

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del problema:

El arsénico (As) es un elemento químico que está en la naturaleza en distintas formas; muy pocas veces se lo encuentra en forma sólida y se lo puede hallar en plantas y animales en su forma orgánica que es la menos tóxica. La mayoría de las veces el arsénico se combina con el oxígeno, cloro y azufre para formar compuestos inorgánicos de arsénico que son mucho más tóxicos. Cuando nos enfocamos principalmente en las aguas destinadas para el consumo humano, el arsénico generalmente proviene de pozos profundos donde existe piritita o arsenopiritita (combinación de hierro, azufre y arsénico), aunque muchas veces también proviene de fuentes de agua geotermal como sucede en la laguna de Papallacta, Ecuador. En el mundo actualmente existen muchas poblaciones que consumen agua contaminada con arsénico que proviene de acuíferos que generalmente se encuentran en su camino con piritita o arsenopiritita como se indica en la figura 1.1.

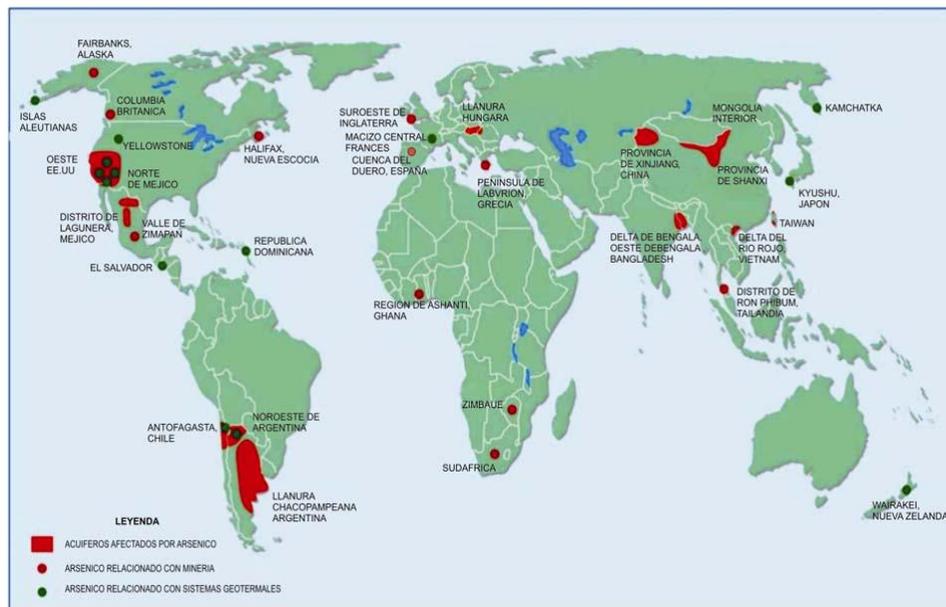


Figura 1.1: Distribución mundial del Arsénico en Acuíferos (Lillo, 2003).

En Ecuador se han realizado estudios a lo largo de varios ríos y acuíferos que muestran la presencia de arsénico en sus aguas. Cumbal, Aguirre, Murgueitio, Tipán, Chavez, y Poma, 2006; dentro del proyecto Origen del Arsénico en las Aguas y Sedimentos de la Laguna de Papallacta, Estudio Preliminar indican que en la laguna de Papallacta se encuentran concentraciones de Arsénico entre 390 y 10560 $\mu\text{g/L}$. En los ríos que desembocan en la laguna de Papallacta, como por ejemplo, el río Sucus, se encuentran concentraciones de hasta 25 $\mu\text{g/L}$ mientras que en el río Tambo se encontraron concentraciones de hasta 149 $\mu\text{g/L}$ en la cuenca baja y, en la cuenca alta, concentraciones de hasta 698 $\mu\text{g/L}$. Se han propuesto varias técnicas para reducir el arsénico del agua tanto de origen natural como antropogénico, no obstante, la inmensa mayoría suponen un alto coste a la vez que un complicado uso y mantenimiento como por ejemplo coagulación/filtración, que necesita de algunos pasos antes de lograr remover la totalidad del arsénico (V) presente en el agua; el tipo, la dosis del coagulante y el pH influyen en la eficiencia del proceso; los precios de las resinas de intercambio iónico son muy elevados en Ecuador dado que los precios de importación son altos. Una solución al problema es crear biofiltros con materiales baratos y que se puedan conseguir dentro del país fácilmente y mejor aún si son materiales de desecho de algún proceso. Las cianobacterias son una opción ya que son fáciles de cultivar porque no necesitan de gran cuidado sino solamente de un fotoperiodo que puede ser la luz diaria y la noche además de cantidades pequeñas de nutrientes.

La norma de la Organización Mundial de la Salud permite una concentración máxima de Arsénico en aguas destinadas para el consumo humano de 10 $\mu\text{g/L}$, lo cual confirma que existe un grave problema en el agua que se toma de la laguna de Papallacta para la potabilización y posterior distribución en la ciudad de Quito, lo mismo ocurre en distintos sitios del mundo donde las únicas fuentes de agua se encuentran contaminadas con este metaloide como se muestra en la figura 1.1.

1.2 Justificación del problema

El arsénico (As) es un metaloide muy común en rocas y suelos, en la hidrósfera y la biósfera. Es transportado al medio ambiente a través de distintos procesos naturales como meteorización, actividad biológica, emisiones volcánicas, así como procesos antropogénicos, actividad minera, uso de combustibles fósiles, uso de pesticidas, herbicidas, desecantes, conservadores de la madera y uso como aditivos de piensos por lo que en muchas ocasiones es inevitable interactuar con él (Lillo, 2003).

El arsénico es un elemento extremadamente tóxico para el organismo humano. La exposición a concentraciones altas causa efectos agudos que pueden llegar a ser letales, por otro lado, la exposición durante un largo período a bajas concentraciones relativas de arsénico (por ejemplo, por ingestión de agua) tiene efectos negativos crónicos para la salud, tal como ocurre con el problema del agua en las poblaciones de Tumbaco y Guayllabamba, las cuales toman agua para su consumo a partir de un acuífero contaminado con arsénico. La cantidad de arsénico encontrada en la laguna Papallacta supera largamente lo permitido por las normas internacionales para fuentes de agua de uso doméstico. En Ecuador existe una norma sobre la calidad de agua de bebida adoptada en el año de 1992, en la que la concentración permisible de arsénico es de 0.05 mg/L (BVSA, 2004), pero actualmente la norma se encuentra en 0.01 mg/L según el Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN, 2009).

La utilización de agentes químicos (óxidos de hierro, sulfato de aluminio) para la remoción de arsénico de origen natural o antropogénico puede llegar a contaminar en mayor proporción existiendo problemas de lixiviación en sitios donde son utilizados y causar una desestabilización en el ecosistema circundante.

El arsénico, dependiendo de la forma en la que se encuentre, puede tardar varios años en degradarse y su presencia en el agua se da en forma de arsénico pentavalente [As (V)] y, arsénico trivalente [As (III)] principalmente. Al tener un elevado punto de ebullición (sobre los 600 °C) es imposible que se pueda evaporar del agua y al momento en que existan elevadas temperaturas, lo que puede suceder es que el agua se evapore y el arsénico se concentre más. La única forma de eliminarlo es mediante adsorción con ciertos materiales producidos químicamente y que demandan costos elevados y mucho tiempo al momento de elaborarlos.

El contar con biosorbentes para arsénico como lo son algunas cianobacterias abarataría costos de remediación y en caso de que se contase con nuevas cepas que tengan una capacidad de adsorción mucho más elevada al que se han conocido en estudios anteriores, será un aporte científico para solucionar problemas ambientales. El crecimiento de cianobacterias en reactores no demanda de mucha inversión dado que se pueden usar recipientes de gran tamaño para el crecimiento masivo de cianobacterias y, además, las cantidades de reactivos utilizadas para la elaboración de medio de cultivo son mínimas. La energía necesaria para la producción de cianobacterias es pequeñísima y equivalente a la de 5 aireadores para pecera que son utilizados para airear un reactor de 50 L, la energía lumínica puede ser aprovechada a partir del sol con un fotoperiodo luz/oscuridad de 12/12.

Las cianobacterias que no producen toxinas, afectan en forma mínima a un ecosistema en el cual sean aplicadas, además ayudan en la oxigenación de aguas y a lo largo de donde fluyen aguas con estas cianobacterias la fijación del nitrógeno en el suelo será mucho mayor permitiendo en ciertos casos el crecimiento rápido de las plantas (Fay, 1992).

Al probar las cianobacterias seleccionadas para este estudio, con el fin de disminuir el arsénico de aguas contaminadas, es importante tomar en cuenta que el proceso puede ser parcial. Si se lograra remover completamente el arsénico o en una alta proporción, se podría continuar con una línea. Caso contrario, se podrían probar otras cianobacterias con el mismo fin tomando en cuenta que en países como Japón se han obtenido resultados positivos en la remoción del arsénico con cianobacterias (Riffat, Mahmum, Sen, 2007). Se podría crear un biofiltro con cianobacterias ya tratadas para remoción de arsénico e inmovilizadas en alginato de calcio para así poder contar con una columna que pueda regenerarse con ácidos y/o bases de acuerdo a la forma de arsénico que se esté removiendo.

Con esta investigación se pretende dar el primer paso para el uso de cianobacterias en el campo de la microbiología ambiental en los laboratorios de Biotecnología y Microbiología de la Escuela Politécnica del Ejército.

Esta técnica desarrollada a nivel de laboratorio con cianobacterias, podría ser escalada a una planta piloto, para posteriormente poder ser utilizada en las plantas potabilizadoras de agua que tengan problemas de contaminación de agua con arsénico como es el caso particular de la población de Tumbaco.

Muchos de los ecosistemas son frágiles porque existen especies en peligro de extinción. Cuando existe contaminación por arsénico, el consumo del agua se vuelve muy tóxica para las especies, para evitar la intoxicación de especies en peligro de extinción se podría disminuir el arsénico presente en el agua que beben hasta menos de 10 $\mu\text{g/L}$, con cianobacterias debidamente estudiadas.

Según Devercelli y García, 2001, se debe considerar tóxicas a todas las cianobacterias inicialmente aisladas de algún ecosistema, hasta que no se demuestre lo contrario, dado que un 50% de las cianobacterias identificadas hasta la actualidad tienen toxinas que pueden causar daños a seres vivos (Roset , Aguayo, Muñoz, 2001), de allí la importancia de realizar pruebas de toxicidad con distintos organismos hasta llegar a pruebas con humanos, ya que, algunas toxinas pueden causar daños en algunos organismos mientras que en otros no.

Las pruebas de toxicidad universal realizadas con *Daphnia pulex* ayudarán a conocer si el agua que fue tratada con las cianobacterias contiene toxinas posiblemente producidas por las mismas cianobacterias.

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo General

Evaluar la capacidad de un consorcio y de una cepa axénica de cianobacterias aisladas de las hojas de *Polylepis pautia* en los bosques nativos de Papallacta, Ecuador, para remover arsénico de un medio acuoso a nivel de laboratorio.

1.3.2 Objetivos Específicos

1.3.2.1 Manejar cianobacterias a partir de cultivos axénicos y en consorcios suspendidos en medio acuoso a nivel de laboratorio para la remoción de arsénico.

1.3.2.2 Producir biomasa suficiente tanto del consorcio como de la cepa axénica de cianobacterias para los ensayos de remoción de arsénico a nivel de laboratorio.

- 1.3.2.3 Evaluar la remoción de arsénico de un medio acuoso mediada por cianobacterias tratadas con Calor.
- 1.3.2.4 Evaluar la remoción de arsénico de un medio acuoso mediada por una cepa axénica y un consorcio de cianobacterias sometidas a autoclave.
- 1.3.2.5 Medir la cantidad de arsénico removido de un medio acuoso mediado por una cepa axénica y un consorcio de cianobacterias vivas.
- 1.3.2.6 Evaluar la posible presencia de toxinas en el agua tratada con las cianobacterias a nivel de laboratorio mediante bioanálisis con *Daphnia pulex*.

1.4 Marco Teórico

1.4.1 Características generales de las cianobacterias

Los procariotes oxigénicos fotosintéticos comprenden una rama filogenética simple dentro de las bacterias (Eubacterias). Según las bases del análisis de la secuencia más reciente del rDNA 16S, esta rama o grupo está más cercanamente relacionado con las bacterias Gram-positivas, particularmente en el grupo que tiene bajas cantidades de C+G, el cual incluye a: *Clostridium innocuum* y *Bacillus subtilis* (Boune, and Castenholz, 2001).

En el año de 1989, se pensaba que el orden *Prochlorales*, incluido en el phylum "*Prochlorophyta*" (la bacteria oxigénica fotosintética carecía de ficobilisomas y poseía clorofila b además de clorofila a) constituía una rama evolucionaría distinta de otras cianobacterias. Esta hipótesis ahora se sabe que fue incorrecta, y ha sido negada. Los tres géneros descritos que formaban parte de las procariotas oxigénicas que contenía clorofila a y b (*Prochloron*, *Prochlorothrix*, y *Prochlorococcus*) cayeron dentro de tres ramas polifiléticas del árbol cianobacterial de acuerdo al análisis de la secuencia de rDNA 16S, y están, por consiguiente, más cercanamente relacionadas con un número de

cianobacterias típicas que con otras. Todo esto es corroborado por la identificación de genes funcionales para las subunidades a y b de un tipo de ficoeritrina en una cepa de *Prochlorococcus* y la aparición de una pequeña cantidad de un pigmento PE-like en algunas poblaciones de agua profunda de este género (Boune and Castenholz, 2001).

La pared celular en las cianobacterias es de tipo Gram-negativo, pero la capa estructural de peptidoglicano es a menudo considerablemente gruesa que en las proteobacterias Gram-negativas. Esta capa tiene usualmente 1-10 nm de grosor, pero llega a 200 nm en el caso de *Oscillatoria princeps*. Las paredes gruesas, como son encontradas en las especies, son a menudo perforadas parcialmente por numerosos huecos o poros incompletos extendiéndose desde el interior de la célula y llevando la membrana del citoplasma hacia afuera para contactar los lipopolisacáridos (LPS) afuera de la membrana. Poros de pequeño tamaño (5-13 nm) están presentes regularmente o dispersos en las paredes de las cianobacterias, pero la colocación varía grandemente. Muchas cianobacterias unicelulares, coloniales y filamentosas poseen una “envoltura” afuera de la membrana exterior. Esta es llamada vaina, glycocalix o cápsula, o dependiendo de la consistencia puede parecer un gel, mucílago o baba. Las vainas de las cianobacterias están a menudo compuestas de polisacáridos, pero en algunas cepas más del 20% del peso puede ser polipéptidos. En las vainas estables de algunas cianobacterias filamentosas y coloniales, los pigmentos azul, rojo o amarillo pueden acumularse y opacar el color de las células (Boune and Castenholz, 2001).

La mayoría de cianobacterias unicelulares o coloniales y algunas formas filamentosas sufren fisión binaria mediante un tipo de división constrictiva en la cual todas las capas superficiales (a menudo incluye la vaina) crecen hacia el interior hasta que la separación de la célula sea completa o casi completa. En

otras, particularmente los tipos “oscilatorias”, las cuales al carecer de severas constricciones en las paredes-cruzadas, la membrana exterior (y la vaina si está presente), es continua y no se involucra en la división. En lugar de aquello, la membrana citoplasmática se invagina y una capa de peptidoglicano es sintetizada entre las dos membranas (Boune and Castenholz, 2001).

De la fisión binaria en las cianobacterias tiene como resultado poblaciones unicelulares cuando la separación constrictiva es completa y cuando las vainas no sujetan a las células hijas. Cuando la regulación de la fisión alterna el plano de la división en dos o en tres planos, y cuando una vaina o gel retiene a las células juntas, resultan colonias ordenadas o desordenadas de muchas células. Cuando la fisión se da a cabo en un solo plano y la separación es incompleta, se forman cadenas largas o cortas de células (tricomas). En los tricomas envainados (tricoma+vaina=filamento), la debilidad local en la vaina puede permitir el hinchamiento hacia afuera de un tricoma similar a un lazo el cual eventualmente se rompe, o también el estallo de un tricoma simple roto a partir de una vaina (Boune and Castenholz, 2001).

Aunque no todos los tilacoides en las cianobacterias parecen ser invaginaciones de la membrana citoplasmática, hay “puntos accesorios” o “centros tilacoides” ordenados, asociados con la periferia del citoplasma o la membrana citoplasmática.

En el citoplasma de la cianobacteria hay muchos otros componentes e inclusiones, la mayoría de las cuales pueden ser visualizadas rápidamente usando varias técnicas preparativas de microscopía de transmisión de electrones. Estos componentes incluyen: Glicógeno, Gránulos de cianoficina, Carboxisomas Polifosfato, Vacuolas de gas y la región del nucleóide.

La creciente eutrofización de los ambientes acuáticos favorece el crecimiento masivo (blooms) de algas, y poblaciones de cianobacterias, capaces de producir potentes toxinas con graves repercusiones en la salud pública y en la sanidad animal (Roset , Aguayo, Muñoz, 2001).

Más del 50% de las proliferaciones masivas de cianobacterias son tóxicas. Dentro de una misma especie de cianobacteria, existen cepas que producen toxinas y otras que no las producen. Se hace necesario disponer de métodos que permitan detectar y cuantificar cianobacterias y sus toxinas. Los tradicionales bioensayos en ratón para conocer la toxicidad de una muestra sospechosa, se van sustituyendo por otros bioensayos y diversos métodos *in vitro* que están demostrando ser eficaces. El avance experimentado en las técnicas inmunológicas y enzimáticas ha facilitado la detección rápida de toxinas mediante el empleo de kits comerciales y no comerciales (Roset *et al*, 2001).

Uno de los campos más prometedores de investigación, consiste en la determinación de las secuencias genéticas que diferencian géneros incluso cepas tóxicas, así como otras que codifican para la síntesis de toxinas; métodos que permitirán prever el desarrollo de cianobacterias o sus toxinas. El control y seguimiento de los desarrollos masivos de cianobacterias, es muy importante para garantizar la calidad del agua. El reconocimiento de los factores ambientales que influyen o desencadenan la aparición de blooms, es otro factor fundamental para la prevención y el control (Roset *et al*, 2001).

Las neurotoxinas pueden actuar en cuestión de horas, pero no se ha probado que existan efectos a largo plazo, al contrario con las hepatotoxinas que pueden causar daños hepáticos a largo plazo.

La OMS (Organización Mundial de la Salud) recientemente ha realizado evaluaciones con respecto al impacto de las microcistinas sobre la salud humana. Se ha concluido en que no hay suficiente información para realizar normas que establezcan límites aceptables para microcistinas que no sean Microcystin-LR. El límite establecido por la OMS para agua potable es de 1µg/l de Microcystin-LR (Braga, 2002). Este valor es provisional, debido a la poca información disponible. Algunas de las toxinas y sus dosis letales en ratones son presentadas en el cuadro 1.1.

Cuadro 1.1: Comparación de toxicidad de toxinas biológicas producidas por cianobacterias, dosis letal oral en ratón (Brena, 2005).

Toxina (µg/Kg)	Organismo Productor	DL50
Anatoxina-a(s)	Cianobacteria	20-40
Nodularina	Cianobacteria	30-50
Microcystina-LR	Cianobacteria	50
Homoanatoxina-a	Cianobacteria	2000
Saxitoxina	Cianobacteria	260
Cilindroespermopsina	Cianobacteria	4400-6900

1.4.2 Características generales del arsénico, forma de ocurrencia en el agua

El arsénico se halla en las aguas naturales como especie disuelta, la cual se presenta por lo común como oxianiones con arsénico en dos estados de

oxidación, arsénico trivalente [As(III)] y arsénico pentavalente [As(V)], y con menos frecuencia como As(0), As(-I) y As(-II). El As(V) aparece como H_3AsO_4 y sus correspondientes productos de disociación (H_2AsO_4^- , HAsO_4^{2-} y AsO_4^{3-}). El As(III) aparece como H_3AsO_3 y sus correspondientes productos de disociación (H_2AsO_3^+ , H_2AsO_3^- , HAsO_3^{2-} y AsO_3^{3-}). Aunque tanto el As(V) como el As(III) son móviles en el medio, es precisamente el As(III) el estado más lábil y biotóxico (Lillo, 2003).

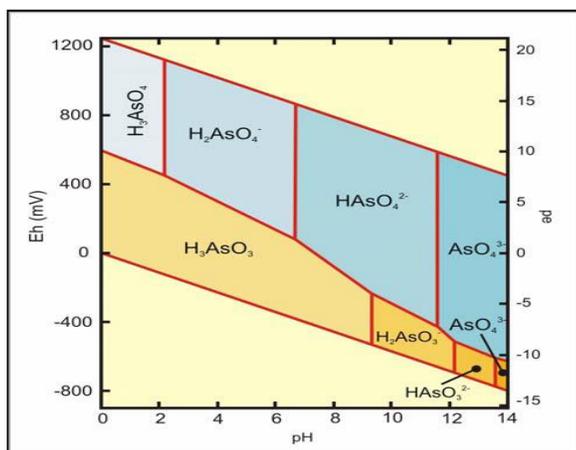


Figura 1.2: Diagrama Eh-pH de especies acuosas de arsénico en el sistema $\text{As}-\text{O}-\text{H}_2\text{O}$ a 25°C y 1 bar de presión total (Lillo, 2003).

El estado de oxidación del arsénico, y por tanto su movilidad, están controlados fundamentalmente por las condiciones redox (potencial redox, Eh) y el pH (figura 1.2). El arsénico es un elemento singular entre los metaloides pesados y elementos formadores de oxianiones por su sensibilidad a movilizarse en los valores de pH típicos de las aguas subterráneas (pH 6,5-8,5). Como aproximación, y sin tener en cuenta otros factores como contenido en materia orgánica, en condiciones oxidantes, el estado As(V) predomina sobre As(III). El arsénico se

encuentra fundamentalmente como H_2AsO_4^- a valores de pH bajos (inferiores a 6,9), mientras que a pH más alto, la especie dominante es HAsO_4^{2-} . En condiciones de extrema acidez, la especie dominante será H_3AsO_4^0 , mientras que en condiciones de extrema basicidad, la especie dominante será AsO_4^{3-} , como se observa en las figuras 1.3 y 1.4. En condiciones reductoras a pH inferior a 9.2, predominará la especie neutra (Lillo, 2003).

Otros factores, como la concentración de determinados elementos, también controlan la especiación de arsénico y por tanto su movilidad. Por ejemplo, en presencia de concentraciones altas de azufre, predominan las especies acuosas de azufre y arsénico. Si en ese caso se establecen condiciones reductoras y ácidas, precipitarán sulfuros de arsénico oropimente, As_2S_3 , y realgar, AsS (Lillo, 2003).

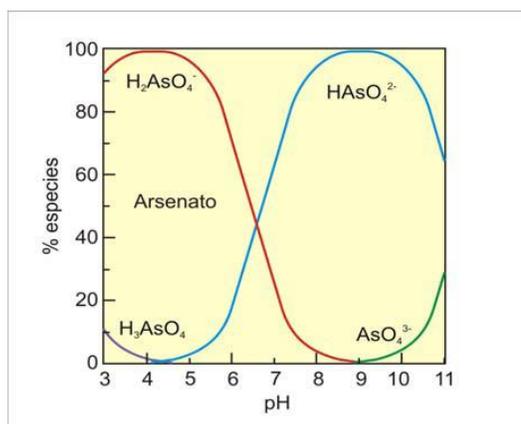


Figura 1.3: Especies de Arsénico V como función del pH (Lillo, 2003).

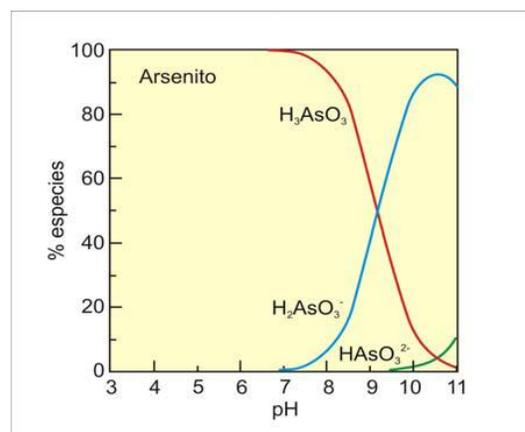


Figura 1.4: Especies de Arsénico III como función del pH (Lillo, 2003).

