ya que presenta 4 anillos aromáticos a diferencia de los otros que solo tienen 3.

Finalmente, se determinó la concentración residual de estos hidrocarburos en cultivos bacterianos de *Kocuria rosea*. Los resultados indican que no existe efecto matriz en la determinación del fenantreno y pireno, pero sí existe en la del fluoranteno. Basado en los resultados obtenidos se propone que el fenantreno se determine por fluorescencia de excitación, y en el caso del pireno puede utilizarse cualquiera de las tres modalidades. Para el fluoranteno se propone ampliar el estudio de fluorescencia sincrónica en busca de otra longitud de onda sincrónica con otro $\Delta\lambda$ que permita la determinación de este hidrocarburo sin interferencia de la matriz, o implementar una extracción por solvente en diclorometano, por

ejemplo, a fin de separar al analito de la matriz y eliminar la influencia de esta. El efecto matriz solo fue estudiado para el cultivo bacteriano de *Kocuria rosea*, pero teniendo en cuenta la similitud de estas bacterias es probable que el mismo esté presente en otros cultivos de actinobacterias.

Los resultados de la fluorescencia sincrónica sugieren que es posible realizar la determinación simultánea de pireno y fenantreno utilizando esta modalidad. Como último, para validar la determinación de estos HPA por fluorescencia, es necesario implementar el método utilizando una técnica como GC-MS y HPLC-MS y comparar los resultados obtenidos de una misma muestra por ambos métodos.

CAPÍTULO 6: REFERENCIAS

1. Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., Crouch, S. R. (2010). Fundamentos de Química Analítica. 8a edición. Cernage Learning Editores, S. A. de C. V. México, D. F.
2. Vera, L. E., Cázares, E. A., Covarrubias, R., Camacho, E. (2002). Metodología en línea para la determinación de hidrocarburos aromáticos polinucleares en agua al nivel de ultratrazas. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 18(1).
3. Meléndez Gélvez, I., Quijano Vargas, M. J., & Quijano Parra, A. (2016). Actividad mutagénica inducida por hidrocarburos aromáticos policíclicos en muestras de PM 2.5 en un sector residencial de Villa del Rosario-norte de Santander, Colombia. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 32(4), 435-444.
4. Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2003, Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y lineamientos para el muestreo en la caracterización y especificaciones para la remediación (www.respyn.uanl.mx/xiii/3/contexto/Mexico_-_NOM-138.pdf)
5. Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012, Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y lineamientos para el muestreo en la caracterización y especificaciones para la remediación (www.profepa.gob.mx/.../file/.../nom-138-semarnat.ssa1-2012.pdf)
6. Olguín, E. J., Hernández, M. E., Sánchez-Galván, G. (2007). Contaminación de manglares por hidrocarburos y estrategias de biorremediación, fitorremediación y restauración. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 23(3), 139-154.

7. Ferrera-Cerrato, R., Rojas-Avelizapa, N. G., Poggi-Varaldo, H. M., Alarcón, A., & Cañizares-Villanueva, R. O. (2006). Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. *Rev Latinoam Microbiol*, 48(2), 179-187.
8. Adams Schroeder, R. H., Domínguez Rodríguez, V. I., García Hernández, L. (1999). Potencial de la biorremediación de suelo y agua impactados por petróleo en el trópico mexicano. *Terra Latinoamericana*, 17(2).
9. Lara-Severino, R. D. C., Camacho-López, M. A., Casanova-González, E., Gómez-Oliván, L. M., Sandoval-Trujillo, Á. H., Isaac-Olivé, K., & Ramírez-Durán, N. (2016). Haloalkalitolerant Actinobacteria with capacity for anthracene degradation isolated from soils close to areas with oil activity in the State of Veracruz, Mexico. *International Microbiology*, 19(1), 15-26.
10. Lara-Severino, R. D. C., Camacho-López, M. Á., García-Macedo, J. M., Gómez-Oliván, L. M., Sandoval-Trujillo, Á. H., Isaac-Olive, K., & Ramírez-Durán, N. (2016). Determination of the Residual Anthracene Concentration in Cultures of Haloalkalitolerant Actinomycetes by Excitation Fluorescence, Emission Fluorescence, and Synchronous Fluorescence: Comparative Study. *Journal of analytical methods in chemistry*, 2016.
11. Lara-Severino, R. del C., Oliván, L. M. G., Trujillo, Á. H. S., Isaac-Olive, K., Ramírez-Durán, N. (2017). Búsqueda de capacidad productora de biosurfactantes en actinobacterias haloalcalófilas y haloalcalotolerantes. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 33(3), 529-539.
12. Al-Awadhi, H., Al-Maillem, D., Dashti, N., Khanafer, M., Radwan, S. (2012). Indigenous hydrocarbon-utilizing bacterioflora in oil-polluted habitats in Kuwait, two decades after the greatest man-made oil spill. *Archives of microbiology*, 194(8), 689-705.

