

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADO POR

Andrés Sebastián Espíndola Camacho

COORDINADOR DE LA CARRERA

Ing. Rafael Vargas

SECRETARIO ACADÉMICO

Ab. Vinicio Zabala

Sangolquí, 04 de Junio de 2009

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por el Sr. ANDRÉS SEBSATIÁN ESPÍNDOLA CAMACHO como requerimiento parcial a la obtención del título de INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA.

04 de Junio de 2009

Lic. Biol. Alma Koch MSc.
PROFESORA DIRECTORA

Dra. Blanca Naranjo
PROFESORA CODIRECTORA

DEDICATORIA

A mis padres, por su constante apoyo, amor y paciencia durante toda mi carrera.

A mi hermana Carolina, por siempre darme apoyo durante todo el tiempo que me encontré estudiando.

A todos mis amigos que colaboraron siempre durante toda la realización de mi tesis.

Andrés Espíndola Camacho

AGRADECIMIENTO

A DIOS, yo se que siempre me ayudó, y siempre estaré muy agradecido, has hecho de mi vida un sueño cumplido.

A MIS QUERIDOS PADRES EDISON ESPÍNDOLA E ISABEL CAMACHO, que depositaron toda su confianza en mí y que además siempre me dieron todo su cariño y apoyo.

A MI HERMANA CAROLINA ESPÍNDOLA, su ayuda, apoyo y cariño a pesar de la distancia.

LIC. BIOL.ALMA KOCH, su sabiduría y bondad me permitió culminar con este proyecto de grado, además que siempre estaré agradecido por su ayuda incondicional.

DRA. BLANCA NARANJO, gracias por aportar con sus conocimientos en este proyecto de grado, además por sus enseñanzas durante toda mi carrera.

ING. ENRIQUE ARÉVALO, que colaboró grandiosamente al permitir cuantificar el arsénico en la CEEA.

A mis amigos por encontrarse siempre prestos para ayudar, nunca olvidaré esta etapa de mi vida.

A mis compañeros del Laboratorio de Cianobacterias que siempre permitieron un ambiente llevadero durante toda la realización de este proyecto de grado.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1 Formulación del problema.....	1
1.2 Justificación del problema.....	3
1.3 Objetivos de la investigación.....	6
1.3.1 Objetivo General	6
1.3.2 Objetivos Específicos.....	7
1.4 Marco Teórico	7
1.4.1 Características generales de las cianobacterias	7
1.4.2 Características generales del arsénico, forma de ocurrencia en el agua	12
1.4.3 Problemática del arsénico como contaminante del agua	15
1.4.3.1 Presencia de arsénico en países de Sudamérica	16
1.4.3.2 Distribución del arsénico en el Mundo y su capacidad de contaminación.	18
1.4.4 Límites de Concentración de arsénico en Aguas de Bebida Establecido en las Normas de Diversos Países.....	21
1.4.5 Remoción de arsénico.....	22
1.4.5.1 Remoción de arsénico mediada por microorganismos	23
1.4.6 Pruebas de toxicidad universal de cianobacterias con <i>Daphnia pulex</i>	25
1.5 Sistema de hipótesis	26
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS	27
2.1 Participantes"	27
2.1.1 Escuela Politécnica del Ejército	27
2.1.2 Comisión Ecuatoriana de Energía Atómica.....	27
2.1.3 Personas	28
2.2 Zona de Estudio:	29
2.2.1 Campo.....	29
2.2.2 Laboratorio	29
2.3 Período de tiempo de investigación\.....	29
2.3.1 Fecha de Inicio del Trabajo	29

2.3.2 Fecha de Término del Trabajo	29
2.4 Diseño	29
2.4.1 Diseño para la remoción de arsénico con Cianobacterias	29
2.4.2 Diseño para las Pruebas de Toxicidad de Cianobacterias	30
2.5 Procedimientos	31
2.5.1 Obtención de las Cianobacterias	31
2.5.2 Cultivo de Cianobacterias en Medio Líquido	32
2.5.3 Preparación de agua contaminada con Arsénico.....	32
2.5.4 Recuperación de la Biomasa	34
2.5.5 Tratamiento de la biomasa mediante autoclave.....	34
2.5.6 Tratamiento de la Biomasa mediante calor a 92°C durante una hora.....	35
2.5.7 Biomasa sin tratamiento.....	35
2.5.8 Resuspensión de la biomasa en agua contaminada con Arsénico	35
2.5.9 Toma de muestras y cuantificación de arsénico	35
2.5.9.1 Elaboración de Estándares para Generación de Hidruros	37
2.5.9.2 Curvas de Calibración para el Generación de Hidruros	37
2.5.9.3 Isotermas de Adsorción para Arsénico.....	37
2.5.10 Ensayo de Toxicidad con <i>Daphnia pulex</i>	38
2.5.10.1 Preparación de Agua reconstituida para <i>Daphnia pulex</i>	38
2.5.10.2 Manutención de cultivos de <i>Daphnia pulex</i>	39
2.5.10.3 Separación de pulgas por edad de Cultivo.....	40
2.5.10.4 Neonatos utilizados para pruebas de toxicidad.....	40
2.5.10.5 Obtención de agua tratada con cianobacterias para pruebas de Toxicidad	41
2.5.10.6 Prueba de sensibilidad de <i>Daphnia pulex</i> con Dicromato de Potasio	41
2.6 Análisis de Datos	42
2.6.1 Remoción de arsénico.....	42
2.6.2 Toxicidad de las Cianobacterias	42
CAPITULO 3: RESULTADOS	44
3.1 Cultivo de Cianobacterias en Reactores continuos.....	44
3.1 Manejo de cultivos axénicos y en consorcios de cianobacterias.....	44