Las formas orgánicas de arsénico suelen aparecer en concentraciones menores que las especies inorgánicas, aunque pueden incrementar su proporción

como resultado de reacciones de metilación catalizadas por actividad microbiana (bacterias, algas). Las formas orgánicas dominantes son el ácido dimetilarsínico {DMAA, $(\text{CH}_3)_2\text{AsO}(\text{OH})$ } y el ácido monometilarsónico {MMAA, $\text{CH}_3\text{AsO}(\text{OH})_2$ }, donde el arsénico está presente en ambos casos como As(V) (Torralba, 1996), en la figura 1.5 se pueden observar algunas especies de arsénico que se encuentran en bacterias y algas.

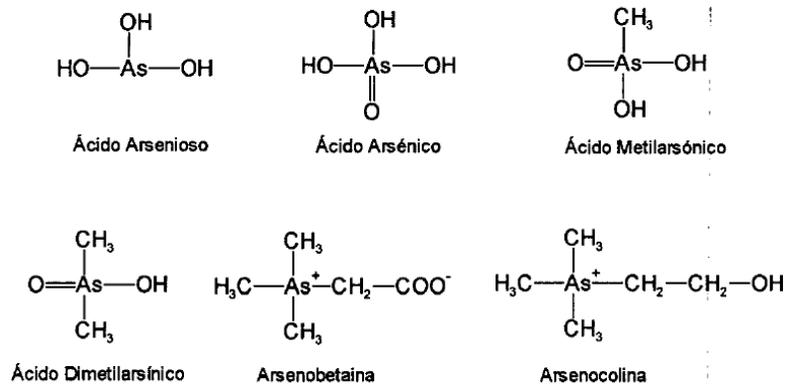


Figura 1.5: Estructura de los compuestos de arsénico identificados en muestras medioambientales (Torralba, 1996).

1.4.3 Problemática del arsénico como contaminante del agua

El arsénico se encuentra naturalmente en el suelo y en algunos minerales, como la pirita o arsenopirita. Puede incorporarse al aire, al agua y a los suelos de otras áreas, como polvo que levanta el viento o como efluente de lluvia o filtraciones de agua a través del suelo (Junta de Castilla y León, 2005).

Se han citado contenidos altos de arsénico en aguas naturales en diversos ambientes, aunque se encuentran las mayores concentraciones en las aguas subterráneas. Las concentraciones altas en los acuíferos no se restringen a

determinadas condiciones o ámbitos, apareciendo en acuíferos en condiciones oxidantes y de pH alto, acuíferos en condiciones reductoras, acuíferos con circulación geotermal, acuíferos afectados por procesos ligados a la actividad minera o relacionados con depósitos minerales, y acuíferos ligados a otros procesos antropogénicos (actividad industrial, asentamientos urbanos, actividad agropecuaria y otros). Sin embargo, la mayor parte de los acuíferos con contenidos altos de arsénico tienen un origen ligado a procesos geoquímicos naturales (Lillo, 2003).

1.4.3.1 Presencia de arsénico en países de Sudamérica

En América del Sur, la presencia de volcanes y de una topografía en la cual abundan acuíferos permite que muchas de las fuentes de agua que son destinadas para el consumo humano se encuentren contaminadas con Arsénico, un ejemplo claro es el de Argentina. El origen del arsénico en las aguas de Argentina es atribuido principalmente a la actividad volcánica ocurrida en los Andes. Según Curto, Mendiburo, Plastina, Boffi, 2002, las concentraciones de arsénico en ciertos ríos de Argentina son sumamente elevadas como por ejemplo: los ríos Rosario, Pastos Chicos, Chorrillos (3.5 mg/L) y San Antonio (0.7 mg/L) cercanos a San Antonio de los Cobres, Salta; en el río Jáchal, San Juan (0.10 a 0.15 mg/L) y el San Antonio (0.15 a 0.8 mg/L), es importante tomar en cuenta que la concentración más elevada es la de 3500 µg/L en los ríos Rosario, Pastos Chicos y Chorrillos, lo cual indica que seguramente existe un aporte elevado de arsénico a partir de arsenopirita o pirita.

En Ecuador no existen estudios en varios lugares donde se presume que existe presencia de arsénico en sus aguas, el estudio más importante fue el realizado en los ríos que fluyen a la laguna de Papallacta y en la misma laguna, mostrando concentraciones sumamente elevadas de arsénico. Cerca de la laguna cruza el oleoducto de crudos pesados que pertenecen a la reserva Cayambe-

Coca, un derrame de crudo causo una elevada contaminación de la laguna cubriéndola casi en su totalidad y permitiendo que metales pesados y metaloides contaminen toda el agua presente allí, presumiblemente, gran parte del arsénico que se encuentra en la laguna de Papallacta fue insertado allí por dicho derrame (Cumbal *et al*, 2006).

En la laguna de Papallacta (figura 1.6), se encuentran concentraciones de Arsénico entre 390 y 10560 $\mu\text{g/L}$; el río Tambo, principal influente de la laguna de Papallacta cuenta con concentraciones de Arsénico desde su cuenca alta hasta su cuenca baja de entre 149 y 698 $\mu\text{g/L}$, estas elevadas concentraciones de arsénico en el río se asume que son a causa de fuentes de agua geotermal que fluyen hacia él, también existen estudios en los cuales las concentraciones de arsénico en dichas fuentes de agua geotermal sobrepasan los límites permitidos que son de 10 $\mu\text{g/L}$, las concentraciones en estas aguas van desde 1090 hasta 7852 $\mu\text{g/L}$. (Cumbal *et al*, 2006).

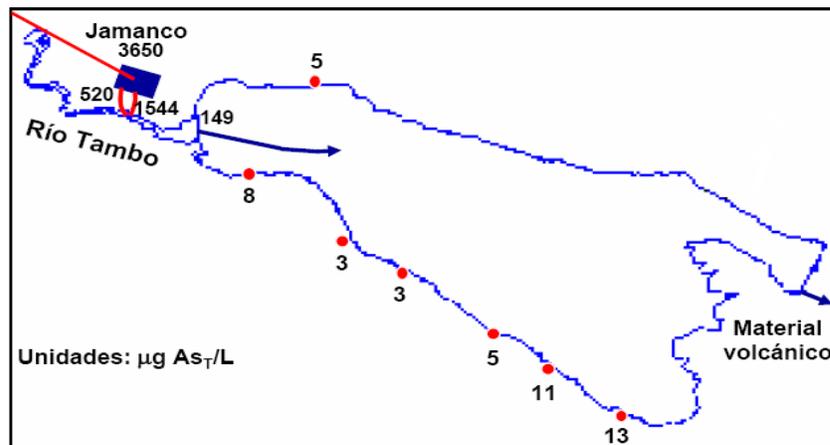


Figura 1.6: Arsénico en vertientes de la Laguna de Papallacta, distintos puntos de muestreo (Cumbal, *et al* . 2006).

El origen del Arsénico en las aguas subterráneas del Ecuador es atribuido a la actividad volcánica ocurrida en los Andes. Esa actividad fue muy intensa en el Altiplano y a ella se deberían las altas concentraciones de Arsénico que poseen los ríos cercanos. Como consecuencia de ese vulcanismo, se habrían acumulado grandes depósitos de vidrios volcánicos que contienen Arsénico. La solubilidad del Arsénico depende de la alcalinidad del agua, especialmente aquellas ricas en bicarbonato de sodio. En cambio es escaso o no se encuentra en aguas ricas en sales de calcio o magnesio aunque sean bicarbonatadas o sulfatadas. Las aguas subterráneas que contienen mayor concentraciones de arsénico son las muy alcalinas (Puga *et al*, 1973).

Tomando en cuenta que las concentraciones de arsénico en las fuentes de agua termal son extremadamente elevadas, al entrar en contacto con el río Tambo existe una gran dilución del arsénico presente, pero aun así no se logran concentraciones lo suficientemente bajas como para permitir la utilización de esta agua para el consumo humano.

1.4.3.2 Distribución del arsénico en el mundo y su capacidad de contaminación

La presencia de Arsénico en ríos generalmente es bastante baja, alrededor de 0,8 µg/L según Lillo 2003. La concentración máxima de arsénico permitida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en las aguas destinadas para el consumo humano es de 10 µg/L, considerándose así dichas concentraciones encontradas en la mayoría de los ríos por debajo del límite permitido. Los valores de arsénico pueden variar (figura 1.7) de acuerdo a la carga de agua que exista en dichos ríos, es decir, si se encuentran en una época lluviosa, las concentraciones serán mucho más bajas por el exceso de agua que permitirá una dilución del arsénico, mientras que en épocas secas existirá pérdida de agua por evaporación y así se concentra mucho más el arsénico.

Las concentraciones de arsénico elevadas en ciertos ríos se deben a la influencia de fuentes geotermales, litología de la cuenca, drenaje de zonas mineralizadas, actividad minera, clima y vertidos urbanos o industriales que generalmente aportan con elevadas concentraciones del metaloide pesado.

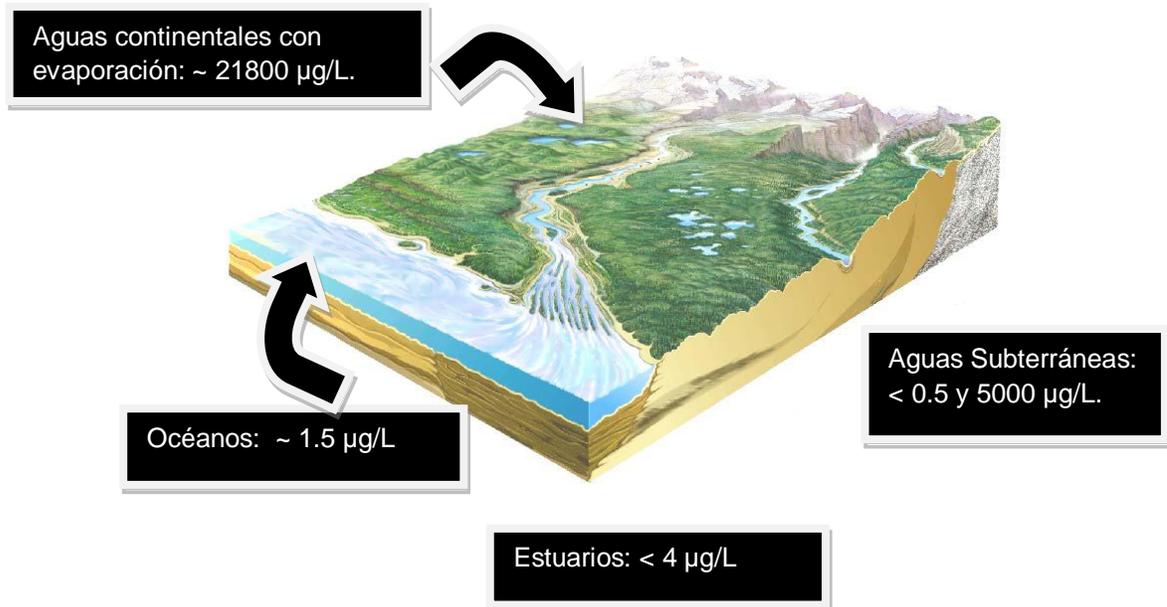


Figura 1.7: Distribución del Arsénico en las Aguas del mundo (Lillo 2003).

El arsénico en aguas lacustres fluctúa con valores muy similares a los valores de concentración presentes en los ríos, tomando en cuenta que se encuentran afectados por factores similares, es decir por lluvias o por distintas descargas que pueden favorecer a una mayor o menos concentración de arsénico. La principal diferencia entre lagos y ríos es que en los lagos el agua se encuentra estancada en dicho lugar impidiendo que el arsénico pueda migrar a otros lugares y así aumentando cada vez más sus concentraciones por descargas o por evaporación del agua presente en el mismo; además que si existe presencia de ciertos minerales o rocas con arsénico pueden permitir la desorción del metaloide

al agua por la circulación restringida de agua que existe en los lagos como ya se mencionó anteriormente.

Los estuarios son la parte más ancha y profunda de las desembocaduras de los ríos en los mares en aquellos sitios donde las mareas tienen mayor amplitud y oscilación. Las concentraciones de arsénico en dichos lugares pueden ser muy variables dado que pueden existir aportes tanto del río como de los océanos en los que desembocan. Según Lillo, 2003; las concentraciones de arsénico en los estuarios se encuentran en un promedio de 1.5 µg/L.

Las aguas continentales subterráneas en muchos de los países es utilizada para el consumo humano, en literatura existen datos que demuestran que los valores para aguas en condiciones naturales se encuentran en un rango entre 0.5 y 5000 µg/L. Las concentraciones que son altas no se restringen a determinadas condiciones o ámbitos, apareciendo en acuíferos en condiciones oxidantes y de pH elevado, acuíferos en condiciones reductoras, acuíferos con circulación geotermal, acuíferos afectados por procesos ligados a la actividad minera o relacionados con depósitos minerales, y acuíferos ligados a otros procesos antropogénicos.

Los problemas más importantes de contaminación por arsénico citados por Curto, Mendiburo, Plastina, Boffi, 2002 se sitúan en Argentina, Bangladesh, Nepal, Chile, China, Hungría, India, México, Rumanía, Taiwan, Vietnam y Estados Unidos. No existe un modelo hidrogeológico que relacione las concentraciones de arsénico en las aguas subterráneas con la presencia de arsénico en los materiales que constituyen el acuífero, es decir que se pueden encontrar aguas con arsénico en distintas situaciones, tanto en condiciones reductoras como en condiciones oxidantes, o en acuíferos sobreexplotados, tanto en zonas áridas como en zonas

húmedas o tanto en acuíferos superficiales libres como en acuíferos profundos confinados.

Las aguas subterráneas contaminadas con arsénico generalmente provienen de acuíferos que tienen minerales como la arsenopirita ($\text{FeS}_2 \cdot \text{FeAs}_2$), el rejalgar (AsS) y oropimente (As_2S_3) entre otros, estos últimos cuentan con solubilidades apreciables en solución acuosa que dependen del pH, del ambiente iónico y de las condiciones existentes en el suelo y subsuelo como acidez, temperatura, ambientes oxidantes y/o reductores. La transformación de los minerales arsenopiríticos se debe, principalmente, a las condiciones oxidantes del medio ambiente que les rodea, en respuesta natural a los cambios ambientales originados por la explotación de los minerales, así como al sistema de bombeo en la extracción del agua subterránea y a la presencia de aire y agua con oxígeno disuelto que penetra al subsuelo. El equilibrio mostrado en la figura 1.8, es un ejemplo de la oxidación de estos minerales que hace, también, que se incremente la concentración de As(V) en sus diferentes especies en el agua, además de incrementarse las concentraciones de los iones SO_4^{2-} , Fe^{2+} y H_3O^+ . En consecuencia, también habrá una disminución del pH en el agua.

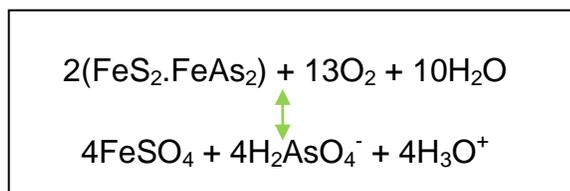


Figura 1.8: Equilibrio Químico y Oxidación de la Arsenopirita en aguas subterráneas.

El arsénico que se encuentra en las aguas subterráneas, esta principalmente como As(V), en las formas de H_2AsO_4^- y HAsO_4^{2-} cuyas especies son menos tóxicas que las que corresponden al As(III).

1.4.4 Límites de concentración de arsénico en aguas de bebida establecido en las normas de diversos países

El arsénico en las aguas superficiales (ríos, lagos, embalses) y subterráneas (acuíferos) susceptibles de ser utilizadas para consumo, constituye una gran amenaza para la salud. Organismos como la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Unión Europea (Directiva 98/83) o la Agencia de Protección Ambiental estadounidense (USEPA) han establecido la reducción del límite del contenido de arsénico en agua de consumo de 50 a 10 µg/L (Lillo, 2003). A continuación se presentan las normas para concentración de arsénico a nivel mundial en agua de bebida:

Norma de la U. S. Public Health Service . 0,05 mg/L

Norma internacional de la Organización Mundial de la Salud (año 1958)
0,20 mg/L

Norma Inglesa 0,20 mg/L

Norma Argentina 0,12 mg/L

Norma Chilena 0,05 mg/L

Norma Ecuatoriana 0,01 mg/L (INEN, 2009)

Diversos autores han determinado el Arsénico en la orina de individuos expuestos y no expuestos al riesgo de contaminación. Varios de ellos están de acuerdo en que cifras superiores a 0,1 mg/L de orina y 0,1 mg. por 100 g de pelo son peligrosas (Puga *et al*,1973).

Según la OMS (Organización Mundial de la Salud) recomiendan como máximo una concentración de arsénico en el agua de bebida de 0,01 mg/L.

1.4.5 Remoción de arsénico

El uso de la adsorción selectiva, utilizando materiales biológicos, óxidos minerales, carbón activado o resinas poliméricas tiene un crecimiento acelerado. La utilización de carbón se la hace desde hace mucho tiempo atrás en la historia. El carboncillo era utilizado para la filtración de agua de bebida por los ancianos hindúes en la India, y la comida carbonizada era un absorbente médico y un agente purificante en Egipto 1500 A.C (Mohan and Pittman, 2007).

La producción industrial de carbón activado fue establecida en 1900-1901. El carbón activado comercial ha sido extensivamente usado para la adsorción del As(III) y As(V) del agua. Se han realizado estudios de adsorción del As(III) y el As(V) en el carbón activado versus pH y temperatura. La capacidad del As(III) en el carbono fue constante a pH 0,16-3,5. Sin embargo el As(V) exhibió una máxima adsorción a un pH de 2,35 dentro del rango de pH entre 0,86-6,33 (Mohan and Pittman, 2007).

También existen desechos de la producción agrícola que han sido utilizados como adsorbentes de Arsénico, como por ejemplo la cascarilla de arroz era usada para la remoción de arsénico del agua. La remoción completa (usando una columna de cascarilla de arroz) del As(III) y el As(V) fue llevada a cabo bajo las siguientes condiciones: Concentración inicial de Arsénico 100 µg/L; cantidad de cascarilla de arroz, 6 g; promedio del tamaño de la partícula entre 780 y 510 µm, tasa de flujo, 6,7 y 1,7 mL/min; y pH 6,5 y 6,0 respectivamente. La desorción también fue llevada a cabo mediante la utilización de KOH 1M (Mohan and Pittman, 2007). El biocarbono creado a partir de la comida rápida/pirólisis de la

corteza, fue investigado como adsorbente para la remoción de As^{3+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} del agua. La corteza del roble, pino, madera del roble y la madera de pino carbonizada fueron obtenidas por pirólisis rápida a 400 y 450 °C. Los estudios de adsorción fueron llevados a cabo a diferentes temperaturas, pH y proporciones sólido líquido en modo batch. La máxima adsorción ocurrió en el rango de pH de 3-4 para el arsénico y de 4-5 para el plomo y cadmio (Mohan and Pittman, 2007).

Pérez, Prieto, Rojas, Marmolejo, Salinas, Patiño, 2006, estudiaron distintas resinas de intercambio aniónico con respecto a su capacidad para la eliminación de arsénico contenido en agua. Se utilizó agua del pozo V de Zimapán, Hidalgo, México, cuya concentración promedio es de $480 \pm 11 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de arsénico y es utilizada para consumo humano. Se emplearon dos resinas aniónicas fuertes; una, de tipo macro reticular (IRA-900) y la otra de tipo gel (IRA-400), así como una tercera, aniónica débil, de tipo macro reticular (IRA-96). Los experimentos realizados con estas resinas mostraron que la IRA-900 es la de mayor eficiencia en la eliminación de arsénico del agua potable, debido a que presentó una capacidad de tratamiento de $700 \text{ Vagua}\cdot\text{Vres}^{-1}$, mientras que las capacidades de las resinas IRA-400 e IRA-96 fueron de 320 y $52 \text{ Vagua}\cdot\text{Vres}^{-1}$, respectivamente. La concentración promedio de arsénico remanente en el agua tratada fue de $24 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y está dentro del límite máximo permisible por la norma oficial mexicana para agua potable.

1.4.5.1 Remoción de arsénico mediada por microorganismos

En investigaciones realizadas anteriormente se muestran resultados positivos ante esta experimentación, por ejemplo Riffat *et al*, 2007, utilizaron cianobacterias aisladas de un suelo contaminado con arsénico en un área llamada Gotera, en dicho estudio se probó la supervivencia inicial de las cianobacterias utilizando concentraciones de hasta 10000 ppm de arsénico en medio sólido con agar al 1.2%. Posteriormente se seleccionaron las cianobacterias vivas que

removían la mayor cantidad de arsénico, estas pruebas se las realizaron durante 60 días en condiciones de cultivo con 3000 luxes de intensidad de luz y con un fotoperiodo luz/oscuridad de 16/8. Los resultados de supervivencia de diferentes especies de cianobacterias en su medio de cultivo compuesto por distintas concentraciones de arsénico en cultivo líquido son presentados en el cuadro 1.2.

Cuadro 1.2: Tolerancia a diferentes concentraciones de Arsénico en medio de cultivo líquido por cianobacterias compuestas por varios géneros y especies del Área Gotera (Riffat *et al*, 2007).

Concentraciones de Arsénico en medio de cultivo conteniendo Nitrógeno	Composición del genero o especie de la cianobacteria dominante
0 ppm	<i>Phormodium</i> sp.
	<i>Nostoc</i> sp.
	<i>Anabaena</i> sp.
	<i>Cylindrospermum</i> sp.
	<i>Calothrix</i> sp.
	<i>Aphanothece</i> sp.
1000 ppm	<i>Nostoc</i> sp.
	<i>Calothrix</i> sp.
	<i>Nostoc</i> sp-2
5000 ppm	<i>Phormodium</i> sp.
	<i>Nostoc</i> sp.
	<i>Anabaena</i> sp.
	<i>Nostoc</i> sp-1
10000 ppm	<i>Phormodium</i> sp.

Maeda, Kumeda, Maeda, Higashi, Takeshita, 1987, aislaron una cianobacteria resistente a Arsénico de un ambiente contaminado, se investigaron los efectos de las condiciones de cultivo en el crecimiento además de la bioacumulación de arsénico. Para realizar los ensayos de bioacumulación, se investigaron también los efectos de la concentración de 5 nutrientes (Fósforo, Cobalto, Hierro, Molibdeno y Nitrógeno), posteriormente los investigadores

propusieron un medio en el cual la bioacumulación de arsénico por las cianobacterias era el máximo. Los efectos de las concentraciones de arsénico en el medio de cultivo empezaron a afectar el crecimiento a partir de una concentración de $100 \mu\text{g.g}^{-1}$ y las células no sobrevivieron a concentraciones de $5000 \mu\text{g.g}^{-1}$, en el estudio se comprobó que *Chlorella vulgaris* fue más resistente al Arsénico que *Nostoc* sp.

Las cianobacterias también pueden ser inmovilizadas con el fin de obtener una columna en donde se pueda tratar agua contaminada con arsénico o cualquier metal pesado, las cianobacterias al tener un tamaño mucho más pequeño que la cascarilla de arroz tiene disponible mayor área superficial donde pueden encontrarse varios grupos funcionales positivos como aminos que se hallan principalmente en el material orgánico.

1.4.6 Pruebas de toxicidad universal de cianobacterias con *Daphnia pulex*

El género *Daphnia* son las más utilizadas como organismos de prueba o de referencia en pruebas de toxicidad universal. La amplia distribución geográfica, el importante papel que cumplen al interior de la comunidad zooplanctónica, la facilidad de cultivo en el laboratorio, la reproducción partenogenética (lo cual asegura una uniformidad de respuesta) y el corto ciclo de vida con la producción de un alto número de crías, han hecho de este grupo un ideal para la evaluación de toxicidad, de carácter universal (Díaz, Pica, Ronco, 2006).

