



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL.
Facultad de Ingeniería Marítima, Ciencias Biológicas,
Oceánicas y Recursos Naturales

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

PROYECTO DE GRADUACIÓN

Previa a la obtención del Título de:

BIOLOGO

Presentado por:

Analy Mariana Guamán Galarza

Andrés Emilio Empuño Velásquez

Miguel Alejandro Jaramillo Minaya

AÑO: 2011

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por guiar mis pasos

A mi familia por apoyarme siempre

A la Dra. Francisca Burgos y Dr. Marcelo Muñoz por su Colaboración.

Analy Guamán Galarza.

A Dios por mantenerme aquí,

A mi familia, Libia y Emiliano por amor y comprensión.

A mis padres y hermanos por el apoyo brindado.

Al personal docente, compañeros y a cada persona que pertenece a la FIMCM.

Miguel Jaramillo Minaya

A mis padres y hermana por estar conmigo en todo momento

Y darme el apoyo necesario para lograr mis metas,

A mis amigos y profesores.

Andrés Empuño Velásquez.

DEDICATORIA

A mis Padres

Hermana

Y ASD

Analy Guamán Galarza.

Este trabajo está dedicado a mi hijo Miguel Emiliano

todo es posible cuando uno se lo propone,

en la persistencia se encuentra los logros.

Miguel Jaramillo Minaya.

A Dios

Mis padres

Y Hermana

Andrés Empuño Velásquez

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Muñoz', is written over a horizontal dotted line.

Dr. Marcelo Muñoz Naranjo

Presidente del Tribunal

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Burgos', is written over a horizontal dotted line.

Dra. Francisca Burgos

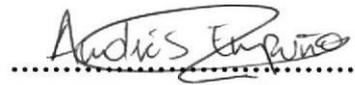
Directora de la Tesina

DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad del contenido de esta Tesina de Grado, nos corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL”


.....

Analy Mariana Guamán Galarza


.....

Andrés Emilio Empuño Velásquez


.....

Miguel Alejandro Jaramillo Minaya

INDICE GENERAL

	Pag.
INDICE	
GENERAL.....	I
INDICE TABLAS.....	III
INDICE FIGURAS.....	IV
INDICE DE ANEXOS.....	V
ABREVIATURAS.....	VI
OBJETIVOS.....	1
JUSTIFICACIÓN.....	2
CAPITULO 1: GENERALIDADES	
1.1 Cianobacterias.- Generalidades.....	6
1.2 Características Y Obtención de la <i>Anabaena sp.</i> CPB 4337	8
1.3 Aplicaciones de la <i>Anabaena sp.</i> CPB 4337 en la detección de plata, cobre, Mercurio, Zinc y Plomo.....	12
1.4 Embalse ESPOL.- Características generales.....	14
1.5 Espectrometría de absorción atómica.....	15

	Pag.
CAPITULO 2: MATERIALES Y METODOS	
2.1 Área de estudio.....	18
2.2 Muestreo.....	19
2.3 Tamaño Muestra.....	20
2.4 Análisis de la Muestra.....	20
2.5 Cuantificación e Identificación de metales pesados.....	22
2.6 Análisis Estadístico.....	22
CAPITULO 3: Presupuesto.....	24
CAPITULO 4: Beneficiarios.....	26
CAPITULO 5: Resultados.....	29
RECOMENDACIONES.....	30
CONCLUSIONES.....	31
BIBLIOGRAFIA.....	33
ANEXOS.....	36

Pag.

INDICE TABLAS

Tabla # I. Coordenadas Geográficas de los Puntos de Muestreo.....20

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de Enzimas de Restricción para cada fragmento lux.....	9
Figura 2. Esquema de Sustratos para Activación de Luz.....	11
Figura 3. Funcionamiento de Autoinductores.....	13
Figura 4. Mapa Embalse ESPOL.....	19
Figura 5. Puntos de muestreo del Embalse ESPOL.....	19

Pag.