3.1.2 Morfología de las Cianobacterias a utilizarse en los Ensayos de Remoción de arsénico	46
3.2 Producción de biomasa para los ensayos con Arsénico	48
3.2.2 Cosecha de la Biomasa obtenida en los Reactores de 5 L	48
3.3 Evaluación de la remoción de arsénico en medio líquido	50
3.3.1 Resuspensión de la Biomasa y Ensayos de Remoción de Arsénico	50
3.3.2 Cuantificación de arsénico remanente en el agua tratada con cianobacterias	51
3.3.3 Modelo 3 Factorial dispuesto en un Diseño Completamente al Azar utilizando como variable dependiente el porcentaje de remoción de arsénico.	57
3.3.3.1 Contraste de Levene de igualdad de Varianza	58
3.3.3.2 Análisis de varianza del Modelo 3-factorial 4x3x2.....	59
3.3.4 Isotermas de adsorción para arsénico V con cianobacterias	69
3.4 Análisis de Toxicidad aguda con <i>Daphnia pulex</i>	76
3.4.1 Análisis de sensibilidad de <i>Daphnia pulex</i>	76
3.4.2 Análisis de toxicidad con <i>Daphnia pulex</i> para el agua tratada con Cianobacterias.....	78
CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN	80
4.1 Manejo de Cianobacterias a partir de cultivos axénicos y en consorcios.....	80
4.1.1 Cultivo de Cianobacterias en reactores continuos	80
4.1.2 Morfología de las cianobacterias utilizadas en los ensayos de remoción de arsénico	80
4.1.3 Cosecha de la Biomasa	82
4.2 Evaluación de la Remoción de Arsénico en los distintos tratamientos.....	83
4.2.1 Tratamiento con calor a 92°C.....	83
4.2.2 Tratamiento con autoclave a 121°C y 15 psi de presión	84
4.2.3 Biomasa sin tratamiento.....	84
4.2.4 Modelo 3-Factorial dispuesto en un Diseño Completamente al Azar utilizando como variable dependiente el porcentaje de remoción de arsénico	86
4.3 Ensayo de toxicidad aguda con <i>Daphnia pulex</i>	90
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES.....	93

CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES	96
CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA	97

LISTADO DE TABLAS

Tabla 2.1 Descripción de los tratamientos, las cianobacterias y las concentraciones de arsénico.	30
Tabla 2.2: Concentraciones de arsénico con volúmenes a tomar del stock de 100 mg/L de arsénico.....	33
Tabla 3.1 Estadísticos Descriptivos de las variables independientes con la media, desviación típica y el número de datos por cada nive.....	58
Tabla 3.2 Contraste de Levene sobre la igualdad de las varianzas	59
Tabla 3.3 ANOVA para el experimento 3-factorial realizado con los porcentajes de remoción.	60
Tabla 3.4 Medias estimadas de porcentaje de remoción de arsénico para el tipo de cianobacteria utilizada.	62
Tabla 3.5 Medias estimadas de porcentaje de remoción de arsénico para el tipo de tratamiento dado a la biomasa	62
Tabla 3.6 Medias estimadas de porcentaje de remoción de arsénico para la concentración inicial de arsénico.....	63
Tabla 3.7 Medias estimadas de porcentaje de remoción de arsénico para la interacción Tipo de cianobacteria x Tratamiento dado a la biomasa.....	63
Tabla 3.8: Medias estimadas de porcentaje de remoción de arsénico para la interacción: Tipo de cianobacteria Concentración inicial de As en $\mu\text{g/L}$	64