El género *Daphnia* se ubica dentro del orden cladóceras de la clase crustácea, y especies como *Daphnia magna*, *Daphnia pulex* y *Daphnia similis*, son utilizadas extensivamente en pruebas de toxicidad, por lo cual existe una extensa información sobre las técnicas de cultivo, los requisitos de temperatura, luz y

nutrientes, así como su respuesta a muchos tóxicos. Específicamente, los ensayos de toxicidad con *Daphnia pulex* permiten determinar la letalidad potencial de sustancias químicas puras, aguas residuales domésticas e industriales, lixiviados, aguas superficiales o subterráneas, agua potable y agua de poro de sedimentos, entre otros (Díaz *et al*, 2006).

Las cianobacterias al producir toxinas, pueden contaminar el agua que es tratada por ellas, la OMS permite 1µg/L de microcistina, una toxina hepatotóxica producida por algunas cianobacterias, por lo que se deben realizar ensayos de toxicidad en el agua tratada o identificación mediante HPLC de las posibles toxinas presentes en el agua, dado que ya se conoce que esta toxina afecta a humanos y animales (Vela *et al*, 2007). Después de los ensayos de toxicidad con *Daphnia pulex* en esta investigación, es importante realizar las pruebas de toxicidad con mamíferos como ratones, por tener un metabolismo muy similar al de los humanos permite simular sintomatología que podría presentar el ser humano al ingerir estas toxinas. Ni la FDA (Food and Drug Administration de Estados Unidos) tampoco la EPA (Environmental Protection Agency de Estados Unidos) muestran como realizar pruebas de toxicidad para el agua que posiblemente esté contaminada con toxinas producidas por cianobacterias, la FDA muestra análisis de toxicidad para medicamentos nuevos, con mamíferos como ratones.

1.5 Sistema de hipótesis

Las cianobacterias seleccionadas (cepa 15 y Consorcio) aisladas de las hojas de *Polylepis pauta* en bosques nativos de Papallacta-Ecuador, remueven el arsénico presente en el agua sintética a nivel de laboratorio.

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Participantes:

2.1.1 Escuela Politécnica del Ejército

La Escuela Politécnica del Ejército participó de una manera activa en la realización de este trabajo de investigación mediante el financiamiento del proyecto “Aislamiento, purificación y caracterización de cianobacterias procedentes de bosques nativos de *Polylepis pauta* para su aplicación en reforestación, recuperación de suelos y extracción de metabolitos primarios y secundarios (2007-2008)”; se concedió el uso de los Laboratorios de Biotecnología y de Microbiología con el fin de utilizar los equipos con los que cuenta la Escuela.

El Centro de Investigaciones Científicas de la ESPE (CEINCI); es el lugar donde se realizaron todos los ensayos de remoción de arsénico con las Cianobacterias.

2.1.2 Comisión Ecuatoriana de Energía Atómica

La Comisión Ecuatoriana de Energía Atómica cuenta con un Equipo de Absorción Atómica y Horno de Grafito, ambos de la marca Varian en los cuales se midió las concentraciones de arsénico remanente en el agua tratada con las Cianobacterias, se colaboró con el Gas Argón Extra Puro para el Horno de Grafito, además con estándares de Arsénico, Lámpara de cátodo hueco para cuantificar arsénico, Ácido Clorhídrico y Ácido Nítrico, todos los insumos fueron financiados por la Escuela Politécnica del Ejército.

2.1.3 Personas

El Ing. Enrique Arévalo, como Laboratorista de la Comisión Ecuatoriana de Energía Atómica cooperó y brindó su apoyo al momento de cuantificar el arsénico de las muestras de agua que fueron tratadas con las cianobacterias, las técnicas de cuatificación se las realizaron con la técnica Zeeman en el horno de grafito Varian, el ingeniero mostró su gran destreza al manejar dicho equipo.

La participación de la Lic. Biol. Alma Koch MSc. como directora del proyecto ha permitido el aporte de valiosas ideas de su parte además de la predisposición para facilitar el laboratorio de Microbiología del que está a cargo actualmente con el fin de que el proyecto avance de acuerdo al cronograma establecido. La Dra. Blanca Naranjo como codirectora del proyecto, al ayudar en la continua revisión del avance del proyecto y por su colaboración al utilizar sus valiosos conocimientos para permitir que esta tesis se lleve a cabo. Los ayudantes de laboratorio en el proyecto de “Aislamiento, purificación y caracterización de cianobacterias procedentes de bosques nativos de *Polylepis pauta* para su aplicación en reforestación, recuperación de suelos y extracción de metabolitos primarios y secundarios (2007-2008)” Natalia Villacís, Andrés Factos y Mario García; dado que el avance exitoso que tuvo aquel proyecto permitió que se continúe con aplicaciones de las cianobacterias, y una aplicación de ellas es esta tesis.

El señor Daniel Orrico, colaboró al facilitar las pulgas de agua *Daphnia pulex* para realizar los ensayos de toxicidad además que ayudó con su experiencia sobre dichos organismos para que las pruebas de toxicidad sean un completo éxito.

2.2 Zona de estudio:

2.2.1 Campo: Las cianobacterias fueron aisladas de las hojas de *Polylepis pauta* del páramo de Papallacta, provincia de Napo, Ecuador.

2.2.2 Laboratorio: Laboratorios de Biotecnología y de Microbiología de la Escuela Politécnica del Ejército ubicada en Sangolquí, Pichincha, Ecuador.

Laboratorios de la Comisión Ecuatoriana de energía Atómica ubicados en la ESPE, Salgolquí, Pichincha, Ecuador.

2.3 Período de tiempo de investigación:

2.3.1 Fecha de Inicio del trabajo: Lunes 4 de Agosto de 2008.

2.3.2 Fecha de término del trabajo: Viernes 20 de Marzo de 2009.

2.4 Diseño

2.4.1 Diseño para la remoción de arsénico con cianobacterias

La investigación que se llevó a cabo fue de tipo cuantitativo, tanto para la remoción de arsénico en la cual se necesitó conocer los valores de arsénico remanentes en el agua tratada con las cianobacterias, como para las pruebas de toxicidad con *Daphnia pulex* en las que fue necesario cuantificar la cantidad de pulgas vivas con el fin de conocer si existe toxicidad causada por las cianobacterias en los tratamientos realizados, los ensayos de toxicidad se los realizaron de acuerdo al protocolo de Díaz *et al*, 2006.

Diseño Experimental para la medición de Arsénico Adsorbido por las Cianobacterias

Se utilizó un Arreglo con 3 factores TxCxS; dispuesto en un Diseño Completamente al Azar. Los factores se muestran a continuación:

T: Tratamientos

C: Cianobacterias

S: Concentraciones de Arsénico

Se va a determinar si existe alguna diferencia entre los diferentes tratamientos del Modelo Factorial, estos tratamientos son formados por la combinación de los 3 factores principales utilizados que son: el tipo de cianobacteria, el pretratamiento dado a la biomasa y las concentraciones iniciales de arsénico.

Tabla 2.1: Descripción de los tratamientos, las cianobacterias y las concentraciones de arsénico.

CONCENTRACIONES ($\mu\text{g/L}$)	TRATAMIENTOS	CIANOBACTERIAS
100	Autoclave	Cepa 15
300	Calor a 92°C	Consortio
500	Sin Tratamiento	
700		

2.4.2 Diseño para las pruebas de toxicidad de cianobacterias

Se usó el análisis Probit, el cual es un método para analizar la relación entre un estímulo (dosis) y la cantidad de respuesta (todo o nada). Las respuestas

cuantitativas son preferidas casi siempre, pero en muchas situaciones no son prácticas. En estos casos, es posible determinar solo si una respuesta certera (como muerte) ha ocurrido. En un típico experimento de respuesta cuantitativo, grupos de animales son sometidos a diferentes dosis de una droga, en este caso a distintas dosis de agua tratada con cianobacterias. El porcentaje de muerte en cada nivel de dosis es tomado.

El modelo Probit asume que el porcentaje de respuesta está relacionado a la dosis logarítmica como una distribución normal acumulativa. Es decir el registro de dosis pueden ser usados como variables para leer el porcentaje de muerte de la acumulación normal. El uso de la distribución normal, en lugar de otras distribuciones de probabilidad, influye en la tasa de respuesta prevista, en altas y bajas concentraciones de posibles dosis, pero tiene una pequeña influencia en la media. Por lo tanto muchas de las comparaciones de diferentes drogas son hechas usando tasas de respuesta del 50%. En esta investigación se utilizó el programa StatPlus 2007 para realizar los análisis, y para cada concentración del probable tóxico se utilizaron tres réplicas.

2.5 Procedimientos

2.5.1 Obtención de las cianobacterias

Las cianobacterias utilizadas en este proyecto de investigación fueron obtenidas del cepario con el que cuenta la Escuela Politécnica del Ejército en el Laboratorio de Microbiología, Área de Cianobacterias.

2.5.2 Cultivo de cianobacterias en medio líquido

Las cianobacterias fueron entregadas en medio BG11o sólido en cajas petri. A partir del cultivo sólido, se establecieron los cultivos líquidos en medio BG11o líquido (Anexo A).

Para inocular las cianobacterias en medio líquido se realizó inicialmente un raspado del cultivo en medio sólido con una asa bacteriológica esterilizada en un mechero, posteriormente el raspado de cianobacterias se inoculó en el medio líquido mediante la inmersión del asa y una leve agitación de acuerdo al protocolo de siembra de cianobacterias propuesto por Koch *et al*, 2007. Los frascos inoculados se mantuvieron con aireación constante a un fotoperiodo luz/oscuridad de 16/8 con una temperatura de 22 ± 2 °C y humedad de $36\pm 5\%$ durante 30 días hasta el momento de la cosecha.

2.5.3 Preparación de agua contaminada con arsénico

La preparación del agua contaminada con arsénico se la realizó con el arseniato ácido de sodio heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Se inició con un stock de 100 ppm de Arsénico diluido en agua destilada y se lo calculó de la siguiente forma:

$$1L * \frac{100mgAs}{1L} \cdot \frac{311,9mgNa_2HAsO_4 \cdot 7H_2O}{74,92mgAs} = 416,3107314mgNa_2HAsO_4 \cdot 7H_2O / L$$

A partir de esa concentración de arsénico, se realizaron diluciones para poder conseguir concentraciones de: 900 µg/L, 700 µg/L, 500 µg/L, 300 µg/L y 100 µg/L.

La fórmula utilizada para dichos cálculos es la siguiente:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Los volúmenes que se tomaron del stock de 100 mg/L se muestran en la tabla 2.2, todos estos volúmenes fueron posteriormente disueltos en balones aforados de 1000 mL con lo que se llega teóricamente a la concentración deseada.

Tabla 2.2: Concentraciones de arsénico con volúmenes a tomar del stock de 100 mg/L de arsénico.

Concentración de As ($\mu\text{g/L}$)	Volúmen a tomar del stock de 100 mg/L
900	9 mL
700	7 mL
500	5 mL
300	3 mL
100	1 mL

Las diluciones realizadas a estas concentraciones fueron hechas para poder realizar las isothermas de adsorción de las cianobacterias para el arsénico. Para tomar tiempos de remoción, se utilizaron las mismas concentraciones, según un protocolo modificado propuesto por Maeda, Kumeda, Maeda, Higashi, Takeshita, 1987 y reformado en los Laboratorios de Microbiología de la ESPE de acuerdo a los datos que se quieren obtener que son isothermas de adsorción utilizando una concentración máxima de 700 $\mu\text{g/L}$.

2.5.4 Recuperación de la biomasa

Para poder realizar los ensayos de adsorción de arsénico es importante contar con la biomasa limpia de medio de cultivo además de que se encuentre con la menor cantidad de humedad posible para evitar interferencias en las concentraciones de arsénico a las que serán sometidas.

La biomasa fue recuperada mediante centrifugación a 4000 revoluciones por minuto (rpm) en tubos falcon de 50 mL durante 15 min, posteriormente se la enjuagó con agua destilada estéril durante 5 min para otra vez centrifugarla a 4000 rpm durante 15 min y poder obtener una biomasa libre de cualquier impureza presente en el medio que pudiese alterar la sensibilidad del experimento con arsénico (Arunakumara, Xuecheng, Song, 2007). Como la biomasa tomada de un reactor no se encontraba con la misma densidad celular que la biomasa de otro reactor, fue necesario hacer las diluciones necesarias para poder contar exactamente con el mismo número de cianobacterias en las diferentes repeticiones y tratamientos del diseño experimental llevado a cabo en esta investigación. Las diluciones fueron realizadas al momento de iniciar los ensayos con el agua contaminada con arsénico.

2.5.5 Tratamiento de la biomasa mediante autoclave

La biomasa fue resuspendida en agua destilada estéril para poder autoclavarla a 121°C y 15 Psi de presión. El objetivo de este tratamiento fue el de lizar a las células y obtener una mayor exposición de grupos funcionales presentes en las paredes celulares para que exista una mejor adsorción del arsénico. Después del autoclavado, se centrifugó la biomasa a 4000 rpm y se eliminó el sobrenadante para posteriormente la biomasa sobrante enjuagarla con agua estéril durante 5 min y luego centrifugarla nuevamente para obtener biomasa completamente limpia y lista para las pruebas de adsorción (Ferrari, Guzmán, Silva, Alcaráz, Silva, González, 2004).

2.5.6 Tratamiento de la biomasa mediante calor a 92°C durante una hora.

La biomasa fue resuspendida en agua destilada estéril para poder someterla a calor, posteriormente se sumergieron los tubos falcon de 50 mL conteniendo la biomasa en un vaso de precipitación con agua destilada y núcleos de ebullición sobre una plancha de calentamiento y se mantuvieron allí 60 min a partir de que el agua empezó a hervir. Posteriormente se centrifugó a 4000 rpm para eliminar el sobrenadante y luego se enjuagó la biomasa con agua destilada estéril para que ésta quede lista para los ensayos con arsénico (modificado a partir del protocolo de Ferrari *et al*, 2004).

2.5.7 Biomasa sin tratamiento

La biomasa en los tubos falcon fue centrifugada a 4000 rpm para posteriormente ser resuspendida en agua estéril y enjuagada. Luego se eliminó el agua mediante centrifugación a 4000 rpm para tener la biomasa libre para los ensayos con arsénico.

2.5.8 Resuspensión de la biomasa en agua contaminada con arsénico

Se vertió 100 mL de agua contaminada con arsénico en frascos Boeco de 500 mL, se resuspendió la biomasa de cianobacterias y se colocaron los frascos en un agitador orbital SHO-2D de la marca WiseShake a 100 rpm (modificado a partir de Ferrari, 2004).

2.5.9 Toma de muestras y cuantificación de arsénico

Se tomó una muestra cada 3, 9, 15, 21 y 30 min de 5 mL, las cuales fueron filtradas para contar con agua libre de cianobacterias. Las muestras fueron preservadas con ácido clorhídrico al 37% hasta alcanzar un pH de 2; para su

posterior cuantificación mediante generación de hidruros acoplado a un espectrofotómetro de absorción atómica (Anexo B).

La cuantificación de arsénico se la realizó mediante generación de hidruros con el equipo Vapor Generation Accessory marca varian modelo VGA 76 acoplado a un equipo de absorción atómica de marca varian modelo AA240FS según la metodología descrita en el manual del equipo.

Las condiciones a las que se operó el equipo fueron las siguientes:

Flujo de Aire: 13.5 L/min

Flujo de Acetileno: 2.45 L/min

Réplicas de Estándar: 3

Réplicas de Muestra: 2

Longitud de Onda: 193.7 nm

Tiempo de Integración: 45 segundos

Gas Transportador: Argón extra puro

Antes de realizar la medición fue necesario reducir el arsénico que puede encontrarse como As (V) a As (III) mediante la adición de Yoduro de Potasio a una concentración de 1% w/v, la reducción tomó 50 min a temperatura ambiente (Varian, 2004).

El agente reductor fue Borohidruro de Sodio (NaBH_4) al 0.6 % con Hidróxido de Sodio al 0.5%. El ácido contenedor fue Ácido Clorhídrico 10 M (Varian, 2004).

2.5.9.1 Elaboración de estándares para generación de hidruros

A partir de un estándar de arsénico de la marca Inorganic Ventures de 1000 mg/L se realizaron diluciones en balones aforados de 100 mL para contar con estándares de 5, 10, 15, 25, 50 $\mu\text{g/L}$.

2.5.9.2 Curvas de calibración para el generación de hidruros

La curva de calibración se la realizó con 3 réplicas para cada estándar y se las ajustó a un modelo lineal (Varian, 2004).

2.5.9.3 Isotermas de adsorción para arsénico

Para los ensayos de adsorción se debe utilizar las isotermas de adsorción, con el fin de conocer qué cantidad de contaminante está siendo adsorbido por cada gramo de cianobacteria. En este caso es necesario conocer la cantidad en peso de cianobacterias que fueron sometidas al agua contaminada con arsénico. Para este estudio fue de 191.7 mg de cianobacterias tanto para la cepa 15 como para el consorcio.

Adsorción es la acumulación preferencial de una sustancia en una fase líquida o gaseosa sobre la superficie de un sólido, en esta investigación se lleva a cabo una adsorción de arsénico que se encuentra en una fase líquida y se desea pasar a una fase sólida que es la cianobacteria. Los procesos de adsorción son ampliamente usados en muchas aplicaciones, para este caso el adsorbente es la

cianobacteria; un adsorbente deberá tener una gran capacidad de adsorción y rápida velocidad de adsorción. El adsorbente debe contar con una gran área superficial o un gran volumen de microporos.

Una isoterma de adsorción es la relación matemática entre la masa de soluto adsorbido y la concentración del soluto en la solución una vez que se ha alcanzado el equilibrio. Los modelos de isotermas de adsorción que se utilizaron en esta investigación son el lineal, Langmuir y Freundlich.

Lineal: $q = K \times C_e$

Langmuir: $q = \frac{Q_{max} \times K \times C_e}{1 + K \times C_e}$

Freundlich: $q = K \times C_e^{\frac{1}{n}}$

2.5.10 Ensayo de toxicidad con *Daphnia pulex*

Las pulgas de agua fueron facilitadas por el señor Daniel Orrico, estudiante de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología de la Escuela Politécnica del Ejército.

2.5.10.1 Preparación de agua reconstituida para *Daphnia pulex*

Su preparación se la realizó en un garrafón de 19 L de capacidad en agua destilada, para ello se adicionó 2,4 g de MgSO₄, 3,84 g de NaHCO₃ y 0,16 g de KCl. Se agitó hasta disolver completamente las sales. Paralelamente se disolvió 2,4 g de CaSO₄.2H₂O en un litro de agua destilada; esta solución se la tuvo que agitar durante 24 h en un agitador orbital para que se disuelva completamente. Al terminar de solubilizar el CaSO₄.2H₂O se lo incorporó a los 19 L de la solución de sales para completar un total de 20 L de agua reconstituida (Díaz *et al*, 2006).

2.5.10.2 Manutención de cultivos de *Daphnia pulex*

A las pulgas de agua se las mantuvo en peceras de vidrio de 3L de capacidad durante todo el tiempo que se llevaron a cabo las pruebas de toxicidad. Al agua reconstituida se la cambió cada semana tomando en cuenta de eliminar las 2/3 partes del agua, de manera que 1/3 del agua anterior quede en la pecera para evitar cambios bruscos de ambiente que pueda causarles la muerte a las pulgas. Se eliminó el agua mediante una bomba de vacío tomando el agua del fondo de las peceras para eliminar las mudas y desechos de las *Daphnia* (Díaz *et al*, 2006).

Se utilizó como alimento *Spirulina*, y los cálculos para el alimento por cada pecera de pulgas se la realizó de la siguiente manera: (Díaz *et al*, 2006).

$$V = A * B / C$$

Donde:

V = volumen a ser adicionado

A = número de organismos

B = número de células por *Daphnia* (1,5 x 10⁶ células por *Daphnia*/día)

C = densidad celular de la suspensión algal

2.5.10.3 Separación de pulgas por edad de Cultivo

Se recogió a los neonatos diariamente con una pipeta de 2500 µL con el fin de crear nuevos cultivos en otras peceras, las pulgas fueron separadas por semanas de edad en seis estanques o peceras diferentes como se muestra en la figura 2.1 (Díaz *et al*, 2006).

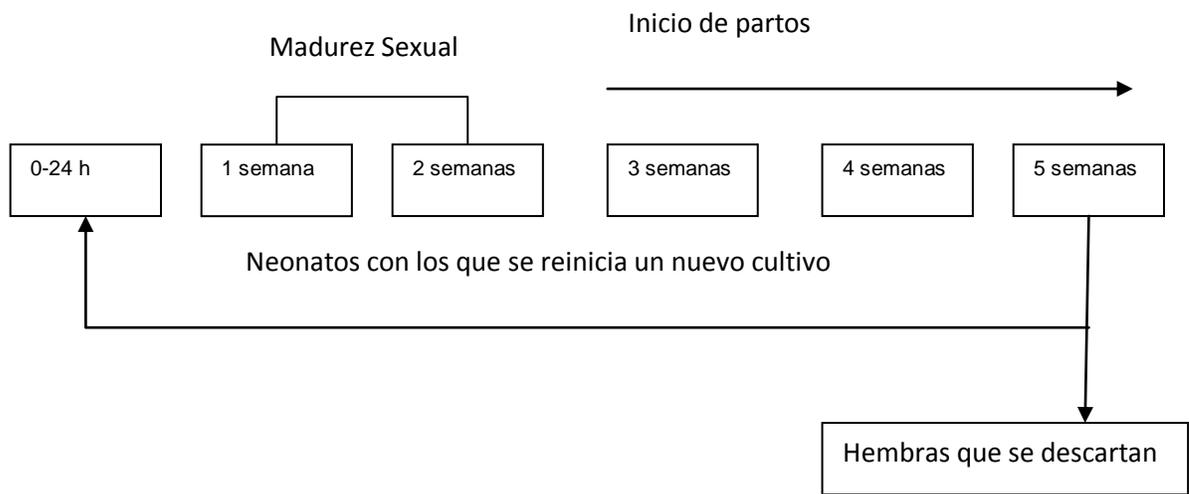


Figura 2.1: Separación de pulgas por edad (Díaz *et al*, 2006).

2.5.10.4 Neonatos utilizados para pruebas de toxicidad

El día anterior a realizarse las pruebas de toxicidad, se extrajeron con una pipeta de 2500 μ L todos los neonatos presentes en los estanques de crecimiento, para así, al día siguiente, poder contar con neonatos de entre 0 y 24 h que son los utilizados para pruebas de toxicidad universal (Díaz, C *et al*, 2006).

2.5.10.5 Obtención de agua tratada con cianobacterias para pruebas de Toxicidad

Se recuperó biomasa como se explica en el apartado 2.5.4, posteriormente se resuspendió a ésta biomasa en agua destilada estéril y se la agitó durante 6 días a 100 rpm en un agitador orbital para posteriormente recuperar el agua tratada mediante centrifugación a 4000 rpm y utilizarla en los ensayos de toxicidad. No solamente el agua tratada se utilizó en los ensayos de toxicidad,

también el medio de cultivo de las cianobacterias fue utilizado para pruebas de toxicidad con el fin de tener una mayor certeza de que las cianobacterias son tóxicas en un primer nivel de bioensayos (Díaz *et al*, 2006).

2.5.10.6 Prueba de sensibilidad de *Daphnia pulex* con dicromato de potasio

Las pruebas de sensibilidad en estos organismos son utilizadas con el fin de conocer si pueden ser usadas para pruebas de toxicidad, dado que si no tienen sensibilidad a los tóxicos de referencia difícilmente tendrán sensibilidad a posibles tóxicos en el agua tratada con las cianobacterias (Díaz *et al*, 2006).