13. Mahjoubi M., Jaouani A., Guesmi A., Amor SB., Jouini A., Cherif H., Najjari A., Boudabous A., Koubaa N., Cherif A. (2013) Hydrocarbonoclastic bacteria isolated from petroleum contaminated sites in Tunisia: isolation, identification and characterization of the biotechnological potential. *New biotechnology*, 30(6), 723-733.
14. Díaz Moroles, N. E., Alfaro Barbosa, J. M., Garza Ulloa, H. J. (2001). Método analítico para detectar hidrocarburos aromáticos policíclicos en agua potable. *Ciencia UANL*, 4(4).
15. de Santana, A. F., Vázquez, E. V., González, A. P., Beretta, M. (2014). Determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) en sedimentos del río São Francisco - Estado de Bahía- Brasil. *Revista Eletrônica de Gestão e Tecnologias Ambientais*, 2(1), 122-137.
16. Chirino Betancourt, Y. J., Benzo, Z., & Fernández, R. (2015). Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en Partículas Atmosféricas Sedimentadas. Un estudio comparativo en diversas áreas en la ciudad de Caracas-Venezuela. *Revista de Investigación*, 39(84).
17. Kayali, M. N., Rubio-Barroso, S., Polo-Diez, L. M. (1995). Rapid PAH determination in urban particulate air samples by HPLC with fluorometric detection and programmed excitation and emission wavelength pairs. *Journal of chromatographic science*, 33(4), 181-185.
18. Ramos-Martos, N. (1999). Determinación de principios activos en fármacos mediante el uso de técnicas fluorimétricas. Jaén: Universidad de Jaén.
19. Cai, Z. Q., Zhu, Y. X., & Zhang, Y. (2008). Simultaneous determination of dissolved anthracene and pyrene in aqueous solution by synchronous fluorimetry.

Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 69(1), 130-133.

20. Rodriguez, J. S., Sanz, C. P. (2000). Fluorescence techniques for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine environment: an overview. *Analisis*, 28(8), 710-717

21. Andrade-Eiroa, A., de-Armas, G., Estela, J. M., Cerdà, V. (2010). Critical approach to synchronous spectrofluorimetry. I. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 29(8), 885-901.

22. Hua, G., Killham, K., Singleton, I. (2006). Potential application of synchronous fluorescence spectroscopy to determine benzo [a] pyrene in soil extracts. *Environmental pollution*, 139(2), 272-278.

23. Redman, A. D., McGrath, J. A., Stubblefield, W. A., Maki, A. W., Di Toro, D. M. (2012). Quantifying the concentration of crude oil microdroplets in oil–water preparations. *Environmental toxicology and chemistry*, 31(8), 1814-1822.

24. Viñas, L., Franco, M. A., Soriano, J. A., González, J. J., Pon, J., Albaigés, J. (2010). Sources and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments from the Spanish northern continental shelf. Assessment of spatial and temporal trends. *Environmental Pollution*, 158(5), 1551-1560.

25. Mrozik, A., Piotrowska-Seget, Z., & Labuzek, S. (2003). Bacterial Degradation and Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Polish Journal of Environmental Studies*, 12(1).

