



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA



Aplicación de la Cianobacteria *Anabaena sp.* CPB 4337 como bioindicador de toxicidad por metales pesados en el embalse ESPOL.

Autores: A. Guamán⁽¹⁾, A. Empuño⁽²⁾, M. Jaramillo⁽³⁾ & Co-autor: F. Burgos⁽⁴⁾
(1,2,3,4) Facultad de Ingeniería Marítima, Ciencias Biológicas, Oceanográficas y Recursos Naturales.
Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL).
Campus Gustavo Galindo, km 30.5 vía Perimetral,
Apartado 09-01-5863. Guayaquil, Ecuador.

[*faburgo@espol.edu.ec](mailto:faburgo@espol.edu.ec), aguaman@espol.edu.ec, aempuno@espol.edu.ec, mjaramillo@espol.edu.ec

Resumen

El embalse de la ESPOL fue creado como una alternativa vial para unir ciertas facultades del campus Prosperina. Durante años ha sido reutilizado por la FIMCBOR (Facultad de Ingeniería Marítima, Ciencias Biológicas, Oceanográficas y Recursos Naturales) para actividades docentes y de investigación, originando descargas de aguas residuales provenientes de las baterías sanitarias, laboratorios y demás áreas relacionadas con el uso de sus aguas. Es de conocimiento que el agua del embalse es utilizada para actividades de riego, deportivas y de laboratorio en las unidades de la Universidad. Posterior a indagaciones y observaciones realizadas por el equipo de investigación, se observó que dentro de las actividades en la universidad, no ha habido ni existe un plan de tratamiento y de mantenimiento de las mismas. Con el tiempo, por no existir un plan de tratamiento, podría haberse provocado una acumulación de los metales pesados en las aguas y en los suelos alrededor del embalse, por lo que el siguiente proyecto tiene como objetivo la aplicación de alternativas innovadoras amigables con el entorno, que permitirá hacer el seguimiento de dichos residuales. La cepa *Anabaena sp.* CPB 4337 es una cepa que posee capacidad autolumiscente que permite, además de detectar la parte biodisponible del contaminante (Zinc, Plata, Cobre, Cadmio, y Mercurio), indicando una respuesta de forma analítica a partir de un biosensor. Cuando la presencia de estos metales pesados (contaminantes) se incrementa a cierto nivel en el medio extracelular, activarán los sistemas de luminiscencia de la bacteria. Es de esperar que las zonas que presenten una mayor concentración de metales pesados sean los lugares de descargas de las distintas facultades y centros que funcionan en la ESPOL.

Palabras Claves: *Anabaena sp.* CPB 4337, metales pesados, ESPOL, embalse.

Abstract

The lake of ESPOL was created as an alternative road to link certain faculties of Prosperina's Campus. For years it has been reused for the FIMCBOR (Facultad de Ingeniería Marítima, Ciencias Biológicas, Oceanográficas y Recursos Naturales) for teaching and research activities, resulting in discharges of wastewater from the restrooms, laboratories and other areas related to the use of its waters. It is common knowledge that the reservoir water is used for irrigation, sports and laboratory units of the University. Following inquiries and observations made by the research team found that within the activities at the university, there has not been a plan of treatment and maintain them. Over time, because there is no treatment plan, could have led to the accumulation of heavy metals in waters and soils around the reservoir, so the next project is aimed at implementation of innovative environmentally-friendly, which will keep track of such waste. The strain *Anabaena sp.* CPB 4337 is a strain that has the capacity autolumiscente that also allows to detect the contaminant bioavailability (Zinc, Silver, Copper, Cadmium, and Mercury), indicating an analytical response from a biosensor. When the presence of these heavy metals (pollutants) increases to a certain level in the extracellular medium, activating the luminescence systems of bacteria. It is expected that areas with higher concentrations of heavy metals are the download locations of the various faculties and centers in the ESPOL.

Key Words: *Anabaena sp.* CPB 4337, heavy metals, ESPOL, lake.



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA



1. Introducción

Las cianobacterias son procariotas fotosintéticos oxigénicos que representan uno de los reinos de las bacterias poseyendo una relación lejana con las bacterias gram positivas.

Se encuentran en formas unicelulares así como también en formas filamentosas, de varios tamaños 0,5 - 1 um hasta 60 um.

Se las divide en 5 grupos morfológicos: Unicelulares que se dividen por fisión binaria, unicelulares que se dividen por fisión múltiple, filamentosas con células especiales fijadoras de nitrógeno o heterocistos, filamentosas pero sin heterocistos, filamentosas ramificadas. En su pared celular presentan peptidoglucano de estructura similar a las gram negativas.