Se realizó una solución madre de Dicromato de Potasio de 100 mg/L en agua destilada, a partir de la cual se realizaron diluciones en agua reconstituida para obtener concentraciones de 10 mg/L, 1 mg/L, 0,1 mg/L, 0,05 mg/L y 0.01 mg/L (Díaz *et al*, 2006).

Se pusieron 10 neonatos de menos de 24 h en las diluciones de dicromato de potasio con el fin de conocer la concentración letal media para este tóxico de referencia. Se realizaron 2 repeticiones por cada concentración y se mantuvo a los neonatos por 48 h en dichas soluciones, además que se realizó un blanco solo con agua reconstituida, posterior a las 48 h se contaron los neonatos muertos, a los que se identificó por falta de movimiento y en casos de difícil observación a simple vista se observó mediante el estereomicroscopio si existía ritmo cardíaco (Díaz *et al*, 2006).

Para las pruebas de toxicidad tanto con el agua tratada como con el medio de cultivo de las dos cianobacterias se realizaron diluciones como se muestra en la figura 2.2 en balones de 100 mL. De los 100 mL de cada dilución se utilizaron 25 mL en cajas petri para cada repetición con un total de 3 repeticiones por cada dilución. Por cada 25 mL de muestra se añadieron 10 neonatos menores a 24 h y se los mantuvo allí 48 h, después de las cuales se observaron al estereomicroscopio para contar los neonatos vivos y muertos (Díaz C *et al*, 2006).

2.6 Análisis de datos

2.6.1 Remoción de arsénico

Los datos de porcentaje de remoción de arsénico para los distintos tratamientos utilizados en esta investigación fueron analizados en el programa SPSS versión 15, mediante el cual se obtuvieron datos de estadísticos descriptivos, ANOVA, y la prueba de Tukey.

2.6.2 Toxicidad de las cianobacterias

El análisis de datos de toxicidad de cianobacterias usadas en este proyecto es cualitativo y cuantitativo al tener que observar y contar pulgas muertas sometidas a distintas concentraciones de agua tratada por las cianobacterias. Se utilizó el programa Probit de Biostat para analizar dichos datos, el cual arroja valores de Concentración Letal Media de las sustancias analizadas con organismos vivos al ingresar datos de los organismos muertos y organismos utilizados en las pruebas de toxicidad, además de las concentraciones de la sustancia que se sospecha que es tóxica (Barrios *et al*, 2007).

Hay que tener en cuenta que distintas especies tienen diferente sensibilidad a distintas sustancias químicas. Más de 150 especies desde bacterias hasta mamíferos se usaron como organismos para test, pero sólo unas 40 tuvieron cierta aprobación oficial.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

3.1 Manejo de cultivos axénicos y en consorcios de cianobacterias

3.1.1 Cultivo de cianobacterias en reactores continuos

Se obtuvieron cultivos masivos de cianobacterias en frascos Boeco de 250 mL a partir del cepario del Laboratorio de Cianobacterias en el Centro de Investigaciones Científicas de la Escuela Politécnica del Ejército (figura 3.1).



Figura 3.1: Cultivo de Cepa 15 y Consorcio en Frascos Boeco de 250 mL con medio BG11o (Espíndola, 2008).

En los frascos de 250 mL se llegó a una DO_{750} de 1 por lo que ya fue posible escalar a reactores de mayor volúmen como se aprecia en la figura 3.2.

Al iniciarse los cultivos a partir de cultivos en cajas petri con medio BG11o sólido, el tiempo de obtención de biomasa aumentó dado que el número de cianobacterias utilizadas para el inóculo inicial fue poco a pesar de que los frascos boeco de 250 mL fueron mantenidos con aireación constante. Para llegar a tener una densidad óptica a 750 nm de 1, se tuvo que mantener el cultivo durante aproximadamente 45 días, para posteriormente pasarlo a reactores de 500 mL. Finalmente se escalaron los cultivos a reactores de 5 L en donde al tener un inóculo inicial bastante concentrado, el tiempo para obtener una densidad óptica a 750 nm ($DO_{750\text{ nm}}$) de 1 fue de 15 y 18 días tanto de consorcio como de la cepa 15 respectivamente.

Posteriormente fueron escaladas hasta llegar a un cultivo de 5 L tanto para la cepa 15 como para el consorcio como se puede observar en los reactores de la figura 3.2.



Figura 3.2: Reactores de 5 L donde se realizó la obtención masiva de biomasa cianobacteriana para los Ensayos con Arsénico (Espíndola, 2008).

3.1.2 Morfología de las cianobacterias a utilizarse en los ensayos de remoción de arsénico

En la figura 3.3a se aprecia la morfología de la cepa 15 a los 5 días de iniciado el cultivo en medio líquido, a los 10 días se observa la morfología de la cepa 15 en la figura 3.3b, a los 15 días la cianobacteria se ve plegada como se aprecia en la figura 3.3c. La cepa 15 cuenta con gran cantidad de células fijadoras de nitrógeno llamadas heterocistos, además en la figura 3.3d se puede ver que la cepa 15 se encuentra enrollada, mientras más tiempo pasaba los cultivos.

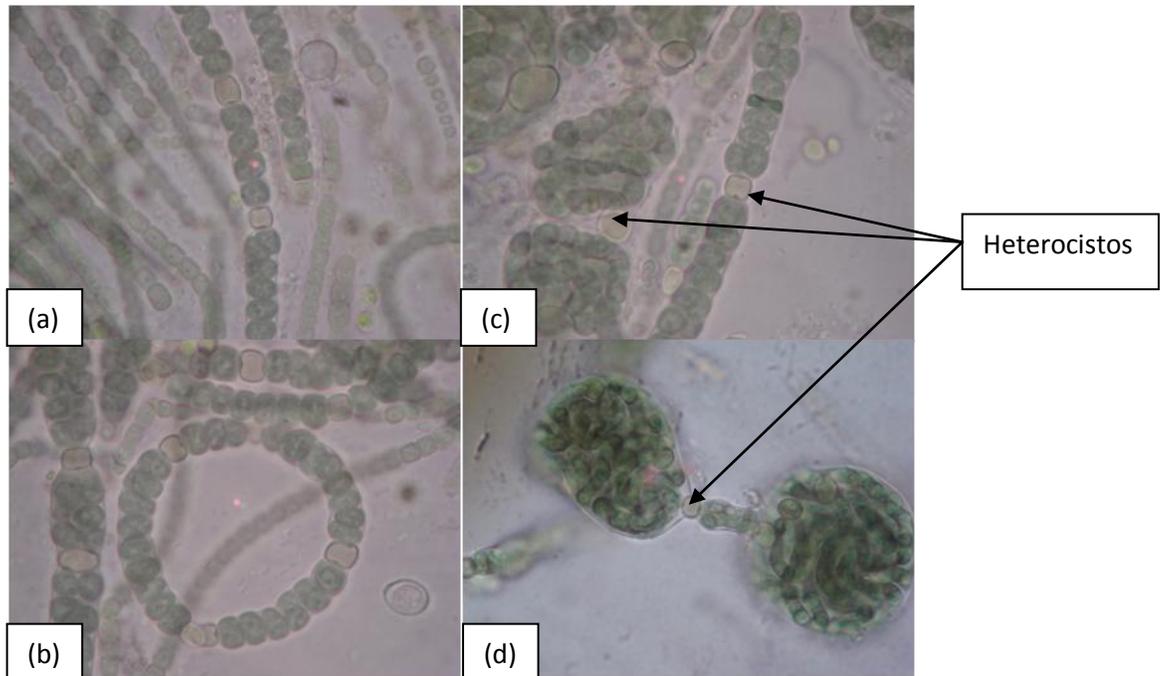


Figura 3.3: Imágenes a 40 aumentos en un microscopio de la Cepa 15 en sus diferentes estadios de crecimiento: (a) 5 días, (b) 10 días, (c) 15 días, (d) 20 días (Espíndola, 2008).

El consorcio utilizado cuenta con diferentes tipos de cianobacterias, principalmente del género *Anabaena* con distintas morfologías como se pueden

observar en la figura 3.4, además cuentan con varias células fijadoras de nitrógeno llamados heterocistos.

En cuanto a la cepa 15 toma distintas formas en sus etapas de crecimiento, al momento de que fue cultivada para los ensayos de remoción de arsénico tuvo la forma que se muestra en la figura 3.3 en la parte (d), la cual es cerrada y sin ninguna exposición de sus paredes internas como en etapas iniciales de crecimiento, pero cuando se les somete a calor, las células se abren y expondrán toda su pared celular además de que todos sus organelos exhibirán mayormente sus grupos funcionales.

El consorcio utilizado está conformado por 4 tipos de cianobacterias las cuales se pueden apreciar en la figura 3.4, la cianobacteria (c) es la que podría adsorber con mayor facilidad el arsénico dada su forma alargada además que muestra mayor exposición de su pared celular al medio circundante, el resto, siempre será necesario que se encuentren desplegadas para que tengan un mayor porcentaje de adsorción de arsénico. En el consorcio de cianobacterias también se encuentra gran cantidad de otras bacterias que ayudan a que se de mayor cantidad de adsorción de arsénico.

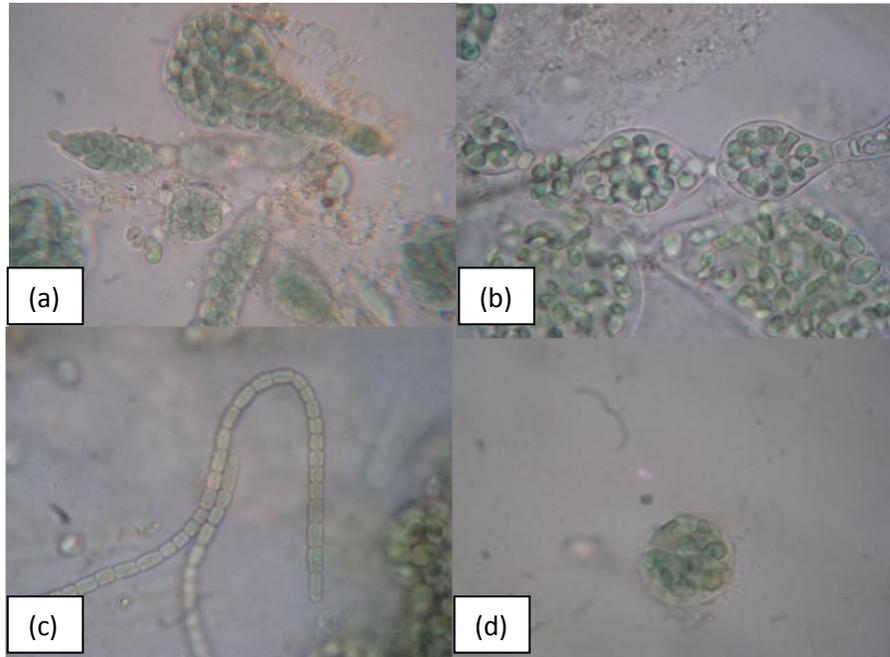


Figura 3.4: Cianobacterias que forman parte del Consorcio utilizado en los ensayos de Remoción de Arsénico (Espíndola, 2008).

3.2 Producción de biomasa para los ensayos con arsénico

3.2.2 Cosecha de la biomasa obtenida en los reactores de 5 L

Cuando se tuvo una $DO_{750\text{ nm}}$ de 1 en los cultivos, se cosechó la biomasa como se observa en la figura 3.5a, la biomasa ya recuperada se encuentra en el fondo del tubo falcon de 50 mL (figura 3.5b).

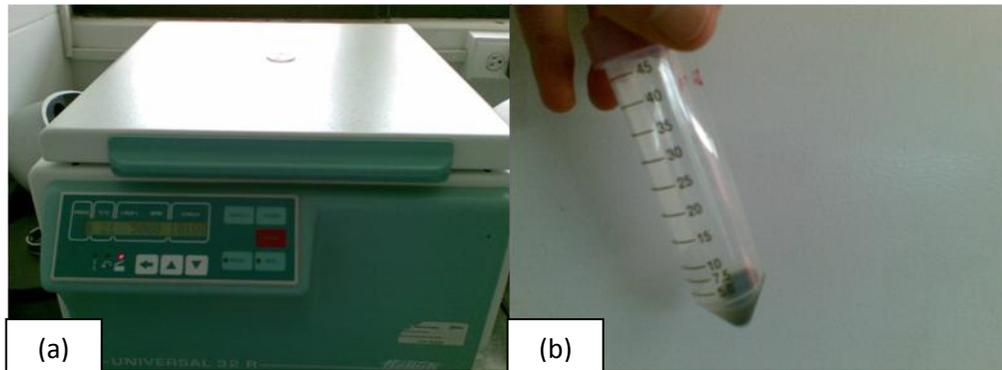


Figura 3.5: Recuperación de la Biomasa mediante centrifugación en tubos Falcon de 50 mL (a) centrífuga, (b) tubo Falcon de 50 mL con biomasa recuperada (Espíndola, 2008).

Después de la recuperación por centrifugación, la biomasa fue sometida a los tratamientos ya mencionados en el capítulo 2 en las secciones 2.5.5 y 2.5.6 para obtener la biomasa ya lisada como se puede observar en la figura 3.6, la biomasa lisada tiene un color marrón distinto al de las cianobacterias vivas.



Figura 3.6: Biomasa sometida a tratamiento I y II (Espíndola, 2008).

3.3 Evaluación de la remoción de arsénico en medio líquido

3.3.1 Resuspensión de la biomasa y ensayos de remoción de arsénico

En la figura 3.7 se observa la resuspensión de la biomasa para la máxima adsorción del arsénico en las cianobacterias.



Figura 3.7: Agitación de los frascos Boeco de 500 mL conteniendo arsénico V y Cianobacterias en agua (Espíndola, 2008).

Las muestras tomadas (figura 3.8a) que se filtraron (figura 3.8b) ya no fueron turbias como al momento del tratamiento con las cianobacterias, por lo que ya fue posible cuantificar el arsénico sin que existan interferencias de arsénico adsorbido en materia orgánica.

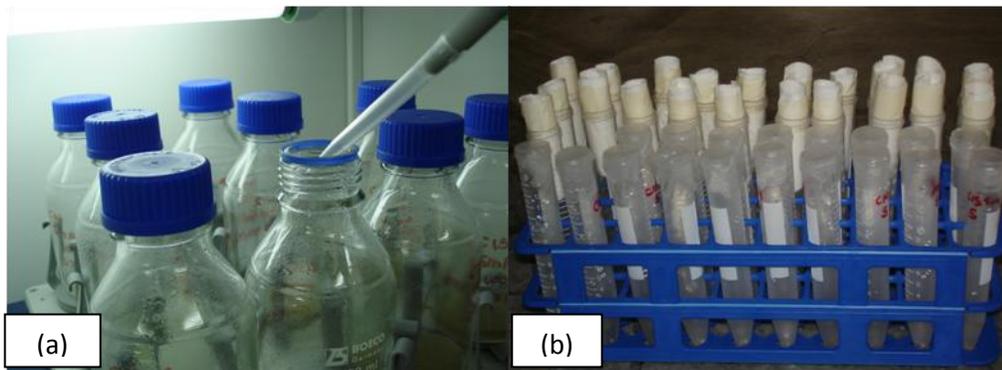


Figura 3.8: Toma de muestras de agua tratada con cianobacterias: (a) Toma de muestra con micropipeta de 2 mL, (b) Filtrado de muestras en tubos falcon de 50 mL (Espíndola, 2008).

3.3.2 Cuantificación de arsénico remanente en el agua tratada con cianobacterias

En la cuantificación de arsénico remanente en el agua tratada se obtuvo el porcentaje de remoción de arsénico para cada cianobacteria, pretratamiento de la biomasa y concentración de arsénico como se muestra a continuación en las siguientes figuras:

En la figura 3.9 se muestran los porcentajes de remoción de arsénico a partir de una concentración inicial de arsénico de 100 $\mu\text{g/L}$, el porcentaje más alto de remoción lo tiene el consorcio tratado con autoclave a 121°C para posteriormente seguirle el consorcio tratado con calor a 92°C, las cianobacterias que no fueron sometidas a ningún tipo de tratamiento tienen porcentajes de remoción de 3.07% y 4.39% para la cepa 15 y el consorcio respectivamente.

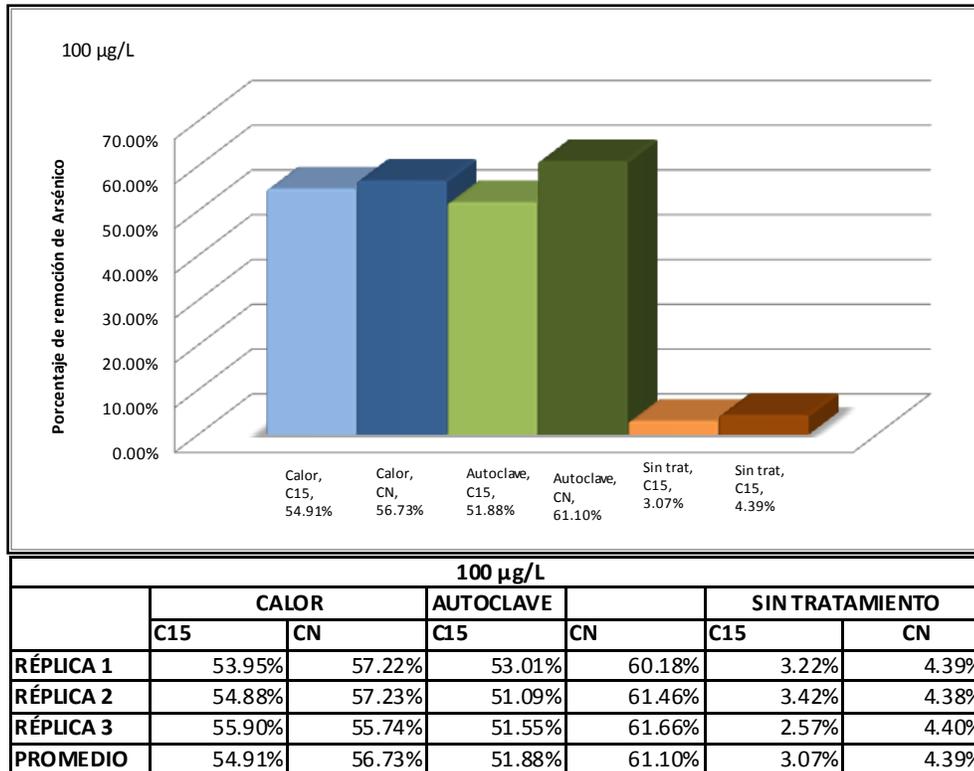


Figura 3.9: Porcentajes de remoción de Arsénico partiendo de una concentración de 100 µg/L (C15: cepa 15; CN: consorcio).

En la figura 3.10 se presentan los porcentajes de remoción de arsénico partiendo de una concentración inicial de arsénico de 300 µg/L, donde el porcentaje de remoción más alto lo tiene el Consorcio tratado con el autoclave con un porcentaje de remoción de 59.46%, luego se encuentra la cepa 15 tratada con el autoclave que tiene un porcentaje de remoción de arsénico de 53.38%, partiendo de esta concentración inicial de 300 µg/L también se aprecia que el tratamiento con calor a 92°C ha logrado que la cepa 15 tenga un porcentaje de remoción más alto que el consorcio con 49.24% para la cepa 15 y un 47.28% para el consorcio, aunque la variación es mínima.

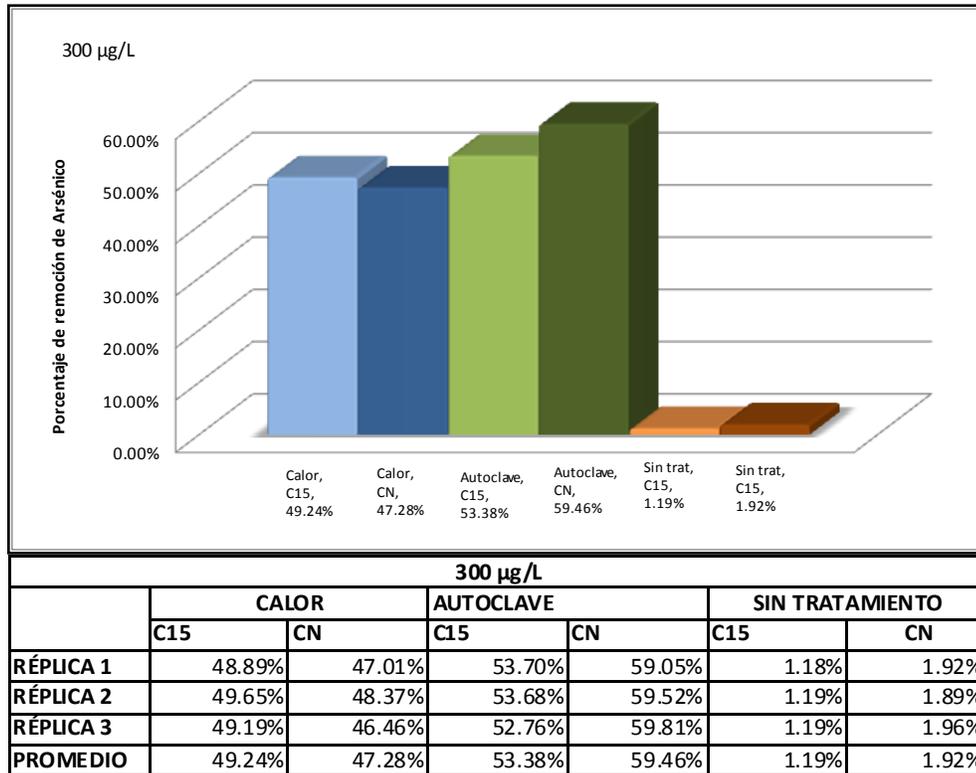


Figura 3.10: Porcentajes de remoción de Arsénico partiendo de una concentración de 300 µg/L (C15: cepa 15; CN: consorcio).

En la figura 3.11 se pueden apreciar los porcentajes de remoción de arsénico partiendo de una concentración inicial de arsénico de 500 µg/L, los porcentajes de remoción van disminuyendo conforme la concentración inicial de arsénico aumenta. Aquí se indica que el consorcio tratado con el autoclave vuelve a ser el que ha removido mayor porcentaje de arsénico con 56.96% de remoción, posteriormente le sigue el consorcio tratado con calor a 92°C con un 48.39% de remoción.