INDICE ANEXOS

Anexo A. Cronograma de Actividades.....36

INDICE ABREVIATURAS

CaCl₂: Cloruro de Calcio

CENAE: Comité Consultivo Agropecuario ESPOL

CO₂: Dioxido de Carbono

DBO: Demanda Biológica de Oxígeno

EDTA: Ácido Etilendiamonotetra-acético

ESPOL: Escuela Superior Politécnica del Litoral

FIMCM: Facultad de Ingeniería y Ciências del Mar

GOE: Grupo de Operaciones Especiales

K₂HPO₄: Fosfato Monoácido de Potasio

MgSO₄: Sulfato de Magnesio

NaCO₃: Carbonato de Sodio

NaNO₃: Nitrato de Sodio

OD: Oxígeno Disuelto

SEBIOCA: Sociedad Ecuatoriana de Biotecnología

TULAS: Texto Unificado de Legislación Ambiental

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

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

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

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

JUSTIFICACION

El embalse de la ESPOL fue creado como una alternativa vial para unir ciertas facultades. Durante años ha sido reutilizado por la FIMCM (Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar) para actividades docentes y de investigación, en los últimos años se han realizado actividades de descarga 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 hay que buscar una alternativa que ayude a monitorear la acumulación de metales pesados que puedan causar contaminación en el embalse.

Por actividades propias de la Universidad, 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.

Estudios realizados en España por la Universidad Autónoma de Madrid para la

utilización de biosensores o indicadores de toxicidad en su comunidad de ríos permiten alternativas no comerciales eficientes a través del aprovechamiento de comunidades bacterianas.

Una característica muy significativa de las cianobacterias, es su capacidad para proliferar de forma masiva bajo determinadas circunstancias ambientales. Estas proliferaciones provocan alteraciones en las condiciones físico-químicas del agua, modificando el valor del pH, la cantidad de oxígeno disuelto y llegan a producir olor y sabor indeseables, así como una alteración estética de las masas de agua. Las cianobacterias usan estímulos medioambientales diferentes, como son la luz, gravedad, composición química del medio y temperatura, disponiendo así de un mecanismo ecológico importante que les permite ajustar su posición en la columna de agua y, por tanto, colocándose en el nicho más favorable para su supervivencia y crecimiento (Cohen-Bazire *et al.*, 1969; Mur *et al.*, 1999; Graham y Wilcox, 2000; Bonnet y Poulin, 2004; Jacquet *et al.*, 2005).

Utilizando la disponibilidad de las cianobacterias como indicador de contaminación podríamos establecer parámetros de contaminación en el embalse de la ESPOL, esto a través de una cianobacteria recombinante autoluminiscente derivada de la cianobacteria *Anabaena sp.* PCC 7120, llamada *Anabaena sp.* CPB4337, que es capaz de ser autoluminiscente ya que lleva una integración cromosómica del operon lux completo (luxCDABE) de la bacteria terrestre luminiscente *Photorhabdus luminescens*. Esta aplicación ya ha sido utilizada por el grupo de investigación Cianobacterias de la Universidad Autónoma de Madrid, España; donde se explora el posible uso de la *Anabaena* CPB4337 como biosensor de

toxicidad para muestras ambientales continentales.(9)

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, dicho detrimento se traduce en una disminución de la emisión de luz de la cianobacteria, que puede ser como indicador de toxicidad ambiental. Dicha propiedad luminiscente se emplea ya de forma rutinaria para la medida rápida de toxicidad de muestras ambientales de toda índole (aguas fluviales, efluentes de depuradoras, aguas marinas, subterráneas, suelos, etc.) mediante ensayos de toxicidad.

Esta cianobacteria recombinante reacciona ante la presencia de metales pesados como Zinc, Plata, Cobre, Cadmio, Plomo y Mercurio, disminuyendo la autoluminiscencia de la cepa en la muestra de agua. Sin embargo este organismo no detecta con exactitud cuales de estos metales se encuentran en el medio, motivo por el cual a través de un análisis de espectrometría de absorción atómica podríamos identificarlos y cuantificarlos, con el fin de establecer de esta manera, que metales se encuentran en el Embalse ESPOL y las zonas más afectadas por la toxicidad de los mismos y así conservar un registro detallado de la abundancia de los metales pesados presentes en el agua y del efecto contaminante que estos conllevan.