Las membranas lamelares que son envolturas mucilaginosas, pueden llegar a formar multicapas, aunque en otras cianobacterias las podemos encontrar organizadas en formas concéntricas en la periferia del citoplasma.

Poseen una sola forma de clorofila que es la clorofila a, donde cada una tiene pigmentos biliprotéicos o ficobilinas que son pigmentos accesorios para el proceso fotosintético.

La cepa *Anabaena sp.* CPB 4337 es una cepa que posee capacidad autolumiscente que permite, además de detectar la parte biodisponible del contaminante (proporción del contaminante que puede ser asimilado por un organismo), indicando una respuesta de forma analítica a partir de una biomolécula.

Todo esto fue acabo de la inserción cromosómica del operón lux completo (luxCDABE) de la bacteria terrestre luminiscente *Photobacterium luminescens* a través de la cepa *Anabaena sp.* 7120.

En el periodo de crecimiento exponencial, la intensidad de la emisión de luz se eleva drásticamente como resultado de la rápida acumulación de los sustratos y enzimas sintetizadas a partir de la activación de la expresión de los genes CDABE lux.

En bioluminiscencia bacteriana los catalizadores que inducen la expresión del gen CDABE lux son proteínas reguladoras, estas son compuestos químicos pequeños, llamados autoinductores (Zinc, Plata, Cobre, Cadmio, y Mercurio) estos son pequeños productos metabólicos, que se difunden libremente a través de la membrana celular, y se excretan al medio extracelular durante la etapa inicial de crecimiento de las células.

Cuando la concentración de autoinductores se incrementa a cierto nivel en el medio extracelular, activaran los sistemas de luminiscencia de la bacteria. Por actividades propias de la Universidad ESPOL, existen facultades y otros departamentos que hacen uso y análisis de muestras que poseen metales pesados y sus residuos son vertidos directamente a las aguas del embalse. Es de conocimiento que el agua del embalse es utilizada para actividades de riego, deportivas y de laboratorio en las unidades de la Universidad. Posterior a indagaciones y observaciones realizadas por el equipo de investigación, se observó que dentro de las actividades en la universidad, no ha habido ni existe un plan de tratamiento y de mantenimiento de las mismas. Con el tiempo, por no existir un plan de tratamiento, podría haberse provocado una acumulación de los metales pesados en las aguas y en los suelos alrededor del embalse, por lo que hay que buscar una alternativa que ayude a monitorear la acumulación de metales pesados que puedan causar contaminación en el embalse.

2. Objetivos

General

Determinar la presencia de metales pesados en el embalse ESPOL a través del bioindicador *Anabaena sp.* CPB 4337.

Objetivos Específicos

1. Aplicación de un microorganismo como indicador biológico de contaminación por metales pesados.
2. Establecimiento y cuantificación de metales pesados por cromatografía de absorción atómica.
3. Zonificación de las áreas de mayor contaminación del embalse ESPOL por metales pesados.

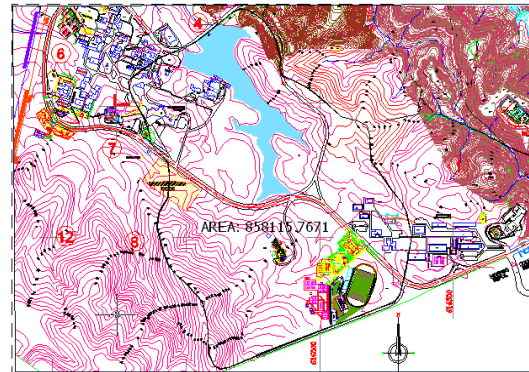
3. Materiales y Métodos

3.1 Muestreo

Se zonificó y dividió el lago por zonas para poder determinar diferentes puntos de muestreo a realizarse en el Embalse ESPOL, determinándose de esta manera 11 puntos a muestrear y 5 Zonas (Figura 1) que se dieron una denominación Alfabética comprendida de A hasta E. (Tabla I)