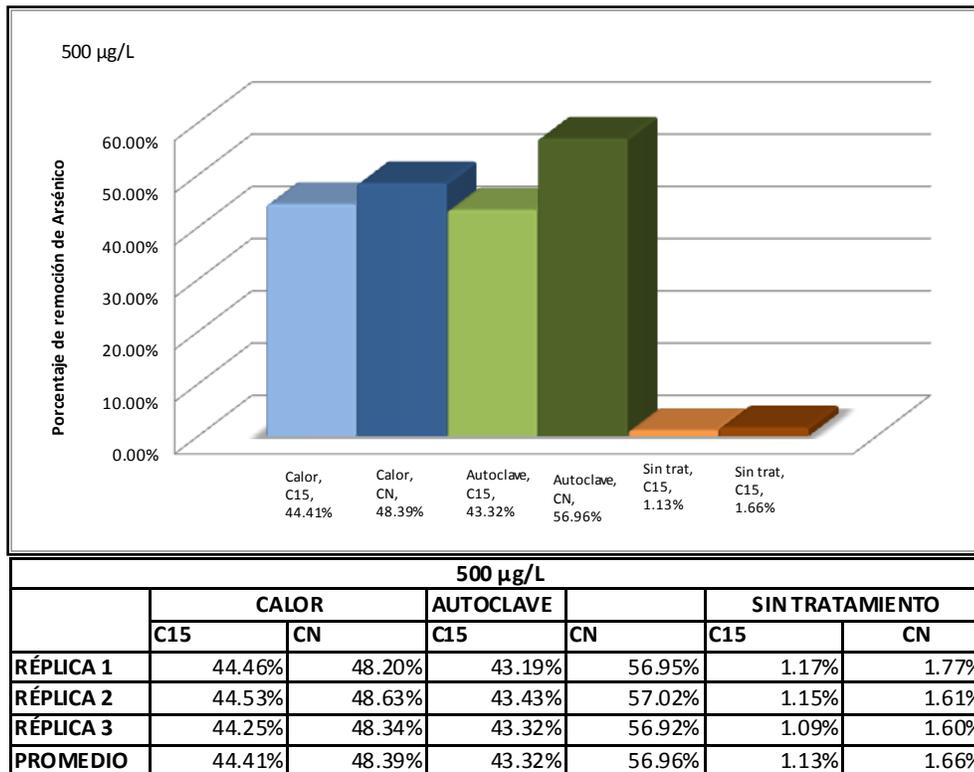
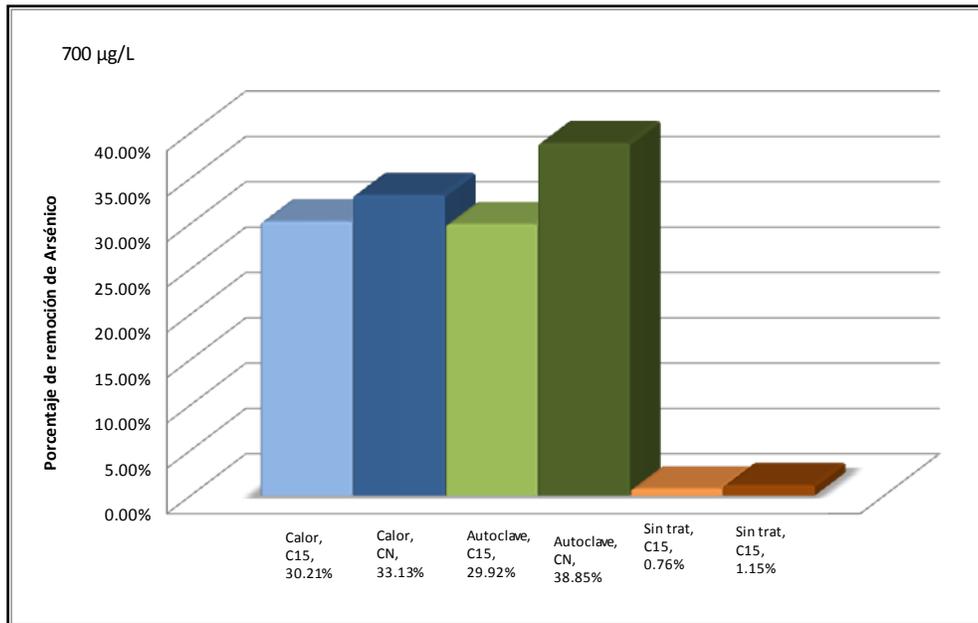


Figura 3.11: Porcentajes de remoción de Arsénico partiendo de una concentración de 500 µg/L (C15: cepa 15; CN: consorcio).

La figura 3.12, presenta los porcentajes de remoción de arsénico partiendo de una concentración inicial de arsénico de 700 µg/L, en este punto los porcentajes de remoción han disminuido drásticamente, el tratamiento que tuvo el mayor porcentaje de remoción en este caso fue el consorcio tratado con autoclave con un 38.85% de remoción, siguiéndole el consorcio tratado con calor con un 33.13 % de remoción.



700 µg/L						
	CALOR		AUTOCLAVE		SIN TRATAMIENTO	
	C15	CN	C15	CN	C15	CN
RÉPLICA 1	30.85%	33.48%	29.90%	38.99%	0.80%	1.15%
RÉPLICA 2	30.03%	32.81%	29.87%	38.71%	0.77%	1.15%
RÉPLICA 3	29.74%	33.10%	30.00%	38.86%	0.72%	1.15%
PROMEDIO	30.21%	33.13%	29.92%	38.85%	0.76%	1.15%

Figura 3.12: Porcentajes de remoción de Arsénico partiendo de una concentración de 700 µg/L (C15: cepa 15; CN: consorcio).

Como ya se explicó en los procedimientos, se tomaron muestras de agua mientras el ensayo se llevaba a cabo a ciertos intervalos de tiempo. En la figura 3.13 se muestran los datos, cuando se partió de una concentración inicial de arsénico de 700 µg/L (a), de 500 µg/L (b), a partir de 300 µg/L (c) y a partir de 100 µg/L (d). La cepa 15 y el consorcio que no fueron sometidos a ningún tratamiento, mantienen casi constante la concentración de arsénico en el agua, mientras que el resto de tratamientos van reduciendo paulatinamente las concentraciones de arsénico hasta que la concentración de arsénico en el agua es constante. En

todas las figuras se puede apreciar el mismo patrón de disminución de la concentración. En la figura 3.13 d la concentración de partida de arsénico es menor, porque los experimentos fueron llevados a cabo partiendo de otra solución madre de arsénico además que la cuantificación de arsénico se la realizó en distintos días.

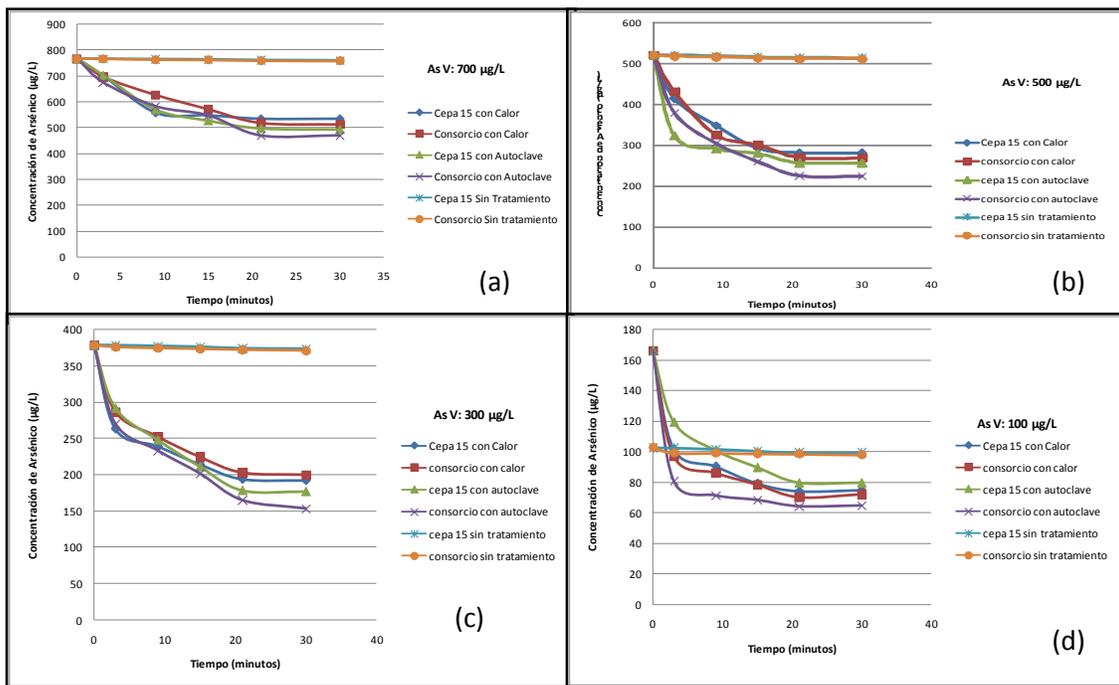


Figura 3.13: Presencia de Arsénico en el Agua durante los ensayos de adsorción con Cianobacterias a distintos intervalos de tiempo: (a) 700 µg/L, (b) 500 µg/L, (c) 300 µg/L (d) 100 µg/L.

Con los datos obtenidos de porcentajes de remoción y las concentraciones a diferentes intervalos de tiempo, es posible analizar estadísticamente los resultados, a continuación se presenta el Modelo estadístico 3-factorial utilizado para esta investigación.

3.3.3 Modelo 3 factorial dispuesto en un Diseño Completamente al Azar utilizando como variable dependiente el porcentaje de remoción de arsénico.

En el programa SPSS15 se obtuvieron los factores intersujetos (Anexo C) que muestran los factores del diseño, además de las etiquetas usadas en el programa para poder entender las tablas que se mostrarán posteriormente.

En la tabla 3.1, la media más alta es la del tratamiento 100 µg/L-autoclave-consorcio, con un porcentaje de 61.1 % de remoción de arsénico, mientras que el más bajo es el de 700 µg/L-sin tratamiento-cepa 15 con un porcentaje de remoción de 0.7633 %. Con los datos de las medias de los porcentajes de remoción de arsénico es posible identificar cual es el mejor tratamiento.

Para los datos que se agrupan en la tabla 3.1, la desviación típica muestra qué tan alejados están los datos de sus medias, las desviaciones típicas más altas son las del total para cada concentración, dado que dicho total es tomado a partir de todos los datos de su respectiva concentración y al ser datos muy dispersos se obtiene esa desviación típica.

El valor de N en la tabla 3.1 nos muestra la cantidad de datos utilizados para obtener la media y la desviación típica del tratamiento que se encuentre en cada fila.

Tabla 3.1: Estadísticos Descriptivos de las variables independientes con la media, desviación típica y el número de datos por cada nivel

Concentración de As, en µg/L	Pretratamiento de la Biomasa	Tipo de cianobacteria	Media	Desv. típ.	N
100	Calor	Cepa 15	54.91	0.98	3
		Consortio	56.73	0.86	3
		Total	55.82	1.29	6
	Autoclave	Cepa 15	51.88	1.00	3
		Consortio	61.10	0.80	3
		Total	56.49	5.11	6
	Sin tratamiento	Cepa 15	3.07	0.44	3
		Consortio	4.39	0.01	3
		Total	3.73	0.78	6
300	Calor	Cepa 15	49.24	0.38	3
		Consortio	47.28	0.98	3
		Total	48.26	1.27	6
	Autoclave	Cepa 15	53.38	0.54	3
		Consortio	59.46	0.38	3
		Total	56.42	3.36	6
	Sin tratamiento	Cepa 15	1.19	0.01	3
		Consortio	1.92	0.04	3
		Total	1.56	0.40	6
500	Calor	Cepa 15	44.41	0.15	3
		Consortio	48.39	0.22	3
		Total	46.40	2.18	6
	Autoclave	Cepa 15	43.31	0.12	3
		Consortio	56.96	0.05	3
		Total	50.14	7.48	6
	Sin tratamiento	Cepa 15	1.14	0.04	3
		Consortio	1.66	0.10	3
		Total	1.40	0.29	6
700	Calor	Cepa 15	30.21	0.58	3
		Consortio	33.13	0.34	3
		Total	31.67	1.66	6
	Autoclave	Cepa 15	29.92	0.07	3
		Consortio	38.85	0.14	3
		Total	34.39	4.89	6
	Sin tratamiento	Cepa 15	0.76	0.04	3
		Consortio	1.15	0.00	3
		Total	0.96	0.21	6
Total	Calor	Cepa 15	44.69	9.57	12
		Consortio	46.38	8.87	12
		Total	45.54	9.07	24
	Autoclave	Cepa 15	44.63	9.74	12
		Consortio	54.09	9.33	12
		Total	49.36	10.51	24
	Sin tratamiento	Cepa 15	1.54	0.96	12
		Consortio	2.28	1.31	12
		Total	1.91	1.18	24

3.3.3.1 Contraste de Levene de igualdad de varianza

Se contrasta la hipótesis nula de que la varianza (error de la variable dependiente) es igual a lo largo de todos los grupos, es decir que la varianza entre

las repeticiones realizadas para cada tratamiento, llamándose tratamientos a cada combinación de factores con sus niveles, es similar para todos los tratamientos o grupos. En la tabla 3.2 se indica que la significación es de $3.84152 \times 10^{-6} < 0.05$, por lo que se acepta la hipótesis nula que dice que todas las varianzas son iguales a lo largo de todos los grupos. Ahora una vez que se conoce que los datos son válidos para realizar el diseño factorial, se calcula el ANOVA (tabla 3.3).

Tabla 3.2: Contraste de Levene sobre la igualdad de las varianzas

F	gl1	gl2	Significación
4.6266038	23	48	3.84152E-06

3.3.3.2 Análisis de varianza del Modelo 3-factorial 4x3x2

En la tabla 3.3 del ANOVA, la fila del modelo corregido se refiere a todos los efectos del modelo tomados juntos, (el efecto de los tres factores, de las interacciones y de la constante o intersección); el estadístico F ($p=6.05 \times 10^{-77} < 0.05$) indica que el modelo utilizado explica una parte significativa de la variación observada en el porcentaje de remoción. El valor de R² (1) que se obtuvo dividiendo la suma de cuadrados del modelo corregido entre la suma de cuadrados Total corregida indica que los 7 efectos incluidos en el modelo están explicando el 100% de la varianza de la variable dependiente que en este caso es el porcentaje de remoción de arsénico; los 7 efectos incluidos en el modelo son:

1. Concentración inicial de arsénico
2. Tratamiento de la biomasa
3. Tipo de cianobacteria

4. Concentración inicial de arsénico x Tratamiento de la biomasa
5. Concentración inicial de arsénico x Tipo de Cianobacteria
6. Tratamiento de la biomasa x Tipo de Cianobacteria
7. Concentración inicial de arsénico x Tratamiento de la Biomasa x Tipo de cianobacteria.

Tabla 3.3: ANOVA para el experimento 3-factorial realizado con los porcentajes de remoción.

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	37806.95815	23	1643.780789	6980.948991	6.0585E-77
Intersección	74973.53645	1	74973.53645	318404.0336	2.1668E-93
Cianobacteria	283.22	1	283.22	1202.802945	1.2147E-35
Pretratamiento de Biomasa	33355.70566	2	16677.85283	70828.93331	5.2057E-84
Concentración de As	2695.667006	3	898.5556685	3816.063145	4.4145E-57
Cianobacteria * Pretratamiento de Biomasa	275.190825	2	137.5954125	584.3519783	2.02E-34
Cianobacteria * Concentración de As	44.52107778	3	14.84035926	63.02530829	1.1345E-16
Pretratamiento de Biomasa * Concentración de As	1122.261419	6	187.0435699	794.3526468	2.9711E-46
Cianobacteria * Pretratamiento Biomasa * Concentración de As	30.39216389	6	5.065360648	21.51200728	4.4091E-12
Error	11.3024	48	0.235466667		
Total	112791.797	72			
Total corregida	37818.26055	71			

Las filas donde se mencionan a los factores principales, es decir, los efectos individuales de los tres factores incluidos en el modelo, los niveles críticos (*Sig*) indican que los grupos contenidos en concentración de arsénico (100, 300, 500 y 700 $\mu\text{g/L}$) son significativamente distintos en su variable porcentaje de remoción. Así mismo para el factor tratamiento de la biomasa los niveles críticos muestran un valor de 5.20×10^{-84} el cual es menor a 0.05 indicando que los grupos que conforman el factor tratamiento de la biomasa (calor, autoclave y sin tratamiento) son significativamente distintos al medir el porcentaje de remoción de arsénico cuando son aplicados en el agua contaminada. De la misma forma con el factor tipo de cianobacteria, con un nivel crítico de $1.21 \times 10^{-35} < 0.05$ indica que los efectos de los grupos que contiene este factor (cepa 15 y consorcio) son

significativamente distintos al comparar sus porcentaje de remoción de arsénico en el agua.

Dentro de esta tabla del ANOVA se tienen en cuenta las interacciones entre los 3 factores ya mencionados anteriormente, el nivel crítico para la interacción Concentración inicial de arsénico x Tratamiento de la biomasa muestra un valor de $2.97 \times 10^{-46} < 0.05$ lo cual indica que la interacción posee un efecto significativo sobre el porcentaje de remoción de arsénico. Para la interacción Concentración inicial de arsénico x Tipo de Cianobacteria el nivel crítico mostrado es de $1.13 \times 10^{-16} < 0.05$ indicando que también esta interacción tiene un efecto significativo sobre el porcentaje de remoción de arsénico. Para las interacciones de Tratamiento de la biomasa x Tipo de Cianobacteria, Concentración inicial de arsénico x Tratamiento de la Biomasa x Tipo de cianobacteria también se muestran niveles críticos inferiores a 0.05 por lo que así mismo tienen un efecto significativo en el porcentaje de remoción de arsénico.

El error de 11.302 es un estimador insesgado de la varianza de las 24 poblaciones estudiadas, y no está por demás recalcar que dichas varianzas son iguales por la prueba de Levene realizada inicialmente.

En la tabla 3.4 se puede ver la media de porcentaje de remoción de arsénico para el tipo de cianobacteria solamente, el consorcio muestra un 30.25% de remoción de arsénico en toda la investigación, lo cual indica que es superior a la cepa 15 que cuenta con un porcentaje de remoción de 30.28%.

Tabla 3.4: Medias estimadas de porcentaje de remoción de arsénico para el tipo de cianobacteria utilizada.

Tipo de cianobacteria	Media	Error típ.	Intervalo de confianza al 95%.	
			Límite inferior	Límite superior
Cepa 15	30.29	0.08	30.12	30.45
Consortio	34.25	0.08	34.09	34.42

La tabla 3.5 nos indica las medias de los porcentajes de remoción de arsénico que produjo el pretratamiento dado a la biomasa, es decir existe una media para cada pretratamiento, donde el mejor es el autoclave con un 49.36% de remoción.

Tabla 3.5: Medias estimadas de porcentaje de remoción de arsénico para el tipo de tratamiento dado a la biomasa

Pretratamiento de la biomasa	Media	Error típ.	Intervalo de confianza al 95%.	
			Límite inferior	Límite superior
Calor	45.54	0.099	45.34	45.74
Autoclave	49.36	0.099	49.16	49.56
Sin tratamiento	1.91	0.099	1.71	2.11

Para cada concentración inicial de arsénico, también es posible obtener medias de porcentaje de remoción, en la tabla 3.6 se muestran dichas medias donde la mejor es la de 100 µg/L con una media de porcentaje de remoción de 38.45.

Tabla 3.6: Medias estimadas de porcentaje de remoción de arsénico para la concentración inicial de arsénico.

Concentración de As, en µg/L	Media	Error típ.	Intervalo de confianza al 95%.	
			Límite inferior	Límite superior
100	38.68	0.11	38.45	38.91
300	35.41	0.11	35.18	35.64
500	32.65	0.11	32.42	32.88
700	22.34	0.11	22.11	22.57

Después de contar con las medias de porcentajes de remoción de arsénico para los factores principales, también se presenta las interacciones de dichos factores y sus medias de porcentajes de remoción estimadas; en la tabla 3.7, se puede apreciar que la interacción consorcio autoclave tiene el mejor porcentaje de remoción de arsénico con 54.09%, pero también cabe destacar que el tratamiento con calor a 92°C cuenta con porcentajes de remoción un poco alejados de las medias de porcentajes de remoción de autoclave, por ejemplo el consorcio sometido a calor a 92°C tiene una media de 46.38%.

Tabla 3.7: Medias estimadas de porcentaje de remoción de arsénico para la interacción Tipo de cianobacteria x Tratamiento dado a la biomasa

Tipo de cianobacteria	Pretratamiento de la biomasa	Media	Error típ.	Intervalo de confianza al 95%.	
				Límite inferior	Límite superior
Cepa 15	Calor	44.693	0.14	44.412	44.975
	Autoclave	44.625	0.14	44.343	44.907
	Sin tratamiento	1.539	0.14	1.258	1.821
Consorcio	Calor	46.383	0.14	46.101	46.664
	Autoclave	54.094	0.14	53.813	54.376
	Sin tratamiento	2.281	0.14	1.999	2.562

En la tabla 3.8 se muestra la interacción Tipo de cianobacteria x Concentración inicial de arsénico en µg/L, donde siempre va a tener un más alto porcentaje de remoción el consorcio sometido a una concentración inicial de 100

µg/L, mientras que los porcentajes más bajos estarán en los que fueron sometidos a 700 µg/L como es el caso del consorcio y de la cepa 15 con medias de porcentajes de remoción de 24.38% y 20.30% respectivamente.

Tabla 3.8: Medias estimadas de porcentaje de remoción de arsénico para la interacción: Tipo de cianobacteria x Concentración inicial de arsénico en µg/L.

Tipo de cianobacteria	Concentración de As, en ug/L	Media	Error típ.	Intervalo de confianza al 95%.	
				Límite inferior	Límite superior
Cepa 15	100	36.621	0.161749692	36.29589156	36.94633066
	300	34.603	0.161749692	34.27811378	34.92855289
	500	29.621	0.161749692	29.29589156	29.94633066
	700	20.298	0.161749692	19.97255822	20.62299733
Consorcio	100	40.74	0.161749692	40.41478045	41.06521955
	300	36.221	0.161749692	35.89589156	36.54633066
	500	35.671	0.161749692	35.34589156	35.99633066
	700	24.378	0.161749692	24.05255822	24.70299733

En la interacción tratamiento dado a la biomasa x Concentración inicial de arsénico en µg/L, con datos anteriores ya conocemos que el mejor tratamiento es el autoclave en lo que tiene que ver al porcentaje de remoción de arsénico, por lo que a 100 µg/L con el autoclave se tiene la media más elevada del porcentaje de remoción de arsénico con 56.49% como se muestra en la tabla 3.9.

Tabla 3.9: Medias estimadas de porcentaje de remoción de arsénico para la interacción: Tratamiento dado a la biomasa x Concentración inicial de arsénico en µg/L.

Pretratamiento de la biomasa	Concentración de As, en ug/L	Media	Error típ.	Intervalo de confianza al 95%.	
				Límite inferior	Límite superior
Calor	100	55.82	0.1981	55.4217	56.2183
	300	48.262	0.1981	47.8634	48.6600
	500	46.402	0.1981	46.0034	46.8000
	700	31.668	0.1981	31.2700	32.0666
Autoclave	100	56.492	0.1981	56.0934	56.8900
	300	56.42	0.1981	56.0217	56.8183
	500	50.138	0.1981	49.7400	50.5366
	700	34.388	0.1981	33.9900	34.7866
Sin tratamiento	100	3.73	0.1981	3.3317	4.1283
	300	1.555	0.1981	1.1567	1.9533
	500	1.3983	0.1981	1.0000	1.7966
	700	0.9567	0.1981	0.5584	1.3550

Con la interacción triple, Pretratamiento de la biomasa x Concentración inicial de arsénico en $\mu\text{g/L}$ x Tipo de cianobacteria, es posible conocer qué interacción es la que presenta el más alto porcentaje de remoción. En este caso la interacción Consorcio-Autoclave-100 $\mu\text{g/L}$ con una media de porcentaje de remoción de arsénico de 61.1% como se indica en la tabla 3.10, además que la siguiente interacción es Consorcio-Autoclave-300 $\mu\text{g/L}$ con un porcentaje de remoción de 59.46%.

Tabla 3.10: Medias estimadas de porcentaje de remoción de arsénico para la interacción: Tratamiento dado a la biomasa x Concentración inicial de arsénico en $\mu\text{g/L}$ x Tipo de cianobacteria.

Tipo de cianobacteria	Tratamiento dado a la biomasa previo a los ensayos de	Concentración de As, en $\mu\text{g/L}$	Media	Error típ.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Cepa 15	Calor	100	54.91	0.28	54.35	55.47
		300	49.24	0.28	48.68	49.81
		500	44.41	0.28	43.85	44.98
		700	30.21	0.28	29.64	30.77
	Autoclave	100	51.88	0.28	51.32	52.45
		300	53.38	0.28	52.82	53.94
		500	43.31	0.28	42.75	43.88
		700	29.92	0.28	29.36	30.49
	Sin tratamiento	100	3.07	0.28	2.51	3.63
		300	1.19	0.28	0.62	1.75
		500	1.14	0.28	0.57	1.70
		700	0.76	0.28	0.20	1.33
Consorcio	Calor	100	56.73	0.28	56.17	57.29
		300	47.28	0.28	46.72	47.84
		500	48.39	0.28	47.83	48.95
		700	33.13	0.28	32.57	33.69
	Autoclave	100	61.10	0.28	60.54	61.66
		300	59.46	0.28	58.90	60.02
		500	56.96	0.28	56.40	57.53
		700	38.85	0.28	38.29	39.42
	Sin tratamiento	100	4.39	0.28	3.83	4.95
		300	1.92	0.28	1.36	2.49
		500	1.66	0.28	1.10	2.22
		700	1.15	0.28	0.59	1.71

Al haber encontrado que todos los estadísticos F correspondientes a los efectos principales resultan significativos, es importante realizar comparaciones a posteriori, con el fin de conocer qué media específica difiere de otra. Para ello se realizó la prueba de Tukey con 5% de confianza. En la tabla 3.11 se muestran los resultados de la similitud de medias para el factor tratamiento dado a la biomasa,

en el cual ninguna media se parece a otra, cada media se encuentra en un subconjunto distinto.