El grupo de investigación Cianobacterias de la Universidad Autónoma de Madrid, España, en colaboración con el grupo de investigación del Dr. Roberto Rosal de la Universidad de Alcalá, España, ha publicado un artículo denominado "Ecotoxicología de contaminantes emergentes". En este trabajo se describe el uso

de tres organismos acuáticos (*Vibrio fischeri* y *Daphnia magna* y una cianobacteria autoluminiscente de agua dulce denominada *Anabaena sp.* CPB4337) para evaluar la toxicidad aguda de cuatro compuestos farmacéuticos (Ácido fenofibrico, bezafibrato y gemfibrocil) de la familia de los fibratos en agua y aguas residuales. Como medida de toxicidad se empleó la mortalidad en el caso de la “pulga de agua” (*Daphnia magna*) y la inhibición de la luminiscencia para las bacterias *Vibrio fischeri* y *Anabaena CPB4337*.

En el trabajo pudo comprobarse que todos los compuestos analizados presentaron toxicidad para los tres organismos, el más tóxico resultó ser el ácido fenofibrico con EC50 de 1.72 mg/l para *Vibrio fischeri*, compuesto que nunca había sido analizado previamente, y el genfibrocil también resultó se tóxico para *Anabaena sp.* CPB4337 con EC50 de 4.42 mg/l. *Anabaena sp.* CPB 4337 resultó ser el organismo más sensible a todos los compuestos analizados excepto para el ácido fenofibrico. (14)

CAPITULO 1

GENERALIDADES

1.1 Cianobacterias.- Generalidades.

Son procariotas fotosintéticos oxigénicos que representan uno de los reinos de las bacterias poseiendo 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.

El color característico azul-verdoso es debido a un tipo de ficobilinas, estas poseen un color azul y el pigmento verdoso es atribuido a la clorofila.

Presentan variaciones estructurales como una vesícula de gas y los heterocistos, donde en especies de vida libre es muy común encontrarlos dentro de sus estructuras citoplasmáticas.

Dentro de las cianobacterias existe un genero conocido como Anabaena y presentan heterocistos, las cuales son células de paredes gruesas usualmente de gran tamaño, sin mucha pigmentación ubicadas entre las células normales y el lugar donde se realiza la fijación de nitrógeno.

Los heterocistes tienen paredes gruesas, carecen de ficobilinas pero tiene gran cantidad de glicolípidos que retrasan la difusión de oxígeno perdiendo el sistema de fotosíntesis II (generador de oxígeno). La inhibición de la nitrogenasa es producto de la sensibilidad que esta enzima posee hacia el oxígeno. Las células normales poseen disacáridos producidos por la fotosíntesis que se dirigen a los heterocistos y a la vez estos proporcionan glutamina, una forma fijada de nitrógeno, existiendo de esta manera un intercambio activo.

En adición, ocurre un ordenamiento genérico de primera magnitud para originar un grupo NIF que se expresan como una unidad.

En el fotosistema II cuyo producto es el Oxígeno, genera un poder reductor basándose en agua, sin embargo, este sistema carecen de la capacidad fijadora de CO₂ por lo tanto no tienen donadores de electrones lo cual es indispensable para la reducción de nitrógeno molecular, pero con el carbono fijado presente en las células adyacentes el cual es importado por los heterocistos reanudando la fijación.

Las cianobacterias utilizan el nitrato y amoníaco como fuente de Nitrógeno, son fototrofas obligadas aunque algunas cianobacterias tienen la capacidad limitada con la presencia de luz (fotoasimilación).

Algunos productos producidos por el metabolismo tienen importancia como por ejemplo, la presencia de neurotoxinas que significan un peligro debido a su toxicidad contaminando aguas de consumo para animales de cría, otro ejemplo es el sabor característico de tierra en el agua.

1.2 Características y Obtención de la *Anabaena sp.* CPB 4337.

La cepa *Anabaena sp.* CPB 4337 es una cepa que posee capacidad autoluminiscente 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 dado por la inserción cromosómica del operón lux completo (luxCDABE) de la bacteria terrestre luminiscente *Photorhabdus luminescens* a

través de la cepa *Anabaena sp.* 7120, La aplicación de esta cianobacteria se realiza a través del estudio efectuado en Madrid llamado "Evaluación de ecotoxicidad de los reguladores de lípidos en agua y aguas residuales tratadas biológicamente con tres organismos acuáticos"(7). Donde es comparado con microorganismos como *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* en pruebas de ecotoxicidad para bezafibrato, ácido clofibrico, gemfibrozilo, y el ácido fenofibrico, que todos los compuestos analizados presentaron toxicidad para los tres organismos, siendo el más sensible la *Anabaena sp.* 4337 para todos los compuestos analizados excepto para el ácido fenofibrico.