Tabla 3.9: Medias estimadas de porcentaje de remoción de arsénico para la interacción: Tratamiento dado a la biomasa x Concentración inicial de As en $\mu\text{g/L}$	64
Tabla 3.10: Medias estimadas de porcentaje de remoción de arsénico para la interacción: Tratamiento dado a la biomasa x Concentración inicial de As en $\mu\text{g/L}$ x Tipo de cianobacteria.....	65
Tabla 3.11 Prueba de Tukey para similitud de medias del factor Pretratamiento de la Biomasa.....	66
Tabla 3.12: Prueba de Tukey para similitud de medias del factor Concentración inicial de Arsénico.....	66
Tabla 3.13 Percentiles de Dosis del Dicromato de Potasio (Estímulo).....	77
Tabla 3.14: Cantidad de pulgas muertas a distintas concentraciones del agua tratada con cianobacterias.....	79

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1.1 Comparación de toxicidad de toxinas biológicas producidas por cianobacterias, dosis letal oral en ratón.....	11
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.....	24

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 Distribución mundial del Arsénico en Acuíferos.....	1
Figura 1.2 Diagrama Eh-pH de especies acuosas de arsénico en el sistema As–O ₂ –H ₂ O a 25°C y 1 bar de presión total	12
Figura 1.3 Especies de Arsénico V como función del pH.....	13
Figura 1.4 Especies de Arsénico III como función del pH.....	13
Figura 1.5 Estructura de los compuestos de arsénico identificados en muestras medioambientales	14
Figura 1.6 Arsénico en vertientes de la Laguna de Papallacta, distintos puntos de muestreo.....	16
Figura 1.7 Distribución del Arsénico en las Aguas del mundo.....	18
Figura 1.8 Equilibrio Químico y Oxidación de la Arsenopirita en aguas subterráneas.....	20
Figura 2.1 Separación de pulgas por edad.....	40
Figura 3.1 Cultivo de Cepa 15 y Consorcio en Frascos Boeco de 250 mL con medio BG11o.....	44
Figura 3.2: Reactores de 5 Litros donde se realizó la obtención masiva de biomasa cianobacteriana para los Ensayos con Arsénico.....	45
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 día-	46
Figura 3.4 Cianobacterias que forman parte del Consorcio utilizado en los ensayos de Remoción de Arsénico.....	48

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.....	49
Figura 3.6 Biomasa sometida a tratamiento I y II.....	49
Figura 3.7 Agitación de los frascos Boeco de 500 mL conteniendo arsénico V y Cianobacterias en agua.....	50
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 51 mL.....	51
Figura 3.9 Porcentajes de remoción de Arsénico partiendo de una concentración de 100 µg/L (C15 cepa 15 consorcio).....	52
Figura 3.10 Porcentajes de remoción de Arsénico partiendo de una concentración de 300 µg/L (C15 cepa 15 consorcio).....	53
Figura 3.11 Porcentajes de remoción de Arsénico partiendo de una concentración de 500 µg/L (C15 cepa 15 consorcio).....	54
Figura 3.12 Porcentajes de remoción de Arsénico partiendo de una concentración de 700 µg/L (C15 cepa 15 consorcio).....	55
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.....	56
Figura 3.14 Gráfico de perfil para la interacción Pretratamiento de la biomasa x Concentración inicial de As.....	67
Figura 3.15: Gráfico de perfil para la interacción Tipo de Cianobacteria x Concentración inicial de As.....	68
Figura 3.16 Gráfico de perfil para la interacción Tipo de Cianobacteria x Pretratamiento de la biomasa.....	69

Figura 3.17 Isotermas de adsorción en la cepa 15 tratada con calor a 92°C (a) Isoterma de adsorción (b) Isoterma de Langmuir. (c) Isoterma de Freundlich.....	70
Figura 3.18 Isotermas de adsorción en el consorcio tratado con calor a 92°C (a) Isoterma de adsorción (b) Isoterma de Langmuir. (c) Isoterma de Freundlich.....	71
Figura 3.19 Isotermas de adsorción en la cepa 15 tratada con autoclave a 121°C y 15 psi de presión (a) Isoterma de adsorción (b) Isoterma de Langmuir. (c) Isoterma de Freundlich.....	72
Figura 3.20 Isotermas de adsorción en el consorcio tratado con autoclave a 121°C y 15 psi de presión (a) Isoterma de adsorción (b) Isoterma de Langmuir. (c) Isoterma de Freundlich.....	73
Figura 3.21 Isotermas de adsorción en la cepa 15 sin tratamiento (a) Isoterma de adsorción (b) Isoterma de Langmuir. (c) Isoterma de Freundlich.....	74
Figura 3.22 Isotermas de adsorción en el consorcio sin tratamiento (a) Isoterma de adsorción (b) Isoterma de Langmuir. (c) Isoterma de Freundlich.....	75
Figura 3.23 <i>Daphnia pulex</i> observada al estereomicroscopio	76
Figura 3.24 Ensayos de Toxicidad y sensibilidad realizados en cajas petri de 25mL con 10 pulgas por cada caja.....	77
Figura 3.25 Gráfico del Análisis Probit para el Dicromato de Potasio con la regresión Lognormal.....	78
Figura 4.1 Fenómeno de Adsorción de Arsénico sobre la pared celular cianobacteriana lisada.....	81
Figura 4.2 Fenómeno de adsorción del arsénico sobre la pared celular cianobacteriana no lisada.....	82