Tabla 3.11: Prueba de Tukey para similitud de medias del factor Pretratamiento de la Biomasa

DHS de Tukey				
	N	Subconjunto		
		1	2	3
Sin tratamiento	24	1.91		
Calor	24		45.54	
Autoclave	24			49.36

Para el factor concentración inicial de arsénico también se realizaron las pruebas de similitud de medias de Tukey, en la tabla 3.12 se puede observar que de acuerdo al porcentaje de remoción ninguna concentración inicial es similar a otra, todas han tenido un porcentaje de remoción distinto.

Tabla 3.12: Prueba de Tukey para similitud de medias del factor Concentración inicial de Arsénico.

DHS de Tukey					
	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
700	18	22.34			
500	18		32.65		
300	18			35.41	
100	18				38.68

Las interacciones entre los distintos factores son presentadas a continuación mediante gráficos de perfil. Para la interacción entre calor-100 $\mu\text{g/L}$ se puede observar la media más alta en la figura 3.14, en la misma figura la interacción sin tratamiento-700 $\mu\text{g/L}$ tiene la media marginal más baja, todo se refiere a porcentajes de remoción como variable dependiente. Según la figura 3.35, la interacción calor-100 $\mu\text{g/L}$ y la interacción autoclave 100 $\mu\text{g/L}$ tienen una media marginal muy parecida.

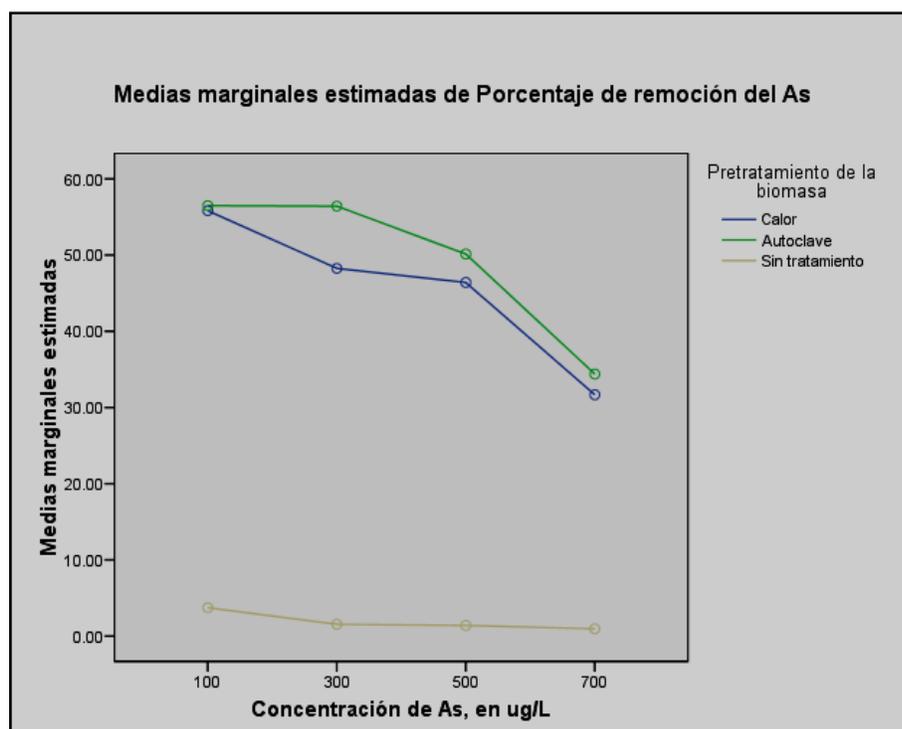


Figura 3.14: Gráfico de perfil para la interacción Pretratamiento de la biomasa x Concentración inicial de As.

En el gráfico de perfil 3.15, el consorcio sometido a 100 $\mu\text{g/L}$ de arsénico tiene la media marginal más alta, mientras que la media marginal más baja la tiene la cepa 15 sometida a 700 $\mu\text{g/L}$ de arsénico.

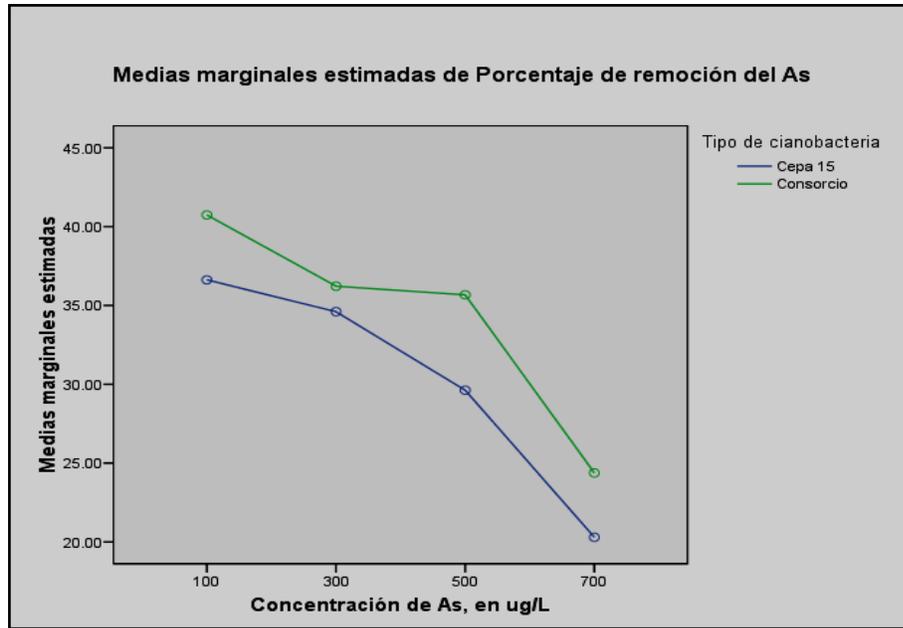


Figura 3.15: Gráfico de perfil para la interacción Tipo de Cianobacteria x Concentración inicial de As.

Existe una tercera interacción que es Tipo de cianobacteria x Pretratamiento de la biomasa, en el gráfico 3.16 en el eje de las x se encuentran los pretratamientos que se le realizó a la biomasa previo a los ensayos, y las series son el tipo de cianobacteria. Cuando no fueron sometidas a ningún tratamiento, las cianobacterias tanto de la cepa 15 como del consorcio tienen unas medias marginales bastante bajas, se podría decir que parecidas, pero ya anteriormente mediante las pruebas a posteriori se constató que ninguna media se parecía a ninguna otra. De igual manera en el mismo gráfico 3.16 se aprecia que la interacción autoclave-consorcio tiene la media marginal más grande, seguida de la cepa 15 también sometida al pretratamiento del autoclave.

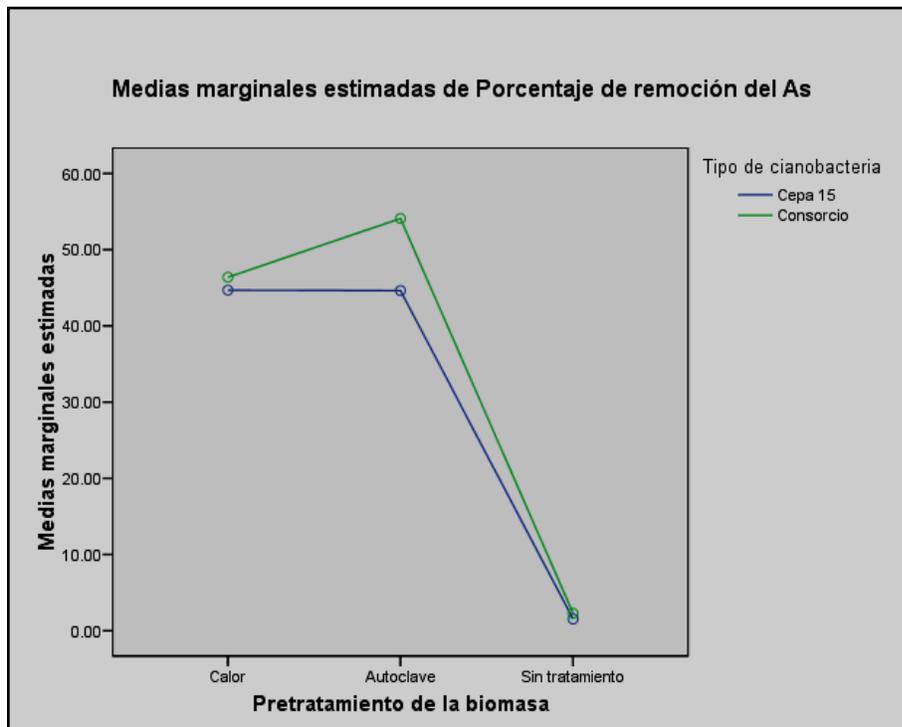


Figura 3.16: Gráfico de perfil para la interacción Tipo de Cianobacteria x Pretratamiento de la biomasa

3.3.4 Isotermas de adsorción para arsénico V con cianobacterias

Para cada tratamiento se tuvieron distintas isotermas de adsorción, es importante que dichas isotermas sean realizadas para cada tratamiento dado que en el caso de que alguno de ellos sea efectivo, pueda ser utilizado posteriormente en otras investigaciones a escala mucho más grande.

En la figura 3.17a se muestra la isoterma de adsorción lineal cuando es utilizada en los ensayos de remoción la cepa 15 tratada con calor, la curva tiende a hacerse lineal. La isoterma de Langmuir es la linealización de los datos obtenidos para q y C_e , en la figura 3.17b ésta isoterma de Langmuir para la cepa

15 tratada con calor a 92°C, presenta un R^2 de 0.9774, mucho más alto que el R^2 de la isoterma de Freundlich (figura 3.17c) que es de 0.869, es por ello que los cálculos de Q_{max} se realizan de acuerdo a la isoterma de Langmuir que es la que más se ajusta a los datos obtenidos en el ensayo; se obtuvo un Q_{max} de 101.83 $\mu\text{gAs/gCianobacteria}$ que adsorbe la Cepa 15 tratada con Calor a 92°C.

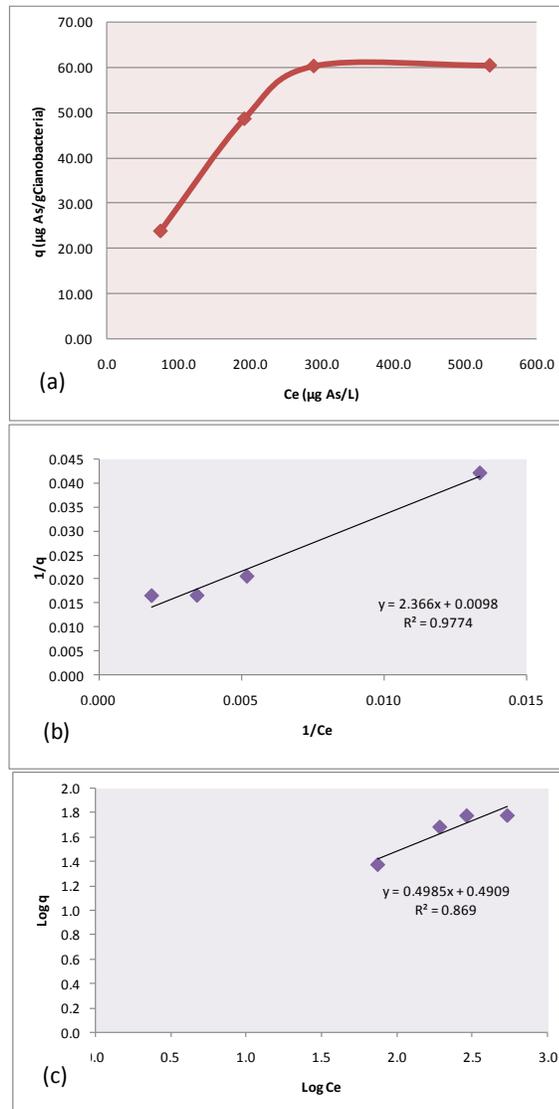


Figura 3.17: Isothermas de adsorción en la cepa 15 tratada con calor a 92°C: (a) Isotherma de adsorción (b) Isotherma de Langmuir. (c) Isotherma de Freundlich.

Para el consorcio tratado con calor a 92°C se presentan los valores de q en la figura 3.18a, donde cumple con la condición de que cuando las concentraciones iniciales de arsénico van aumentando, la curva se empieza a hacer lineal. La isoterma de Langmuir en la figura 3.18b tiene un R^2 de 0.9802, mucho más alto que el de la isoterma de Freundlich en la figura 3.18c con un R^2 de 0.9001, por lo que Q_{max} calculado a partir de la isoterma de Langmuir es de 107.62 $\mu\text{gAs/gCianobacteria}$.

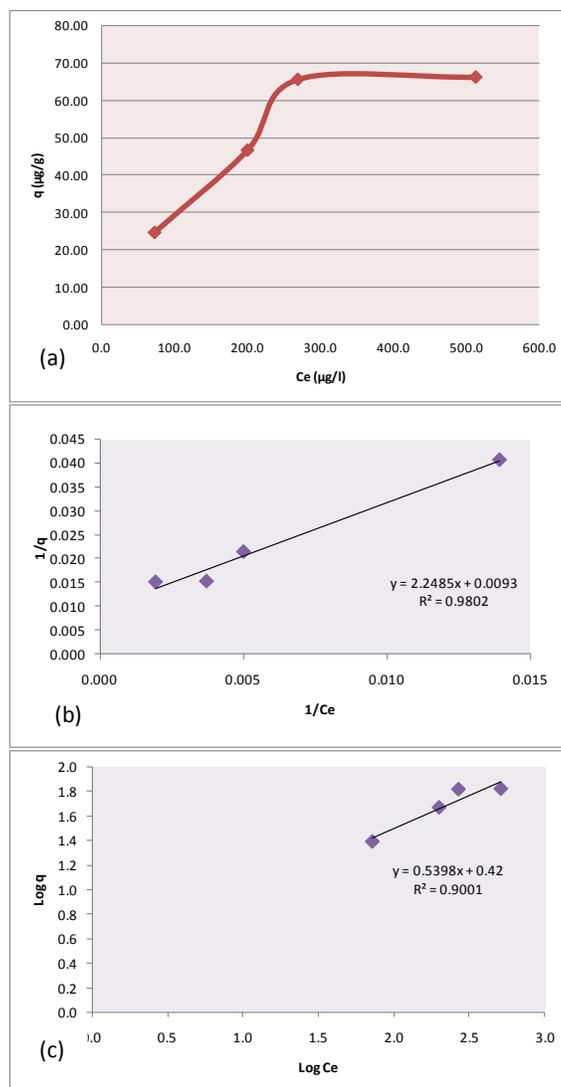


Figura 3.18: Isothermas de adsorción en el consorcio tratado con calor a 92°C: (a) Isotherma de adsorción (b) Isotherma de Langmuir. (c) Isotherma de Freundlich.

Para la cepa 15 tratada con autoclave en la isoterma de adsorción de la figura 3.19a el valor de q se vuelve constante mientras la concentración inicial de arsénico aumenta, la isoterma que se ajusta mejor es la de Langmuir de la figura 3.19b con un R^2 de 0.9299 en comparación con el R^2 de Freundlich de la figura 3.19c que es de 0.7772, por lo que el Q_{max} es de $123.66 \mu\text{gAs/gCianobacteria}$.

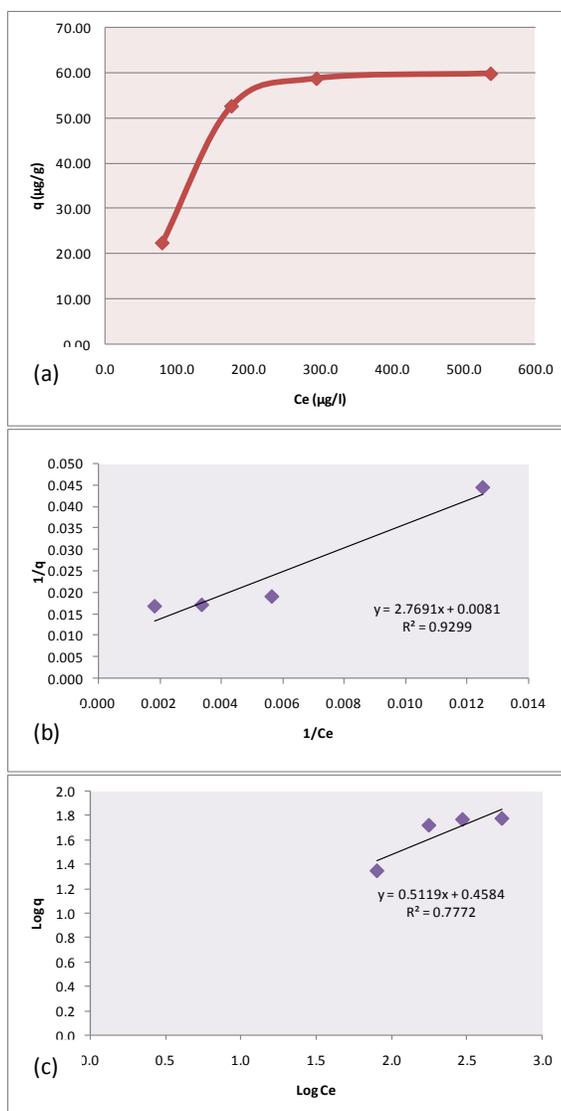


Figura 3.19: Isothermas de adsorción en la cepa 15 tratada con autoclave a 121°C y 15 psi de presión: (a) Isotherma de adsorción (b) Isotherma de Langmuir. (c) Isotherma de Freundlich.

Con el consorcio tratado con autoclave, la isoterma de la figura 3.20a tiende a ser lineal, la isoterma que mejor se ajusto fue la de Langmuir de la figura 3.20b con un R^2 de 0.964, para la isoterma de Freundlich de la figura 3.20c el R^2 es de 0.8292. Entonces el Q_{max} calculado a partir de Langmuir es de 171.59 $\mu\text{gAs/gCianobacteria}$, este es el Q_{max} más alto encontrado en esta investigación.

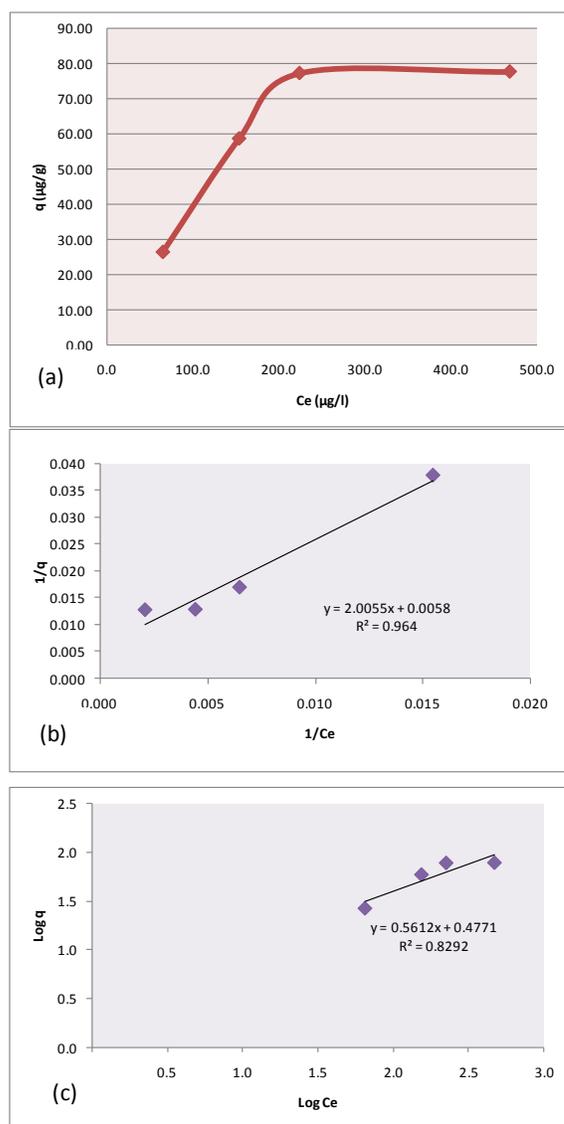


Figura 3.20: Isothermas de adsorción en el consorcio tratado con autoclave a 121°C y 15 psi de presión: (a) Isotherma de adsorción (b) Isotherma de Langmuir. (c) Isotherma de Freundlich.

Con la cepa 15 sin tratamiento, la variación de la concentración partiendo de la inicial es mínima, por lo que la isoterma lineal de la figura 3.21a se encuentra a una escala pequeña, la isoterma de Langmuir de la figura 3.21b indica un R^2 de 0.9389, mucho más alto que el de la isoterma de Freundlich de la figura 3.21c con un R^2 de 0.9101, por lo tanto Q_{max} calculada a partir de Langmuir es de 1.69 $\mu\text{gAs/gCianobacteria}$.

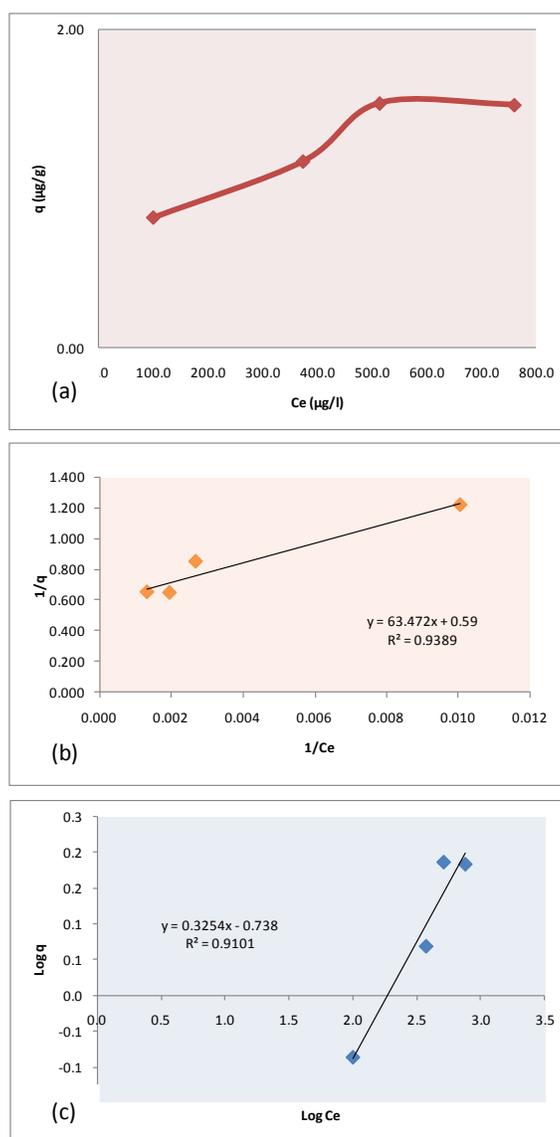


Figura 3.21: Isothermas de adsorción en la cepa 15 sin tratamiento: (a) Isotherma de adsorción (b) Isotherma de Langmuir. (c) Isotherma de Freundlich.

El consorcio sin tratamiento en la figura 3.22a indica que el Q_{max} no va a ser tan alto por la pequeña escala del gráfico, para la isoterma de Langmuir de la figura 3.22b presenta un R^2 de 0.9903 en comparación con el R^2 de la isoterma de Freundlich de la figura 3.22c con un R^2 de 0.9761, por lo tanto el Q_{max} calculado a partir de la isoterma de Langmuir es de $2.66 \mu\text{gAs/gCianobacteria}$.