La obtención del operón luxcompleto (luxCDABE) a partir de la bacteria terrestre luminiscente *Photobacterium luminescens* se realiza con la extracción de dominios del LuxCDABE, los que codifican tanto en luciferase (LuxA y LuxB) y las enzimas necesarias para la producción de su sustrato tetradecanal (LuxC, LuxD y LuxE) utilizando enzimas de restricción que cortaran en el lugar específico de cada dominio.(2)

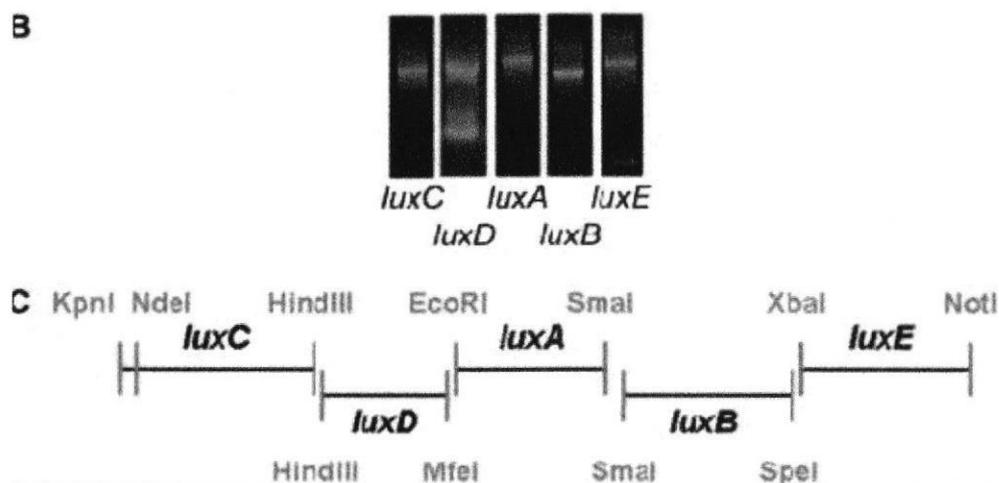


Figura 1: Esquema de Enzimas de Restricción para cada fragmento lux

Los Plásmidos (pDONR221 + luxA22 pDONR221 + luxB23 pDONR221 + luxC4 pDONR221 + luxD2 pDONR221 + luxE5) fueron propagadas en la cepa de *Escherichia coli* XL1 Blue. Para la introducción de plásmidos en la Anabaena, los plásmidos se transformaron en *E. coli*, cepa que contiene el plásmido conyugal para permitir la transferencia del plásmido a la Anabaena sp. 4337. Con esto, la inserción asegura que el nuevo segmento de ADN integrado no afecte a la robustez/viabilidad de la cepa bacteriana mientras que la estabilidad de la inserción garantiza que ésta, se mantenga de generación en generación sin necesidad de una presión selectiva.(6)

Cuando hablamos de cepas autoluminiscentes, hablamos de cepas que poseen un operon completo de lux CDABE, por esta razón organismos transgénicos que solo poseen genes lux o genes lux AB, son organismos incompletos para brindar luminiscencia, ya que necesitan de una cadena larga de aldehído grasos de longitud o la luciferasa, la luciferasa es un heterodímero, compuesto por dos polipéptidos diferentes, designados como alfa y beta, de masa molecular de 40 kDa y 37 kDa, respectivamente, y codificada por los genes lux A y B. Los sustratos de la luciferasa bacteriana se reducen en mononucleótido de flavina (FMNH₂), el oxígeno molecular, y la cadena de aldehído grasos de longitud. El exceso de energía, cual es liberada con la oxidación de FMNH₂ y el aldehído con la reducción del oxígeno molecular, emite una luz azul, que a su vez es una emisión de luz verde (MAX ~ 490 nm.)(13)