26. Segura, L. M. S., Arriaga, J. A. L. (2003). Principios básicos de contaminación ambiental. UAEM.

27. Hartley, W. R., & Englande, A. J. (1992). Health Risk Assessment of the Migration of Unleaded Gasoline—A Model for Petroleum Products. *Water Science and Technology*, 25(3), 65-72.
28. Phelps, C. D., Young, L. Y. (2000). Biodegradation of BTEX under anaerobic conditions: a review. *Advances in agronomy*, 2001(70), 330-358.
29. Coates, J. D., Chakraborty, R., McInerney, M. J. (2002). Anaerobic benzene biodegradation—a new era. *Research in Microbiology*, 153(10), 621-628.
30. Naftaleno Ficha de Seguridad Quimica ICSC: 0667 IPCS, CE 2005 pág. 1-2
31. Fenantreno; Hoja Informativa sobre sustancias peligrosas; New Jersey Department of Health; Diciembre 2011 pág. 1-6
32. Fluoranteno Ficha de Seguridad Quimica Part Number G2474-85000 Última revisión Noviembre 2016 pág. 1-12
33. Fluoranteno Ficha de datos de Seguridad No. A17230 Fecha de revisión 2007 pág. 1-4
34. Pireno Ficha Internacional de Seguridad Quimica, ICSC: 1474 Última revisión IPCS: 2010 pág. 1-2.
35. Guerrero-Zúñiga, L. A., Rodríguez-Dorantes, A. M. (2009). Efecto de la presencia de fenantreno sobre la expresión de proteínas y la actividad enzimática radical de *Cyperus hermaphroditus*. *Polibotánica*, (27), 103-130.
36. Mastral, A. M., Callen, M. S. (2000). A review on polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) emissions from energy generation. *Environmental Science & Technology*, 34(15), 3051-3057.

37. Jiménez, B. E. (2001). La contaminación ambiental en México. Editorial Limusa.
38. García Cuéllar, J. A., Arreguín Sánchez, F., Hernández Vázquez, S., & Lluch Cota, D. B. (2004). Impacto ecológico de la industria petrolera en la Sonda de Campeche, México, tras tres décadas de actividad: una revisión. *Interciencia*, 29(6).
39. Cavazos-Arroyo, J., Pérez-Armendáriz, B., Mauricio-Gutiérrez, A. (2014). Afectaciones y consecuencias de los derrames de hidrocarburos en suelos agrícolas de Acatzingo, Puebla, México. *Agricultura, sociedad y desarrollo*, 11(4), 539-550.
40. Diana Acevedo Berruecos (2012). Uso de métodos Directo e Indirecto en la caracterización de un sitio contaminado por Hidrocarburos; Facultad de Ingeniería UNAM, Tesis de Licenciatura.
41. Botello, A. V. (Ed.). (2005). Golfo de México: Contaminación e impacto ambiental: diagnóstico y tendencias. Univ. J. Autónoma de Tabasco.
42. Morillas, P.P. y colaboradores (2016). Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados (1a ed. 2016). Disponible en www.eurachem.org
43. Alfaro Solís, R., Valdés González, J., Sibaja Brenes, J. P., Esquivel Hernández, G. (2013). Diseño de un método de análisis espectrofluorométrico, para la determinación de etanol en aire. *Uniciencia*, 27(1).
44. Tettey, J. (2010). Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales

incautados y especímenes biológicos. Austria: Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito.

45. Alarcón, F., Báez, M. E., Bravo, M., Richter, P., & Fuentes, E. (2012). Screening of edible oils for polycyclic aromatic hydrocarbons using microwave-assisted liquid-liquid and solid phase extraction coupled to one-to three-way fluorescence spectroscopy analysis. *Talanta*, 100, 439-446.

46. Feasibility of the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils via unfolded partial least-squares/residual bilinearization and parallel factor analysis of fluorescence excitation emission matrices

47. Alarcón Rodríguez, F. P. (2013). Desarrollo de metodologías analíticas para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en alimentos grasos mediante espectroscopia de fluorescencia y calibración multivariada. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.

48. Dissanayake, A., Galloway, T. S. (2004). Evaluation of fixed wavelength fluorescence and synchronous fluorescence spectrophotometry as a biomonitoring tool of environmental contamination. *Marine environmental research*, 58(2), 281-285.

49. Quiñones-Aguilar, E. E., Evangelista-Mar, Z., Rincón-Enríquez, G. (2016). Los actinomicetos y su aplicación biotecnológica. *Elementos* 101, 59-64.

50. Salas-Segura, D. A. (2007). Reporte de un caso de infección por *Kocuria rosea*. *Acta Médica Costarricense*, 49(3), 170-170.