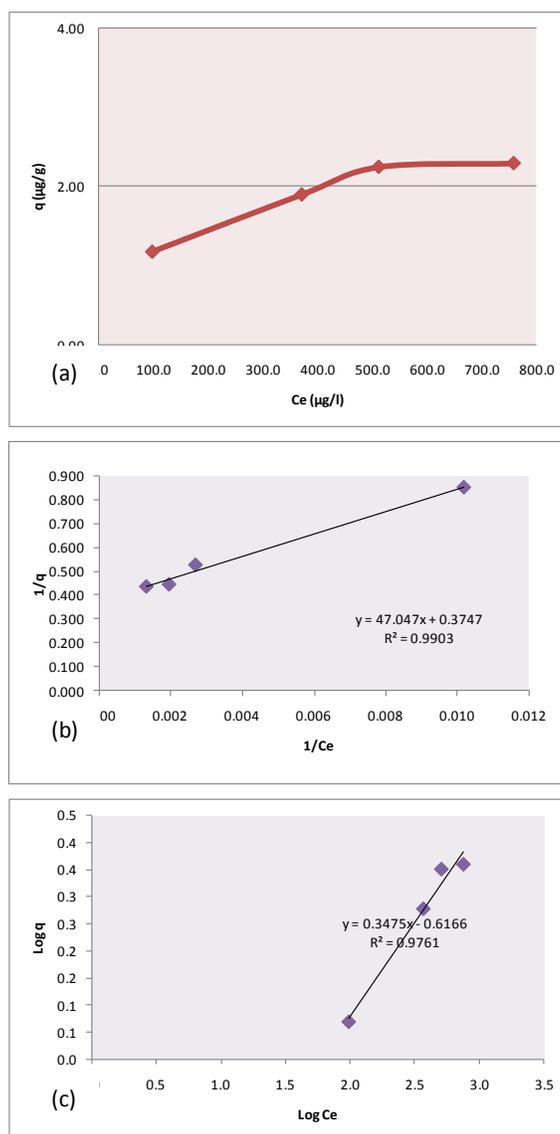


Figura 3.22: Isothermas de adsorción en el consorcio sin tratamiento: (a) Isotherma de adsorción (b) Isotherma de Langmuir. (c) Isotherma de Freundlich.

Finalmente los Qmax de adsorción para arsénico para todos los tratamientos del modelo factorial se encuentran en el Anexo D.

3.4 Análisis de toxicidad aguda con *Daphnia pulex*

Las pulgas sobrevivieron al cambio de tipo de agua natural a agua sintética, y también fue posible alimentarlas con *Spirulina*. Las pulgas fueron alimentadas con *Spirulina*, en la figura 3.23 se observa una *Daphnia pulex* recién alimentada, se aprecia su tracto digestivo lleno de *Spirulina*.

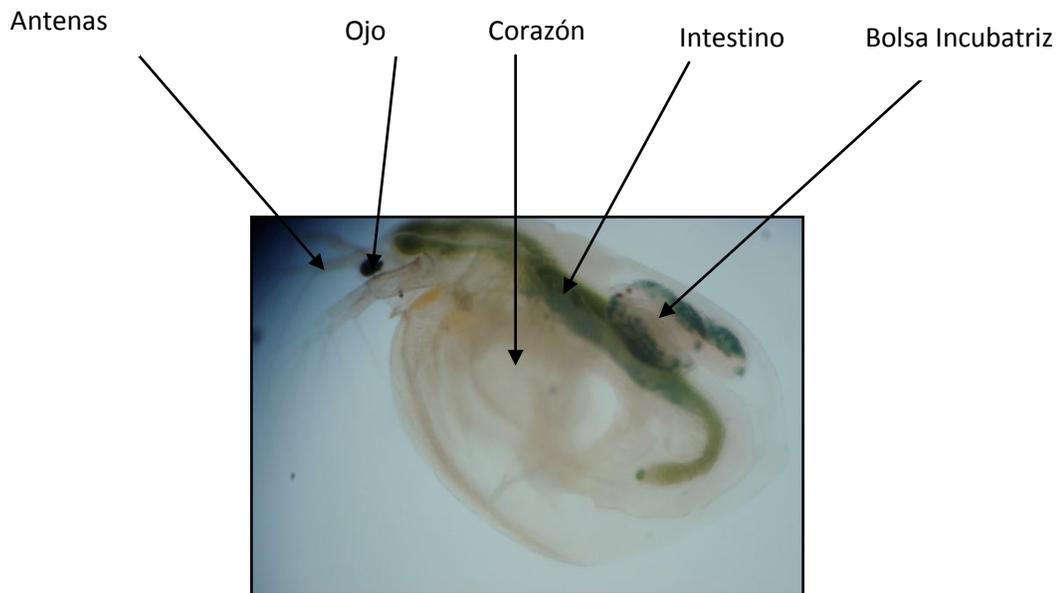


Figura 3.23: *Daphnia pulex* observada al estereomicroscopio (Espíndola, 2009).

3.4.1 Análisis de sensibilidad de *Daphnia pulex*

El análisis de sensibilidad fue realizado con dicromato de potasio, en cajas petri con 25 mL de la muestra diluida como se muestra en la figura 3.24.



Figura 3.24: Ensayos de Toxicidad y sensibilidad realizados en cajas petri de 25mL con 10 *Daphnias* por cada caja

Mediante el análisis Finney se procedieron a analizar los datos obtenidos, en el programa StatPlus2007 con Probit, se utilizó el método Finney por ser mucho más exacto. En la tabla 3.13, se presentan los cálculos realizados para poder obtener las dosis letales a distintas cantidades de poblaciones de pulgas, en este caso se presentan las LD50: 0.604634 mg de Dicromato de Potasio/L, también el LD100: 6.413 mg de Dicromato de Potasio/L que quiere decir que con una concentración de 6.413 mg de Dicromato de Potasio/L se puede matar al 100% de las pulgas exponiéndolas durante 48 h.

Tabla 3.13: Percentiles de Dosis del Dicromato de Potasio (Estímulo)

Percentil de Dosis (Estímulo)					
Percentil	Probit (Y)	Log10[Dosis (Estímulo)]	Estándar	Dosis (Estímulo)	rror Estándar
1	2.673214667	-2.241613741	0.55461272	0.005733057	0.009480067
5	3.35478856	-1.648995007	0.40570245	0.022439077	0.024146375
10	3.718271243	-1.332952021	0.33431278	0.04645666	0.039399561
20	4.158543283	-0.95014179	0.26382638	0.112165219	0.072407356
25	4.32581086	-0.804705028	0.24465395	0.156781556	0.093066869
30	4.47599813	-0.674119349	0.23247229	0.211777907	0.11885375
40	4.747066732	-0.438429083	0.22493823	0.364393748	0.19728613
50	5	-0.21850723	0.23570652	0.604634286	0.344505006
60	5.252933268	0.001414623	0.26155478	1.0032626	0.64141089
70	5.52400187	0.237104889	0.30157586	1.72625476	1.297404235
75	5.67418914	0.367690568	0.32762423	2.331796083	1.930724407
80	5.841456717	0.51312733	0.35898027	3.25932468	3.011537377
90	6.281728757	0.895937561	0.44948323	7.869326431	9.678466883
95	6.64521144	1.211980547	0.52958865	16.29223054	25.17013619
99	7.326785333	1.804599281	0.68663463	63.76748394	148.3939344
Log10[LD50]	-0.21850723	Log10[LD16]	-1.0879929	Log10[LD84]	0.650978443
LD50	0.604634286	LD16	0.08165957	Beta	1.150105207
Error Estándar LD50	0.344505006	LD84	4.47691082	Alfa	5.251306303
LD50 LCL	0.240829704	LD100	6.41304909	Error Estándar Beta	0.262689011
LD50 UCL	2.021527237	Nivel de Significación	0.05		

En el gráfico 3.25 se indica la regresión lineal con el Log10 de la dosis y el porcentaje de respuesta de las pulgas, este gráfico ayuda a encontrar los percentiles que se muestran en la tabla 3.17, mientras más se asemejen los puntos a una curva lineal el análisis de supervivencia será de mucha mejor calidad.

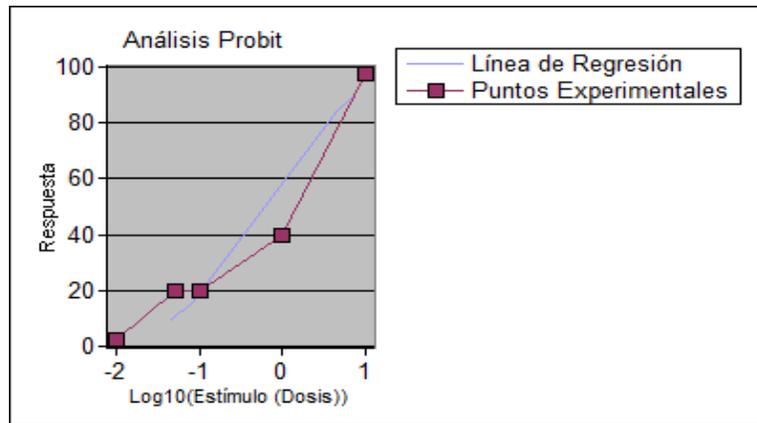


Figura 3.25: Gráfico del Análisis Probit para el Dicromato de Potasio con la regresión Log normal.

3.4.2 Análisis de toxicidad con *Daphnia pulex* para el agua tratada con cianobacterias.

Las pulgas que fueron mantenidas durante 48 h en las diluciones de 100%, 50%, 25%, 12.5% y 6.25% del agua tratada con cianobacterias no murieron en ninguna concentración, por lo que no fue posible calcular la DL50 con estos datos. Cuando ninguna *Daphnia* muere se puede verificar que no existe toxicidad para ellas por parte de las cianobacterias (Tabla 3.14).

Tabla 3.14: Cantidad de pulgas muertas a distintas concentraciones del agua tratada con cianobacterias.

PRUEBAS DE TOXICIDAD CON <i>Daphnia pulex</i> CON RETENCIÓN DE 48 HORAS											
	CEPA 15					CONSORCIO					
	6.25%	12.50%	25%	50%	100%	6.25%	12.50%	25%	50%	100%	BLANCO
REPLICA 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
REPLICA 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
REPLICA 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PROMEDIO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Los organismos empleados para los ensayos deben tener alta sensibilidad a los tóxicos, en este caso las *Daphnia*, ya que al establecer las concentraciones seguras para ellos se espera proteger a todo el ecosistema.

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

4.1 Manejo de cianobacterias a partir de cultivos axénicos y en consorcios

4.1.1 Cultivo de cianobacterias en reactores continuos

El lento crecimiento cianobacteriano al iniciar los cultivos a partir de cajas petri se debió a que la cantidad de inóculo inicial en el medio líquido fue muy poco, pero todo aquello fue compensado por el fotoperiodo luz-oscuridad 16/8, según Rosales, N. Briceño, B y Morales, E. (2003), al aumentar el tiempo o la cantidad de irradiancia, las cianobacterias crecen más rápidamente, en aquella investigación se trató con *Synechocystis minuscula*, afirmación que se confirmó en esta investigación, dado que posteriormente la obtención de biomasa aumentó porque existía 1000 luxes de irradiancia y el fotoperiodo mencionado anteriormente. Es importante tomar en cuenta que al realizar el raspado de las cajas petri las células se encontraban formando flóculos lo cual también impidió que el cultivo aumente rápidamente.

Se debe tomar en cuenta que para poder producir biomasa en grandes proporciones se debe tener un inóculo inicial bastante concentrado con el fin de no perder mucho tiempo en su replicación

4.1.2 Morfología de las cianobacterias utilizadas en los ensayos de remoción de arsénico

La morfología con la que cuentan las cianobacterias es importantísima al momento de querer realizar la adsorción del arsénico en ellas, según Leiva, 2003 cuando se va a llevar a cabo una adsorción es necesario que exista exposición de

grupos funcionales o poros en el adsorbente para que se lleve a cabo el fenómeno, es por ello que mientras mayor cantidad de área superficial exista en la cianobacteria para que se dé el contacto arsénico-cianobacteria la adsorción se dará de mejor manera y en mayor cantidad. En la figura 3.3 en la parte d se aprecia la forma que tuvo la cianobacteria de la cepa 15 al momento de ser cosechada, esa morfología redondeada pudo haber permitido la poca adsorción que se dio en esa cepa, pero cuando se la lisó la adsorción mejoró notablemente, dado que la cianobacteria se desplegó, además que la pared celular se rompió abriéndose y exponiendo tanto poros como grupos funcionales positivos que atrapen al arsénico V presente en el medio. En la figura 3.4 el consorcio también tuvo dicha morfología redondeada, pero al final cuando se lisó la célula expuso mayor cantidad de poros y grupos funcionales que la cepa 15 permitiendo una remoción de arsénico más alta en el medio acuoso. Es decir mientras más pared celular expuesta, más arsénico se adsorbe como se muestra en la figura 4.1, cuando la pared celular se satura el arsénico ya no tiene donde adsorberse. Los organelos de las cianobacterias aportan en la adsorción de arsénico cuando la célula esta lisada, pero su aporte no es significativo cuando las cianobacterias no han sido sometidas a ningún tratamiento como calor o autoclave para que la célula se lise. En el consorcio también existen otras bacterias que ayudan a remover el arsénico dado que también cuentan con la capa de peptidoglicano y sus organelos internos que también aportaran con grupos funcionales.

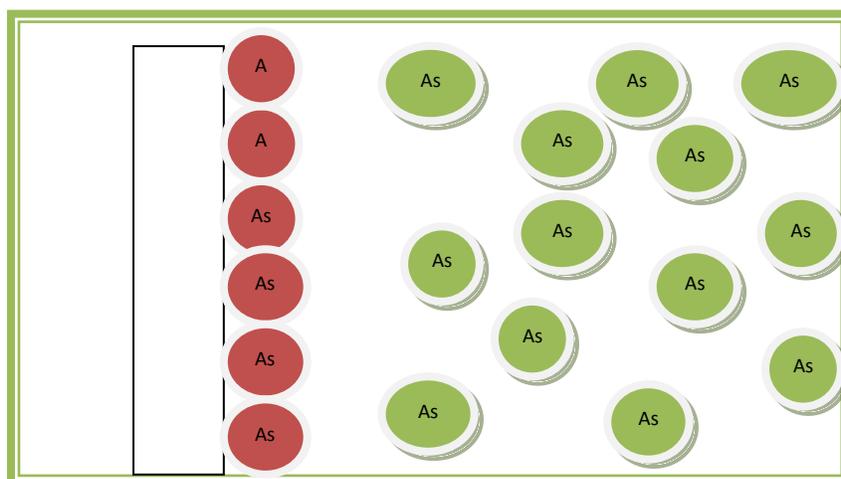


Figura 4.1: Fenómeno de Adsorción de Arsénico sobre la pared celular cianobacteriana lisada (Espíndola, 2009).

Si la cianobacteria se encuentra enrollada como se muestra en la figura 4.2, es mucho más difícil que el arsénico pueda adsorberse, dado que los grupos funcionales o microporos son escasos, entonces la adsorción del arsénico se da en un menor porcentaje y gran cantidad quedará aún disponible en el agua.

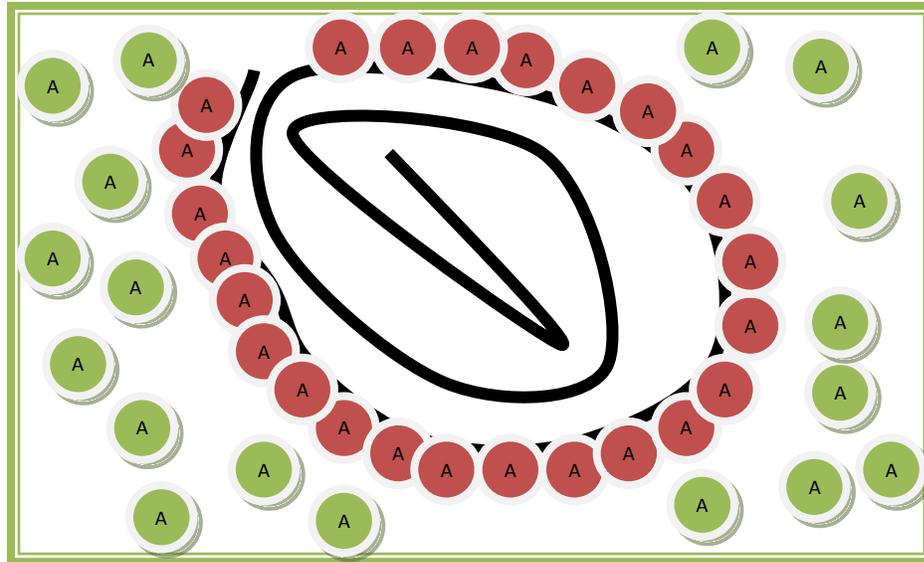


Figura 4.2: Fenómeno de adsorción del arsénico sobre la pared celular cianobacteriana no lisada (Espíndola, 2009).

Otras bacterias que también estuvieron presentes en el consorcio, cuando no fueron sometidas a ningún tratamiento mantuvieron solo el exterior de su pared celular expuesta, sin permitir que el arsénico tome contacto con el interior y sus organelos, evitando que el porcentaje de adsorción aumente.

4.1.3 Cosecha de la biomasa

La cosecha de la biomasa se la realizó en tubos falcon de 50 mL bien tapados con el fin de que no exista ninguna contaminación externa que altere la

capacidad de adsorción de las cianobacterias, en la investigación realizada por Ferrari *et al*, 2004 cuando se exponen cianobacterias tratadas en autoclave a 121°C por 20 min al metal cadmio la remoción de éste mejora significativamente, pero también se toma en cuenta que no haya contaminación externa utilizando agua destilada estéril para los enjuagues de la biomasa antes de utilizar en los ensayos de adsorción.

Durante la cosecha de la biomasa se debe tomar en cuenta que a pequeña escala es de gran ayuda la centrífuga de tubos falcon de 50 mL, pero que si se deseara cosechar biomasa en mayor cantidad es necesario utilizar otros métodos como cedazos gigantes. Es importante que todo se lo haga en condiciones asépticas, los tubos falcon estuvieron estériles y siempre que la biomasa fue enjuagada fue con agua destilada estéril, con el fin de evitar que exista contaminación por bacterias que podrían alterar la capacidad de adsorción, aumentándola o disminuyéndola.

4.2 Evaluación de la remoción de arsénico en los distintos tratamientos

4.2.1 Tratamiento con calor a 92°C

En los resultados se obtuvo que el Q_{max} para la cepa 15 fue de 101.83 $\mu\text{gAs/gCianobacteria}$, mientras que para el consorcio fue de 107.62 $\mu\text{gAs/gCianobacteria}$, esta cantidad de arsénico adsorbido se da porque el calor a 92°C no permite una lisis completa de la célula, evitando que grupos funcionales positivos como aminos primarios y secundarios en la estructura del péptidoglicano queden expuestos. En la investigación de Ferrari *et al*, 2004 se realizó un tratamiento a la biomasa con calor a 80 °C en estufa, aquel tratamiento permitió una remoción de cadmio mucho menor que la remoción causada por la biomasa sometida a autoclave durante 20 min. De la misma manera en esta investigación la biomasa tratada con calor a 92°C presenta una remoción mucho menor a la que

fue tratada con autoclave, en el caso de Ferrari, al partir de una concentración de 10 mg/L el porcentaje de remoción es del 60% cuando la biomasa es tratada con estufa a 80°C, mientras que con el arsénico al partir de 100 µg/L se obtuvo una remoción del 56%.

4.2.2 Tratamiento con autoclave a 121°C y 15 psi de presión

Este tratamiento arrojó los mejores resultados tanto para el consorcio como para la cepa 15, el Qmax para la cepa 15 fue de 123.66 µgAs/g Cianobacteria y para el consorcio fue de 171.59 µgAs/g Cianobacteria (Anexo D), a 121°C existe una lisis completa de las células permitiendo la total exposición de grupos funcionales. Ferrari *et al*, (2004) utilizó el mismo tratamiento para la remoción de cadmio con cianobacterias, removiendo casi el 80% del cadmio presente en el agua a tratarse, mientras que en esta investigación se logró remover hasta el 61.1% del arsénico partiendo de una concentración de 100 µg/L. En la investigación de Cumbal *et al*, (2006) el Qmax de adsorción obtenido para el quitosano impregnado de partículas de óxidos de hierro fue de 666.7 µAs/g quitosano, lo cual indica una capacidad bastante alta de adsorción, exactamente 3.88 veces más que el consorcio de cianobacterias tratadas con el autoclave. Según Álvarez, 2003 en su investigación de adsorción de arsénico en suelos de cultivo de Castilla y León, España, el suelo que mejor adsorción de arsénico tuvo fue el arcilloso, con 9,23 µg/g de suelo lo cual indica que las cianobacterias adsorben gran cantidad de arsénico en comparación con estos suelos, es importante tomar en cuenta que lo que se pretendía probar era si el arsénico puede quedarse retenido en aquellos suelos destinados para cultivo y la retención fue mínima.

4.2.3 Biomasa sin tratamiento

La remoción de arsénico que se obtuvo con la biomasa sin tratamiento fue baja, al tener porcentajes inferiores a 5% de remoción. Con Ferrari *et al*, 2004 la biomasa que no fue sometida a ningún tratamiento también obtuvo los porcentajes y Q_{max} de remoción más bajos, pues en este caso la lisis de la célula no permitió la exposición de mayor cantidad de grupos funcionales, todas se quedaron de forma enrollada por lo que la interacción cianobacteria-arsénico se dio solo con el exterior de la célula como se puede ver en la figura 4.2.

Finalmente los distintos porcentajes de remoción se deben a que las cianobacterias fueron sometidas a distintos tratamientos que alteraron su capacidad de adsorción, pero presumiblemente los grupos funcionales de adsorción se encuentran en la pared celular, de la cual una gran parte está formando el peptidoglicano, donde encontramos aminas secundarias con carga positiva, un ejemplo de amina secundaria se puede apreciar en la figura 4.3 parte c, además de otras aminas que también tienen carga positiva.

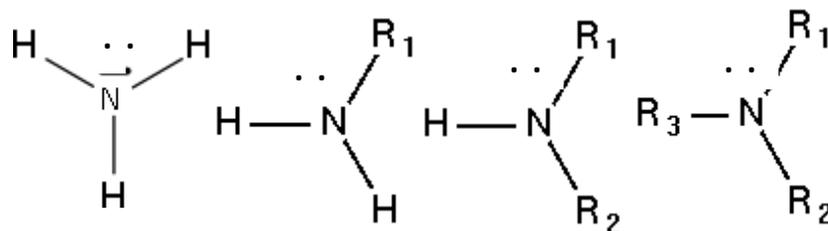


Figura 4.3: Aminas (a) Amoníaco; (b) amina primaria; (c) amina secundaria; (d) amina terciaria.

El arsénico a pH 7.1 está en la forma de $HAsO_4^{2-}$ por lo que puede fácilmente tener una atracción electrostática con las aminas secundarias presentes en la pared de peptidoglicano como se puede observar en la figura 4.2.

En el trabajo propuesto por Cumbal *et al*, 2006 los grupos aminos del quitosano ligan electrostáticamente los arseniatos presentes en el agua, pero la mayor parte son ligados por los óxidos de hierro.

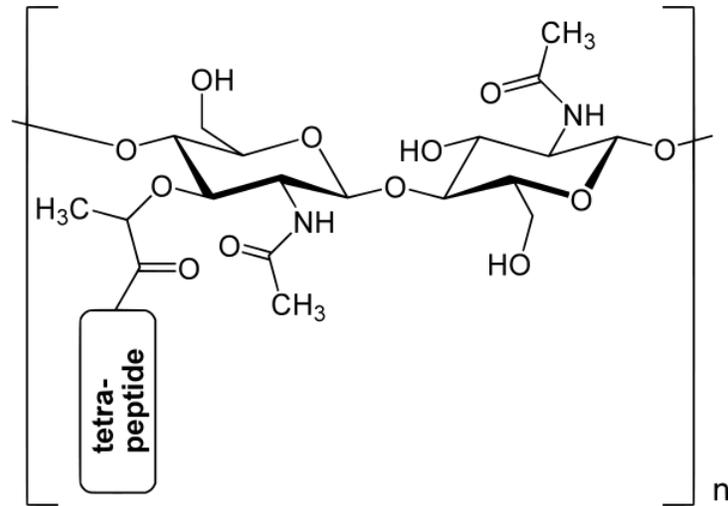


Figura 4.4: Estructura del peptidoglicano

Cuando se grafican las isotermas de adsorción, la isoterma principal se empieza a hacer constante en q cuando los grupos funcionales positivos de las cianobacterias se comienzan a saturar, y se paró el ensayo.