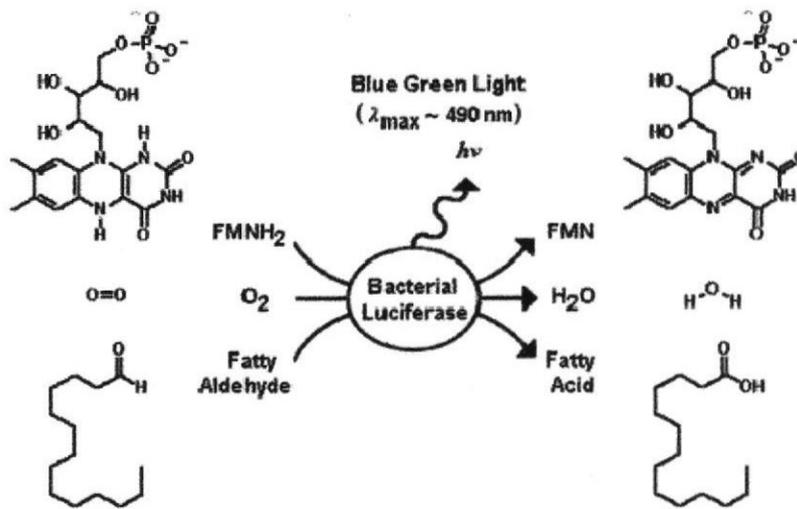


Figura 2: Esquema de Sustratos para Activación de Luz

A medida que la disponibilidad de productos en las reacciones enzimáticas está limitada por la disponibilidad de los sustratos, enzimas diferentes continúan la generación de los sustratos para la reacción de bioluminiscencia. Los enzimas que restablecen el sustrato aldehído (R-CHO) son codificados en el operón lux, en particular, en la reductasa del ácido graso, que es un complejo multienzimático, cuyos genes lux (luxC, luxD y lux E) inmediatamente desgastan los genes lux A y B, genes de la luciferasa. Para que este proceso se mantenga, debe existir una recarga de Flavina y presencia de oxígeno molecular.

Además, de la propiedad lumínica de los genes lux CDABE brindan a la cepa *Anabaena* sp.4320, se emplean como reportero de la expresión de genes para el estudio de controles reguladores que intervienen en la eficacia de la polimerasa de ARN en la iniciación y la transcripción en diferentes promotores. A continuación,

los genes CDABE lux están bajo el control de un promotor regulado que puede persistir el medio ambiente (por ejemplo, los promotores de cuya eficacia es muy sensible al nivel de mercurio, arsénico, u otros contaminantes), los genes estructurales lux puede funcionar como un biosensor, cuya expresión supervisará la presencia de residuos tóxicos en el ambiente a estudiar.(12)

1.3 Uso de la Anabaena sp. CBP 4337 en la detección de metales pesados.

La emisión de luz por parte de las bacterias autoluminosas depende en gran medida el crecimiento y el medio ambiente. Para que la emisión lumínica que se genere, no sólo es necesario un alto nivel de expresión de los genes lux CDABE, requerido para formar luciferasa bacteriana y de la reductasa de ácidos grasos, sino también es necesario la síntesis de los sustratos de la luciferasa bacteriana para mantener la emisión de luz durante períodos de tiempo largo.

Las bacterias luminosas que crecen en medios líquidos a baja densidad celular emiten una cantidad mínima de la luz, debido a la latencia de la expresión de los genes CDABE lux y el deficiente nivel de sustrato para la reacción de la luciferasa bacteriana. 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, 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, este proceso es llamado "quórum sensing". Los genes CDABE lux están bajo el control de un promotor regulado el medio ambiente (por ejemplo, los promotores de cuya eficacia es muy sensible al nivel de mercurio, arsénico, u otros contaminantes) esto puede conllevar a un "quórum quenching" inhabilitando la eficacia de los autoinductores. (Fig.3)(13)