51. Ahmed, R. Z., Ahmed, N., & Gadd, G. M. (2010). Isolation of two *Kocuria* species capable of growing on various polycyclic aromatic hydrocarbons. *African Journal of Biotechnology*, 9(24), 3611-3617.

52. Takeuchi, M., Hatano, K. (1998). Union of the genera *Microbacterium* Orla-Jensen and *Aureobacterium* Collins et al. in a redefined genus *Microbacterium*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 48(3), 739-747.
53. de Vasconcellos, S.P., Crespim, E., da Cruz, G.F., Senatore, D.B., Simioni, K.C.M., dos Santos Neto, E.V., Marsaioli, A.J. and de Oliveira, V.M. (2009). Isolation, biodegradation ability and molecular detection of hydrocarbon degrading bacteria in petroleum samples from a Brazilian offshore basin. *Organic Geochemistry*, 40(5), 574-588.
54. Kovács, G., Burghardt, J., Pradella, S., Schumann, P., Stackebrandt, E., & Máriaiget, K. (1999). *Kocuria palustris* sp. nov. and *Kocuria rhizophila* sp. nov., isolated from the rhizoplane of the narrow-leaved cattail (*Typha angustifolia*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49(1), 167-173.
55. Mariano, A. P., Kataoka, A. P. D. A. G., Angelis, D. D. F. D., Bonotto, D. M. (2007). Laboratory study on the bioremediation of diesel oil contaminated soil from a petrol station. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(2), 346-353.
56. Mariano, A. P., Bonotto, D. M., Angelis, D. D. F. D., Piróllo, M. P. S., Contiero, J. (2008). Biodegradability of commercial and weathered diesel oils. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(1), 133-142.
57. Oren, A. (2004). Halophilic Microorganisms: Physiology and Phylogeny. In Seckbach J (ed). *Cellular Origin and Life in Extreme Habitats and Astrobiology*, In:., Kluwer Academy Publishers, pp 413-426.
58. Kushner DJ, Kamekura M (1988) Physiology of halophilic eubacteria. In: Rodríguez Valera F (ed) *Halophilic bacteria*, CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 109-138.

59. Horikoshi, K. (1999). Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology. *Microbiology and molecular biology reviews*, 63(4), 735-750.

Anexos:

Presentaciones del trabajo en Congresos



La Asociación Mexicana de Química Analítica y la Universidad de Guanajuato otorgan la presente

CONSTANCIA

A

Gabriela Nava Solís, Laura Leticia de la Luz Barrueta, Ninfa Ramírez Durán, Miguel Ángel Camacho López, Ángel Horacio Sandoval Trujillo, Pablo Moreno Pérez, Miguel Ángel Káram Calderón, Eleni

Mitsoura, Keila Isaac Olivé

por la presentación del trabajo

"Establecimiento de las condiciones experimentales para la determinación de fluoranteno y pireno por fluorescencia de emisión en cultivos de actinobacterias inoculadas en el medio de sales mínimo suplementado con NaCl"

durante las actividades del XXX Congreso Nacional de Química Analítica que tuvo lugar del 20 al 24 de junio de 2017 en la ciudad de León, Guanajuato

"La teoría guía, el experimento decide"
"I.M. Kolthoff"

Dra. Gabriela Vargas Martínez
Junta de Representantes AMQA

Dra. María Teresa Ramírez Silva
Presidente AMQA

Dr. Carlos Hidalgo Valadez
Rector del Campus León
de la Universidad de Guanajuato

Dr. José Antonio Reyes Aguilera
Comité Local. Campus León, UG



CERTIFICATE OF ATTENDANCE

To: De la Luz Barrueta L.L., Nava Solís G., Can Ubando L.C., Camacho
López M.A., Sandoval Trujillo A.H., Isaac Olivé K., Ramírez Durán N.

For the Poster presentation with title:

*Determination of the tolerance of haloalkalitolerant actinomycetes *Kocuria rosea*,
Microbacterium testaceum and *Kocuria palustris* to phenanthrene, fluoranthene and pyrene
aromatic polycyclic hydrocarbons by fluorescence of excitation and emission*

at the **International Symposium**

**“Extreme Ecosystems and Extremophile organisms: Biodiversity, Physiology,
Biochemistry & Biotechnology”**

September 18-20, 2017.

Prof. Ramón A. Batista García, PhD
Organizing Committee