Zona	Puntos de Muestra	Latitud	Longitud
A	A1	2° 8'40.82"S	79°57'41.03"C
	A2	2° 8'41.77"S	79°57'45.85"C
	A3	2° 8'45.21"S	79°57'48.60"C
B	B1	2° 8'45.89"S	79°57'43.46"C
	B2	2° 8'46.40"S	79°57'40.96"C
C	C1	2° 8'48.70"S	79°57'41.32"C
	C2	2° 8'50.25"S	79°57'38.97"C
D	D1	2° 8'51.26"S	79°57'37.62"C
	D2	2° 8'53.90"S	79°57'35.38"C
E	E1	2° 8'52.60"S	79°57'40.73"C
	E1	2° 8'58.39"S	79°57'39.34"C

Tabla I. Coordenadas Geográficas



Fuente: Unidad de Planificación ESPOL (2005)
Figura 1. Mapa Embalse Espol

3.2 Tamaño de la muestra

Las muestras fueron recolectadas a 1 m de profundidad con una botella tipo Van dorn y colocadas en una botella de vidrio de 473 ml con sus dos respectivas replicas.

3.3 Análisis de la Muestra

La muestra previamente obtenida fue aclimatizada en un medio de BG11₀ (NaNO₃, K₂HPO₄, 3H₂O, MgSO₄, 7H₂O, CaCl₂ 2H₂O, Acido Cítrico, Citrato de amonio férrico, EDTA, Na₂CO₃, Mezcla de metales traza A5 + Co, Agua dionizada, pH 7,4 después de autoclavado y enfriamiento) (Rippka et al. 1979) en tubos de ensayo de 300 ml con un diámetro de 4,5 cm que fueron aerados con CO₂ que tuvieron un filtro esterilizado y con ciclos de 12 horas con luz y 12 horas sin luz.

3.4 Análisis de Muestra de Agua

De cada envase de vidrio que contiene la muestra a analizar se tomó 350 ml de agua y que se colocó en un envase Erlenmeyer de 500 ml y se adicionaron 2,5 ml del inóculo de la bacteria *Anabaena sp.* 4337 (Bárbara M.et.al. 1980)

3.5 Análisis Estadístico

El análisis de inhibición de la luminiscencia en la *Anabaena sp.* CBP 4337 se calculó a través de EC50 (Concentración del tóxico que produce una inhibición, calculada o interpolada, de la bioluminiscencia del 50% comparada con el ensayo en blanco).



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA



4. Resultados

- ❖ Es de esperar que las zonas que presenten una mayor concentración de metales pesados sean los lugares de descargas de las distintas facultades y centros que funcionan en la ESPOL.
- ❖ La cianobacteria en cuestión es capaz de detectar de forma general cualquier tipo de elemento ambiental perjudicial que le suponga un detrimento en su actividad metabólica.
- ❖ Los resultados obtenidos parecen indicar que efectivamente se requieren biosensores de toxicidad más relevantes ecológicamente para conseguir una información toxicológica y de biodisponibilidad de contaminantes más real que permitan mejorar o complementar la información obtenida de ensayos de toxicidad clásicos o biosensores que se usan de forma generalizada.

5. Conclusiones

- ❖ Las muestras de agua analizadas en el embalse ESPOL tendrán concentraciones comprendidas entre el control 1 (Muestra de agua que carece de metales pesados) y el control 2 (Muestra de agua donde los metales pesados fueron agregados en el laboratorio a concentraciones elevadas).
- ❖ La zonificación del embalse que presenten contaminación, pueden servir para una diversificación de actividades que se realizan en la actualidad en el lugar.
- ❖ Se puede establecer un medidor eficiente para determinar concentración de metales pesados.

- ❖ La realización de este proyecto podría determinar la limitación de actividades como extracción de agua del lago para actividades acuícolas.
- ❖ El estudio de toxicidad del embalse ESPOL puede servir como línea base para futuras investigaciones para proyectos de recuperación y mejoramiento de la calidad del agua.

6. Bibliografía

1. Arryn Craney, Tobias Hohenauer, Ye Xu, Naveen Kumar Navani, Yingfu Li, and Justin Nodwell; A synthetic luxCDABE gene cluster optimized for expression in high-GC bacteria.
2. Iván Saltos; Plan de Manejo Ambiental del Campus Gustavo Galindo-ESPOL-1998 (mapa Planificación-ESPOL 2005).
3. Romero M, Diggle. S, Hedo S., Cámara M; Quorum quenching activity in *Anabaena* sp. PCC 7120: Identification of AIIC, a novel AHL-acylase; Federation of European Microbiological Societies; 2008.
4. Romero M, Diggle. S, Hedo S., Cámara M; Quorum quenching activity in *Anabaena* sp. PCC 7120: Identification of AIIC, a novel AHL-acylase; Federation of European Microbiological Societies; 2008.