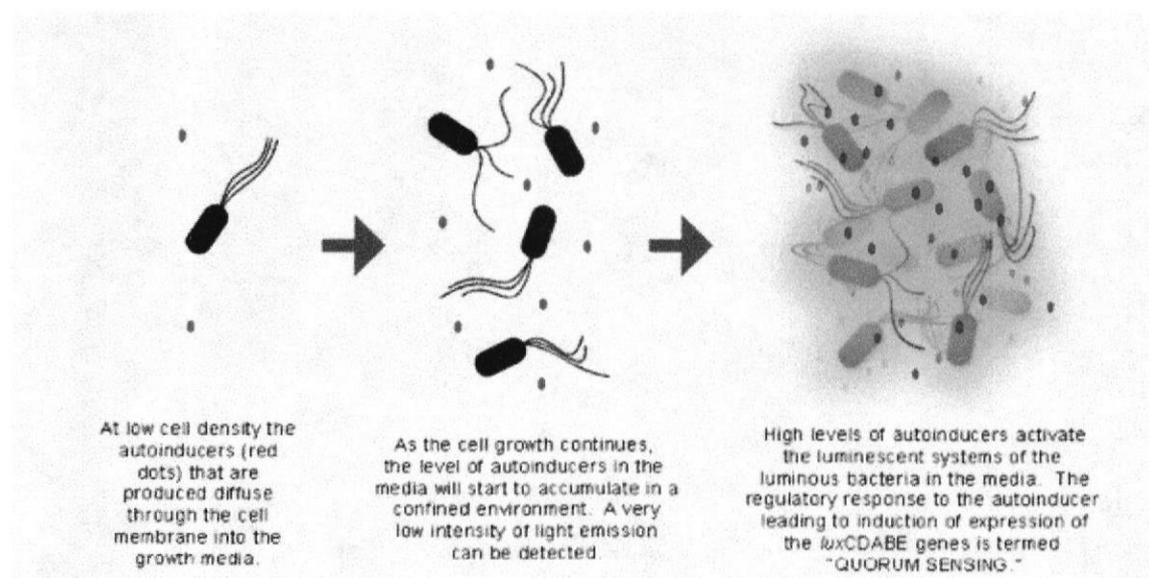


Figura 3: Funcionamiento de Autoinductores

1.4 Embalse ESPOL.- Características generales.

La represa del Campus Gustavo Galindo de la ESPOL, construida en 1992, tiene 14 metros de profundidad máxima (cota 79 de diseño), con un muro de coronación de 14 metros de ancho. La profundidad del reservorio varía en época seca o lluviosa en un rango de volumen aproximado de 523.325 de m³ (cota 79). La presa esta dotada de un vertedero capaz de desalojar 5.8 m³ por segundo. El agua del embalse se utiliza corrientemente para acuicultura, agricultura y recreación. En ocasiones de fuertes lluvias, el agua se desborda y forma parte del drenaje natural que desemboca en el río Daule.

El estudio hidrológico determina que en el Campus Gustavo Galindo existen cinco subcuencas principales, las cuales pueden generar caudales considerables durante los meses lluviosos. Lo que se describe en esta sección se tomo de los estudios de diseño de la presa del embalse de la ESPOL. En el estiaje, la mayoría de quebradas, exceptuando las de dominio geomorfológico alto, se vuelven secas. El análisis hidrológico es fundamental en el proceso del aprovechamiento de los recursos hidráulicos, tales como el manejo y operación de un embalse (ESPOL 1998).

Tomando como base para el estudio el mapa obtenido de la Unidad de Planificación ESPOL (2005) en Autocad, se delimitan las cuencas de drenaje del Campus. Los cauces naturales que constituyen el colector principal de cada subcuenca, no tienen una denominación en particular que permita referirse a ellos o a las subcuencas que drenan. Se opta por darle una denominación utilizando las primeras letras del alfabeto. De este modo se tienen, en el sentido de oeste a este,

las siguientes subcuencas: A, B, C, D y E (ESPOL 1998). En la figura 1, se muestra el plano que presenta la subcuenca C que es objeto de nuestro estudio, puesto que alimenta a la presa de la ESPOL. (10)

En el año 2010 se realizó un proyecto acerca de coliformes fecales en el embalse de la ESPOL, estudio comprendido entre los meses de noviembre y diciembre, los resultados que se obtuvieron de esta tesis indicaban que la cantidad que se encontró estaba dentro los parámetros permitidos por el TULAS, así como también se hicieron tomas de DBO, OD y temperatura que mostraban el comportamiento de estos parámetros durante esa época del año.

Otras investigaciones que se han realizado en el embalse fueron hechas por los estudiantes de la FIMCM, específicamente por las carreras de Biología Marina, Ingeniería en Acuicultura y Oceanografía en las distintas materias que tiene su pensum académico, sin embargo estas investigaciones son muy puntuales y sus resultados no son divulgados por los profesores.

1.5 Espectrometría de absorción atómica.

La espectrometría de absorción atómica es una técnica para determinar la concentración de un elemento metálico determinado en una muestra. Puede utilizarse para analizar la concentración de más de 62 metales diferentes en una solución y el resultado se expresa en mg/L.