Figura 4.3 Aminas (a) Amoníaco; (b) amina primaria; (c) amina secundaria.....	85
Figura 4.4 Estructura del peptidoglicano	86

LISTADO DE ANEXOS

Anexo A: Medio de cultivo BG11o.....	104
Anexo B: Equipo de Absorción Atómica.....	105
Anexo C: Factores usados en SPSS.....	106
Anexo D: Qmax de adsorción para arsénico en cianobacterias.....	107
Anexo E: Resultados del ensayo con Plata.....	108

RESUMEN

El agua potable tiene dos orígenes desde los cuales se suministran a las poblaciones: uno son las aguas superficiales, como los ríos, lagos y embalses. El otro origen son las aguas subterráneas, a través de pozos y acuíferos. En el Ecuador en la región sierra las aguas provienen de acuíferos o también de ríos, algunos acuíferos y aguas superficiales se encuentran contaminados con arsénico como es el caso de la laguna de Papallacta y el río Tambo que proveen de agua potable a ciertos sectores de Quito y que tiene concentraciones por sobre los 10 $\mu\text{g/L}$ que es la norma permitida en Ecuador y por la Organización Mundial de la Salud.

El presente trabajo propone una alternativa para remover el arsénico de las aguas contaminadas mediante la utilización de un consorcio y de una cepa axénica de cianobacterias a nivel de laboratorio siguiendo las siguientes etapas: i) Cultivo de la biomasa en reactores de 5L, ii) cosecha y pretratamiento de la biomasa mediante tres metodologías, la primera es autoclave a 121°C y 15 psi de presión, la segunda es calor a 92°C y la tercera es utilizar las cianobacterias sin someterlas a ningún pretratamiento; iii) Resuspensión de la biomasa pretratada en agua contaminada con arsénico a concentraciones iniciales de: $100\mu\text{g/L}$, $300\mu\text{g/L}$, $500\mu\text{g/L}$, $700\mu\text{g/L}$ durante 30 minutos durante los cuales se tomaron muestras del agua mediante filtración y iv) análisis de las muestras de agua tomadas durante el ensayo de remoción mediante generación de hidruros acoplado a un espectrofómeto de absorción atómica. Se encontró que las cianobacterias pretratadas con el autoclave presentaron un 61.1% de remoción al partir de una concentración de arsénico de $100\mu\text{g/L}$, el $Q_{\text{máx}}$ más elevado fue el que tuvieron las cianobacterias tratadas con autoclave con $171.59\mu\text{gAs/gCianobacteria}$ adsorbidos. Se realizaron pruebas de toxicidad aguda con *Daphnia pulex* en la que se analizó la posible producción de toxinas por parte de las cianobacterias

usadas en este proyecto de tesis, la prueba de toxicidad aguda no mató a ninguna *Daphnia* por lo que se concluyó que no es tóxica para ellas.

ABSTRACT

Drinking water comes from two sources, which are delivered to human populations: one, is surface water such as rivers, lakes and reservoirs. The other source is groundwater, through wells and aquifers. In Ecuador, in the Sierra region, the water comes from rivers or aquifers. Some ground water and surface water are contaminated with arsenic such as Papallacta lagoon and Tambo River which provide drinking water to certain urban areas of Quito and they have concentrations above 10 µg/L (the standard allowed in Ecuador and the World Health Organization).

This thesis proposes an alternative to remove arsenic from contaminated water by using a consortium and an axenic strain of cyanobacteria in the laboratory by following these steps: i) cultivation of biomass in 5 L reactors, ii) crop and pretreatment of biomass using three methods: autoclave at 121 ° C and 15 psi of pressure, heat to 92 ° C and any pretreatment, iii) resuspension of the biomass pretreated in water contaminated with arsenic at concentrations of: 100µg/L, 300 µg/L, 500 µg/L, 700 µg/L for 30 minutes. The water samples were collected by filtration and water samples analysis was made through hydride generation coupled with an atomic absorption equipment. We found that cyanobacteria pretreated with autoclave showed a 61.1% removal of the arsenic concentration of 100 mg / L, the Qmax was higher when the cyanobacteria were treated with autoclave, this pretreatment showed a 171.59 µgAs/gCyanobacteria adsorbed. Cyanobacteria were tested for acute toxicity to *Daphnia pulex* in this thesis project, the acute toxicity test did not kill any *Daphnia pulex*.