4.2.4 Modelo 3-Factorial dispuesto en un Diseño Completamente al Azar utilizando como variable dependiente el porcentaje de remoción de arsénico

El contraste de Levene sobre igualdad de varianzas al mostrar una significancia menor a 0.05 nos indica que existe igualdad de varianzas en todos los grupos a estudiarse por lo que es posible utilizar el método factorial propuesto.

En la tabla 3.8 el modelo corregido nos indica que el modelo utilizado explica una parte significativa de los datos, lo cual es sumamente importante, dado que así se puede reafirmar que el modelo factorial usado brindará resultados sumamente confiables en los análisis posteriores, además el R^2 de 1 obtenido indica que los efectos de los factores y de las interacciones de dichos factores explican el 100% de la varianza del porcentaje de remoción de arsénico, quiere decir que no existen factores externos que puedan variar el porcentaje de remoción de arsénico, sino que toda esa variación del porcentaje de remoción depende de los tratamiento utilizados.

Los porcentajes de remoción de arsénico obtenidos muestran que la remoción va disminuyendo conforme la concentración inicial de arsénico va aumentando. De acuerdo a las isotermas de adsorción, existe un punto en el cual todos los sitios activos para arsénico se saturan, por lo que ya a elevadas concentraciones de arsénico en el medio, las cianobacterias ya no adsorberán más el metaloide, es por ello que al partir de una concentración inicial de 100 $\mu\text{g/L}$ de arsénico el porcentaje de remoción es mucho más elevado que al partir de 700 $\mu\text{g/L}$. Partiendo de 100 $\mu\text{g/L}$ aún quedan sitios disponibles para adsorber arsénico, pero la disponibilidad del mismo disminuye al adsorberse, es por eso que ya no baja más la concentración de arsénico en el agua.

El hecho de que los factores interactúen permite que exista un mejor porcentaje de remoción, finalmente la mejor interacción es consorcio-autoclave, el consorcio por la diversidad de cianobacterias y otras bacterias que lo conforman mientras que el autoclave porque permite una mejor lisis celular consintiendo una mayor exposición de aminos secundarias que se encuentran en la capa de peptidoglicano principalmente. La interacción cepa15-autoclave también adsorbe un mayor porcentaje de arsénico debido al autoclave. En el consorcio al contar

con otras bacterias hay una mayor aportación de grupos funcionales con los que pueden contar ellas y que permite un mayor porcentaje de remoción de arsénico.

En la interacción tipo de cianobacteria-concentración inicial de arsénico la mejor media es la de la interacción consorcio-100 $\mu\text{g/L}$, el consorcio porque siempre va a tener mayor cantidad de grupos funcionales disponibles dado que existe variedad de cianobacterias y otras bacterias mientras que 100 $\mu\text{g/L}$ por ser la concentración más baja y existen muchos grupos funcionales libres aún para cuando se termina el ensayo, pero por la disponibilidad del arsénico en el medio, no se pueden adsorber completamente.

Cuando se da la interacción triple, la que mejor porcentaje de remoción mostró fue la de consorcio-autoclave-100 $\mu\text{g/L}$, consolidando todo lo discutido anteriormente en cuanto al consorcio, autoclave y concentración de partida de 100 $\mu\text{g/L}$.

El porcentaje de remoción va disminuyendo conforme la concentración inicial de arsénico aumenta debido a que gran cantidad de grupos funcionales ya se encuentran ocupados o tal vez ya saturados por lo que ya no se puede adsorber mayor porcentaje de Arsénico.

Los datos obtenidos son válidos en cuanto a adsorción ya que el tiempo que se expusieron las cianobacterias al arsénico fue de 30 min, tiempo en que la adsorción es el único fenómeno que puede llegar a darse con mayor rapidez, mientras que bioabsorción, cuando las cianobacterias no fueron tratadas también pudo haber ocurrido, pero para darse la bioabsorción primeramente debió haber existido la adsorción en la pared celular y para ello se necesita de grupos

funcionales que mantengan el tiempo suficiente a la molécula de arsénico pegada a la pared celular para que por algún mecanismo transportador que posea la cianobacteria poder enviar al interior la molécula de arsénico con el fin de utilizarla en su metabolismo. Además que los tratamientos de calor a 92°C y el autoclave permiten un fenómeno de adsorción.

Las cianobacterias utilizadas en esta investigación (cepa 15 y consorcio), pueden remover el arsénico, pero el hecho de que en concentraciones iniciales de arsénico bajas, como las de 100 µg/L existan porcentajes de remoción superiores a 50% no quiere decir que la cianobacteria sea buena para adsorber el arsénico, es importante fijarse en el Qmax de la cianobacterias para saber con qué cantidad de arsénico saturan sus grupos funcionales y de acuerdo a ello poder utilizarlas a escala mayor. De acuerdo a este estudio el Qmax del mejor tratamiento fue de 171.59 µgAs/gCianobacteria, inferior al de otros estudios con materiales adsorbentes como el quitosano impregnado de partículas de hierro que propone Cumbal *et al* 2003 con un Qmax de 666 µgAs/gQuitosano, la factibilidad de su uso en este punto se encontraría dependiendo de otros factores como costos de cultivo, facilidad de producción, tiempo de obtención del material adsorbente y otros.

En este estudio no se realizaron análisis de adsorción con concentraciones menores a 100 µg/L, concentraciones en las cuales las cianobacterias tal vez pudieron adsorber el arsénico hasta dejar el agua en concentraciones inferiores a 10 µg/L, la mínima concentración obtenida fue de 50 µg/L.

Se validó la metodología utilizando un metal positivo como es la plata en forma de nitrato de plata, con el cual se obtuvo un 32.44% de remoción, es decir, que removió 32.44 mg de plata en 30 min partiendo de 100 mg/L de plata (Anexo

E), con lo cual se puede constatar que las cianobacterias son altamente afines por cationes ya que cuentan con gran cantidad de grupos funcionales aniónicos en su estructura como pueden ser los hidroxilos presentes en polisacáridos presentes en la pared celular de las cianobacterias.

4.3 Ensayo de toxicidad aguda con *Daphnia pulex*

Las respuestas cuantitativas son preferidas casi siempre, pero en muchas situaciones no son prácticas. En estos casos, es posible determinar solo si una respuesta certera (como muerte) ha ocurrido. En un típico experimento de respuesta cuantitativo, grupos de animales son sometidos a diferentes dosis de una droga, en este caso a distintas dosis de agua tratada con cianobacterias. El porcentaje de muerte en cada nivel de dosis es tomado. Estos datos fueron posteriormente analizados usando el Análisis Probit.

Las pruebas de sensibilidad realizadas con Dicromato de potasio en *Daphnia pulex* al mostrar una $DL50 = 0.605$, permiten constatar que las pulgas pueden ser sometidas a pruebas de toxicidad con otros tóxicos o supuestos tóxicos. En la investigación de Núñez y Hurtado, 2005 se analizó la sensibilidad de *Daphnia magna* con dicromato de potasio en la que se obtuvo una $DL50$ a las 24 h entre 0.3632 y 0.4243 mg/L, muy similar al obtenido en la investigación con *Daphnia pulex* que posteriormente serían utilizadas en los ensayos de toxicidad de cianobacterias.

En la tabla 3.18 se observan los datos obtenidos de los ensayos de toxicidad realizados en las aguas tratadas con las cianobacterias, datos en los cuales no se aprecia ningún tipo de mortandad en las pulgas, en ciertos casos al parecer las pulgas se alimentaban de ciertos residuos de cianobacterias presentes en el agua para sobrevivir y aún así no hubo muerte. Con dichos datos es

imposible poder obtener una DL50, por lo que no se pudo realizar mediante el programa Probit.

El ensayo de toxicidad agudo realizado con *Daphnia pulex* en esta investigación da el primer paso a realizar estudios con otros animales acuáticos con el fin de conocer si las cianobacterias tienen toxinas que los afecten, actualmente no existen ensayos de toxicidad de cianobacterias realizados con *Daphnia pulex* ni *Daphnia magna* en bibliografía.

Finalmente las pruebas de toxicidad se podrán realizar en mamíferos, las agencias recomiendan que se utilicen las especies animales cuyo metabolismo sea más parecido al del ser humano. En general, los estudios de toxicidad aguda se llevan a cabo en roedores (rata y ratón), la toxicidad subaguda, subcrónica y crónica en rata y perro (a veces el perro es sustituido por el mono) y los estudios de carcinogenesis en rata y ratón. Los estudios de fertilidad y toxicidad peri- y post-natal se suelen hacer en rata y la teratogenia en rata y conejo. Los estudios de mutagénesis se hacen con sistemas celulares in vitro (bacterias en el test de Ames, células de mamífero o de linfomas) o in vivo con en el ratón (test del micronúcleo).

En el caso de que las cianobacterias a utilizarse fuesen tóxicas, existen estudios en los que el cloro y el hipoclorito de calcio en una concentración de 1 mg/L eliminaron cerca del 95% de las toxinas en 30 minutos. Por otro lado el hipoclorito de sodio a la misma concentración solo removió el 40% y con de 5 mg/L o más, del 70 al 80%. El ozono es uno de los oxidantes más poderosos que se conocen y que se han utilizado efectivamente para la desinfección y oxidación de una amplia gama de compuestos en el tratamiento del agua. Se ha mostrado que la pre-ozonización a 1 mg/L fue suficiente para eliminar completamente la

toxicidad causada tanto por las hepatotoxinas como por la anatoxina-a. La eficiencia de eliminación dependía de la concentración de ozono. Las toxinas cianobacterianas llegan a degradarse después de aproximadamente una semana de encontrarse en el ambiente. El uso de calor en los pretratamientos realizados en esta investigación, podría desnaturalizar las toxinas producidas por las cianobacterias.

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

5.1 En cuanto a porcentajes de remoción de arsénico:

5.1.1 Las cianobacterias tratadas con calor a 92°C pueden disminuir el arsénico del agua sintética tratada.

5.1.2 Las cianobacterias tratadas con autoclave a 121°C remueven el mayor porcentaje de arsénico en esta investigación.

5.1.3 La interacción triple: calor a 92°C-consorcio-100 µg/L con un 56.73% de remoción remueve mayor cantidad de arsénico que las interacciones dobles consorcio-calor y cepa 15-calor.

5.1.4 La interacción triple: consorcio-autoclave-100 µg/L con un 61.10% tiene el porcentaje de remoción más alto en esta investigación.

5.2 En lo que se refiere a isotermas de adsorción de arsénico:

5.2.1 Las isotermas de adsorción obtenidas para las cianobacterias pretratadas con autoclave muestran la capacidad de adsorción más alta de esta investigación.

5.3 En cuanto al posible uso práctico de las cianobacterias para remover arsénico del agua:

5.3.1 Tanto la cepa 15 como el consorcio, al ser pretratados con autoclave o calor a 92°C, pueden ser utilizados en suspensión para remover arsénico a nivel de laboratorio; sin embargo, en el escalado se deberán estudiar las nuevas condiciones para evitar la desorción.

5.3.2 La utilización de la cepa 15 y el consorcio pretratados, con fines prácticos de remoción en un biofiltro es posible a nivel de laboratorio.

5.3.3 La cepa 15 y el consorcio pretratados mostraron menor capacidad de adsorción de arsénico en comparación con investigaciones similares en las que se utiliza el quitosano como material adsorbente. Habría que analizar otras variables que podrían influir en la posible utilización de estas cianobacterias en escalados mayores tales como costos, facilidad de producción, rapidez de producción y otros.

5.3.4 La cepa 15 y el consorcio que no se sometieron a pretratamiento remueven cantidades insignificantes del arsénico presente en el agua sintética a nivel de laboratorio, por lo tanto no podrían ser utilizados con fines prácticos.

5.4 En cuanto los análisis estadísticos:

5.4.1 Ninguno de los pretratamientos aplicados a la biomasa es similar estadísticamente a algún otro, el mejor pretratamiento es el autoclave y el peor es el sin tratamiento.

5.5 En cuanto a las pruebas de toxicidad:

5.5.1 La sensibilidad al dicromato de potasio de *Daphnia pulex* utilizada en esta investigación dio positiva en la prueba de toxicidad aguda, y permitió continuar con las pruebas de toxicidad en las cianobacterias de esta tesis.

5.5.2 Tanto las cianobacterias como el agua tratada durante los ensayos de remoción de arsénico en esta investigación no fueron tóxicos para *Daphnia pulex*, al utilizar el método de toxicidad aguda con *Daphnia magna* de Díaz *et al* 2006.

5.6 En cuanto a la originalidad de la investigación: Este es un estudio pionero al utilizar las cianobacterias muertas para remoción de arsénico a nivel del Ecuador, de la búsqueda de artículos científicos realizados a nivel general no se encontró ningún trabajo similar al de esta investigación.

CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

Mantener los cultivos cianobacterianos en el cepario tanto en medio sólido como en líquido, con el fin de que si se desea un inóculo grande se pueda usar el cepario en medio líquido para evitar pérdidas de tiempo.

Probar estas cianobacterias usadas en esta investigación para la remoción de metales pesados que por su carga positiva son más fáciles de ser atraídos y adsorbidos por estas cianobacterias.

Al existir en ciertos casos desorción del arsénico con los pretratamientos dados a la biomasa de este proyecto, es necesario que se realicen estudios de desorción utilizando estos pretratamientos, con el fin de evitar que en algunos casos exista este fenómeno.

Continuar con pruebas de toxicidad de las cianobacterias de acuerdo a las normas internacionales para aguas de bebida.

Mantener este campo de investigación de la microbiología aplicado a la recuperación ambiental.

CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA

1. Álvarez, J. Bolado, S. Cancillo, I. y Calvo, C. (2003). Dinámica de Adsorción-Desorción de Arsénico (V) en suelos de cultivo en Castilla y León. Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Valladolid. Valladolid, España, Tomado el 19 de Abril de 2009 de: <http://carpena.ifas.ufl.edu/ZNS/6valladolid/p331-338.pdf>.
2. Arunakumara. Xuecheng, Z. Song, X. (2007). Estudio Comparativo de la Bioacumulación del Plomo y Cadmio en las cianobacterias *Synechocystis* sp. PCC 6803 bajo condiciones de laboratorio. Ciencias Marinas. Universidad Autónoma de Baja California. Tomado el 16 de Abril de 2009 de: <http://europa.sim.ucm.es/compludoc/AA?articuloid=595100&donde=castellano&zfr=0>.
3. Barrios, A. Calderón, C. Ortega, A. Cota, T. Negrete, A y Rubo, o. (2007). *Daphnia magna* el canario de las Aguas. Centro Universitario Anglo-mexicano. Morelos, Mexico. Extraído el 16 de abril de 2009 de <http://www.acmor.org.mx/cuam/biol/217daphnia.pdf>.
4. Boune, D. Castenholz, R. (2001). The Archaea and Deeply Branching and Phototrophic Bacteria. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Second Edition. Editorial Springer
5. Braga, M. (2002). Tóxicos de origen cianobacteriano, Microcistinas. Extraído el 15 de abril, 2008, de:

<http://www.zoetecnocampo.com/Documentos/ciano/cianobacterias.htm>.

6. Brena, B. (2005). Cianotoxinas, Estructura y Toxicidad. Facultad de Química, Universidad de la República Oriental del Uruguay. Extraído el 29 de abril, 2008, de:

<http://mail.fq.edu.uy/~inmuno/curso%20microcistinas/teoricos/estructura%20y%20toxicidad%20mc.ppt>.

7. BVSA. (2004). Normas Internacionales para la Calidad del Agua de Bebida. Extraído el 17 de mayo, 2008 de <http://www.cepis.ops-oms.org/bvsacg/e/normas.html>.

8. Cumbal, L. Aguirre, V. Murgueitio, E. Tipán, C. Chavez, C. Poma, F. (2006). Orígen del Arsénico en aguas y sedimentos de la Laguna de Papallacta, Estudio Preeliminar. Centro de Investigaciones Científicas, Escuela Politécnica del Ejército. Extraído el 15 de abril, 2008, de: <http://www.accede.org/papers/cianobacterias.pdf>.

9. Curto, S. Mendiburo, N. Plastina, R. Boffi, R. (2002). Arsénico en Acuíferos: Influencia Sobre la Salud de la Población. Extraído el 17 de abril, 2008, de <http://www.intramed.com.ar>.

10. Devercelli, M. Y García M. (2001). Fitoplancton y Floración de Cianobacterias en el Lago del Parque General Belgrano. Qcaambiental.

Extraído el 16 de abril de 2009 de <http://www.qcaambiental.santafe-conicet.gov.ar/transferecia/Lago/cuerpocontinforme.htm>.

11. Díaz, C. Pica, Y. Ronco, A. (2006). Ensayo de toxicidad aguda con *Daphnia magna*. The International development Research Centre. Documento 7. Extraído el 20 de enero de 2009 de http://www.idrc.ca/en/ev-84464-201-1-DO_TOPIC.html.

12. Fay, P. (1992). Oxygen Relations of Nitrogen Fixation in Cyanobacteria. Microbiological Reviews. Jun. 1992. p 340 – 373. Vol. 56. No. 2.

13. Ferrari, S. Guzmán, G. Silva, P. Alcaráz, L. Silva, H. González, D. (2004). Captación de Cadmio por biomasa Libre o Inmovilizada de *Nostoc minutum* (CIANOBACTERIA FILAMENTOSA). Acta Toxicol. Argent. Extraído el 15 de agosto, 2008, de:

http://www.ataonline.org.ar/bibliotecavirtual/acta_toxicologica/ata12_1.pdf.

14. Hong, C. Shan, P. (2005). Bioremediation Potential Of Spirulina: Toxicity And Biosorption Studies Of Lead. Journal of Zhejiang University SCIENCE, 171-174. Extraído el 12 de abril, 2008, de:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=1389717&blobtype=pdf>.

15. INEN, (2009). Parámetros para calidad de agua. Tomado el 19 de abril de 2009 de: <http://www.inen.gov.ec>.

16. Junta de Castilla y León. (2005). El arsénico y el agua de consumo. Agencia de protección de la salud y seguridad alimentaria. Tomado el 15 de abril de 2009 de:
- http://www.salud.jcyl.es/sanidad/cm/profesionales/images?locale=es_ES&textOnly=false&idMmedia=92946.
17. Koch, A. Naranjo, B. Villacís, N. Factos, A. García, M. (2007). Aislamiento, purificación y caracterización de cianobacterias procedentes de bosques nativos de *Polylepis* pauta para su aplicación en reforestación, recuperación de suelos y extracción de metabolitos primarios y secundarios Revista Ciencia. Extraído el 14 de agosto, 2008.
18. Leiva, R. (2003). Fundamentos de Adsorción. Centro de Investigación y Estudios de Posgrado, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México. Tomado el 18 de Abril de 2009 de [http://www.cnea.gov.ar/xxi/ambiental/lberoarsen/docs/taller08/Presentacion es/4c%20Fundamentos%20de%20Adsorcion%20Roberto%20Leyva.pdf](http://www.cnea.gov.ar/xxi/ambiental/lberoarsen/docs/taller08/Presentacion%20es/4c%20Fundamentos%20de%20Adsorcion%20Roberto%20Leyva.pdf).
19. Lillo, J. (2003). Peligros geoquímicos: arsénico de origen natural en las aguas. Grupo de Estudios de Minería y Medio Ambiente. Extraído el 29 de abril, 2008, de:
- http://www.ucm.es/info/crismine/Ambiente_Serena/Peligros_As_2.pdf.
20. Madigan, M. Martinko, J. Parker, J. (2002). Cianobacterias. Biología de los Microorganismos. Pearson, Prentice Hall. Madrid –España pp 418-423.

21. Maeda, S. Kumeda, K. Maeda, M. Higashi, S. Takeshita, T. (1987). Bioaccumulation of arsenic by freshwater algae (*Nostoc* sp.) and the application to the removal of inorganic arsenic from an aqueous phase. InterScience. Extraído el 29 de abril, 2008, de <http://www3.interscience.wiley.com/journal/109566286/abstract?CRETRY=1&SRETRY=0>.
22. Mohan, D. Pittman, J. (2007). Arsenic removal from water/wastewater using adsorbents A critical review. Environmental Chemistry Division, Industrial Toxicology Research Centre. Extraído el 29 de abril, 2008, de http://www.physics.harvard.edu/~wilson/arsenic/references/Mohan_As_removal_adsorbents.pdf.
23. Núñez, M y Hurtado, J. (2005). Bioensayos de toxicidad aguda usando *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Daphniidae) desarrollada en medio de cultivo modificado. Rev. Perú Biol. 165-170. Perú. Tomado en 19 de abril de 2009 de:
- http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/biologia/v12_n1/pdf/v12n1a18.pdf.
24. PCMLE. (2007). Municipio pone en riesgo la vida de los pobladores de Tumbaco. Extraído el 17 de mayo, 2008 de http://www.pcmle.org/EM/article.php3?id_article=999.
25. Pérez, F. Prieto, F. Rojas, A. Marmolejo, Y. Salinas, E. Patiño, F. (2006). Estudio de eliminación de Arsénico con resinas de intercambio iónico en agua potable de Zimapán, Estado de Hidalgo, México. Revista metalurgia

Septiembre Octubre 391-395. Extraído el 17 de Enero de 2009, de Revista de Metalurgia.

26. Puga, F. Olivos, P. Greiber, R. Gonzales, I. Eras, E. Barrera, S. González, E. (1973). Hidroarsenicismo crónico: intoxicación arsenical crónica en Antofagasta. Estudio epidemiológico y clínico. Revista Chilena Pediatría. Extraído el 18 de abril, 2008, de:

<http://www.scielo.cl/pdf/rcp/v44n3/art02.pdf>.

27. Riffat, S. Mahmum, R. Sen, J. (2007). A Study on arsenic decontaminating cyanobacteria of an arsenic affected soil. J.Soil.Nature. 1 (2): 23-29. Extraído el 15 de enero de 2008 de:

<http://www.gwf.org.bd/JSN/JSN%20V1I2%20July%202007/4.23-29.pdf>.

28. Rippka, R. Deruelles, J. Waterbury, JB. Herdman, MRY. (1979). Generic Assignments, strains histories and properties or pure cultures of Cyanobacteria. J.Gen. Microbio. 11: 1-61. Extraído el 30 de Junio, 2008, de <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/480/48033304.pdf>.

29. Roset J, Aguayo S, Muñoz MJ. (2001). Detección de cianobacterias y sus toxinas. Una Revisión. Revista de Toxicología. Extraído el 15 de abril, 2008, de <http://www.accede.org/papers/cianobacterias.pdf>.

30. Torralba, M. (1996). Mejoras al sistema de Generación de Hidruros-Absorción Atómica para la Determinación de Arsénico Total en Materiales Biológicos. Determinación Simultánea de sus Especies Tóxicas Mediante

Procedimientos de Calibración Multivariante. Extraído el 15 de abril de 2009 de <http://biblioteca.universia.net/ficha.do?id=3915928b>.

31. Varian. (2004). Instructivo para uso del generador de hidruros VGA77 acoplado a un espectrofotómetro de absorción atómica. Australia.

32. Vela, L. Sevilla, E. Martín, B. Pellicer, S. Bes, T. Fillat, M. Peleato, L. (2007). Las microcistinas. Rev. Real Academia de Ciencias. Zaragoza, 62: 135-147. Extraído el 3 de mayo de 2009 de:

<http://www.unizar.es/acz/05Publicaciones/Revistas/Revista62/p135.pdf>.