El principio consiste en que los electrones de los átomos en el atomizador pueden ser promovidos a orbitales más altos por un instante mediante la absorción de una

cantidad de energía (es decir, luz de una determinada longitud de onda). Esta cantidad de energía (o longitud de onda) se refiere específicamente a una transición de electrones en un elemento particular, y en general, cada longitud de onda corresponde a un solo elemento. Como la cantidad de energía que se pone en la llama es conocida, y la cantidad restante en el otro lado (el detector) se puede medir, es posible, a partir de la ley de Beer-Lambert, calcular cuántas de estas transiciones tienen lugar, y así obtener una señal que es proporcional a la concentración del elemento que se mide.

En el estudio realizado por la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología del Instituto Politécnico Nacional de México en el año 1999, se empleo la técnica de espectrometría de absorción atómica, para el estudio cuantitativo de metales pesados en aguas residuales (cromo y plomo). Las concentraciones de cromo y cobre fueron las siguientes: 5.58 para el cromo y 0.343 ppm para el plomo. Se determinó que el metal en mayor concentración es el cromo; se conoce que la toxicidad del cromo produce efectos específicos a nivel celular, ya que pueden existir interacciones entre el metal y los sistemas enzimáticos, membranas celulares, organelos y sobre el metabolismo celular en general (Norma Oficial Mexicana NOM-AA-51-1981 Análisis de aguas, determinación de metales, método espectrofotométrico de absorción atómica).

El resultado de esta investigación refiere que con estos datos obtenidos se puede decir que las descargas de agua residual provenientes de los afluentes que se descargan en el Río San Javier no cumplen con los límites permisibles de características químicas propuestos por la Comisión Nacional del Agua y por lo

tanto representan un riesgo para el medio ambiente. (14)

En el caso estudio “Análisis de las aguas minerales de la provincia de Entre Ríos, Argentina” propuesto por la Universidad Nacional de Entre Ríos, Argentina; se realizó el estudio cuantitativo de metales pesados (hierro) mediante la técnica de espectrometría absorción atómica en aguas minerales provenientes de 9 diferentes tipos de termas de aguas minerales provenientes de la región. Llegando a la conclusión de que el agua posee un color rojizo debido a las altas concentraciones que posee de hierro, lo que la hace inadecuada para el consumo humano sin el previo tratamiento de esta para reducir el exceso de hierro.

En la investigación realizada por el departamento de Ingeniería Química de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, México; denominada; se emplea la técnica de espectrometría de absorción atómica identificar los siguientes metales: Cromo, hierro, zinc, y níquel, en dos muestras diferentes de aguas residuales: Aguas residuales tratadas y aguas residuales sin tratamiento previo, utilizando 4 tipos distintos de coagulantes para remover los metales pesados de las aguas residuales: Cloruro de zinc, cloruro de níquel, cloruro férrico y cloruro de cromo. Los resultados obtenidos muestran que el coagulante cloruro férrico posee el mejor nivel de remoción de los metales usados en este estudio. (16)

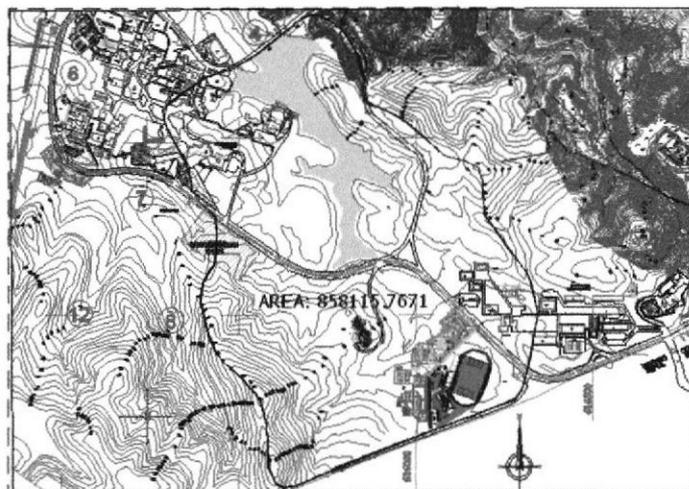
CAPITULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 AREA DE ESTUDIO.

El embalse ESPOL fue uno de los proyectos emprendidos por el Departamento de Planificación de la ESPOL con el fin de tener una carretera de circunvalación que una a la Facultad de Tecnología con la de Ingeniería, construido y diseñado por el Ing. Miguel Ángel Chávez con el nombre de Presa I. Se encuentra rodeado por el Cerro Azul y la parte sur de la Cordillera Chongón y Colonche.

Posee un área total de espejo de agua de 4,5 hectáreas, ubicado en la cota 80 cuyo entorno oscila entre la cota 77 y la 105 (Cadena, m., Yáñez, A. 2002).



Fuente: Unidad de Planificación ESPOL (2005)
 Figura 4: Mapa Embalse ESPOL

2.2 MUESTREO.

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



Figura 5: Puntos de muestreo del Embalse ESPOL
 Fuente: Google Earth.

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

Tabla # I: Coordenadas Geográficas de los Puntos de Muestreo.

2.3 TAMAÑO DE 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 (Envase de vidrio Bebida energizante de Gatorade) con sus dos respectivas replicas, los puntos de muestreo serán localizados con ayuda de un GPS durante la primera semana de los meses de Junio a Noviembre.

2.4 ANALISIS DE LA MUESTRA.

Preparación de la *Anabaena sp.* 4337:

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, Na_2CO_3 , 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 aereados con CO_2 que tuvieron un filtro esterilizado y con ciclos de 12 horas con luz y 12 horas sin luz.

Una vez climatizada la bacteria se extrajo 50 ml del medio de cultivo en la fase logarítmica tardía es decir a los 4 días de crecimiento.

Controles:

Los controles que se usaron para comparar las muestras de agua obtenidas por los muestreos serán 2:

El primer control es una muestra de agua que carezca totalmente de metales pesados y se compró de un laboratorio comercial, la cual nos permitió comparar un ambiente que no posea contaminación alguna por metales pesados como plata, cobre, mercurio, zinc y plomo y que nos sirvió como un control negativo.

El segundo control fue la muestra de agua pura, a la cual se le agregó concentraciones bajas de los elementos de estudio con la cual se pudo determinar la concentración menor a la que el bioindicador expresó la luminiscencia.

Análisis de las muestras 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), con ayuda de un agitador mezclamos los microorganismos en el agua.

La luminiscencia se midió a los 30 minutos de haber expuesto la muestra a la bacteria, que luego de haber transcurrido el tiempo deseado se colocó en una cubeta de 50x12 mm y con la ayuda de un luminómetro Bio Fix que posee un detector de fotones de alta densidad, se midió una longitud de onda de 380-630 nm rango en el cual se encuentra la longitud de onda producida por el bioindicador. El equipo posee un display gráfico, el cual debe ser conectado a un ordenador RS232 para la lectura de los resultados.

2.5 CUANTIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE PLATA, COBRE, MERCURIO, ZINC Y PLOMO EN MUESTRAS POSITIVAS.

Las muestras de agua que presentaron positivos a la presencia de metales pesados fueron enviadas a un laboratorio especializado para su análisis, donde se identificó y cuantificó los metales que existen en las muestras a través del método de espectrometría de absorción atómica.

2.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Análisis de Luminiscencia:

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

Se estableció de una curva de calibración para poder encontrar el inóculo ideal de cuantificación de *Anabaena* sp. CPB 4337.

Métodos Estadísticos:

Zonificación; los datos fueron analizados con el uso de un análisis de similaridad para posteriormente utilizar un análisis de Cluster o Análisis de Conglomerados que es una técnica de estadística multivariante que divide un conjunto de objetos y grupos por similitudes, serviría para identificar las zonas con mayor contaminación por metales pesados en el embalse de la ESPOL.

CAPITULO 3:
PRESUPUESTO

PRESUPUESTO:		
<i>Personal involucrado directamente en el proyecto:</i>		Sueldo Mensual (Dólares)
Analy Guamán		700,0
Andrés Empuño		700,0
Miguel Jaramillo		700,0
<i>Personal involucrado directamente en el proyecto:</i>		
Consultor externo		
Materiales:	Unidades	Costo (dólares)
Laboratorio ESPOL		
GPS	2	560,0
Luminómetro Bio Fix Lumi 10	1	8500,0
Autoclave(14 lt)	1	3350,0
Auxiliar de macropipeteado	5	420,0
Pipetas de vidrio 10 ml	5	13,5
Fiolas 1000 ml	5	38,5
Tubos de ensayo (25 MM x 150 MM)	30	22,5
Aireador	5	100,0
Mangueras para aireador	5	10,0
Botellas Van Dorn	2	800,0
Macropipeteadores	3	240,0
Matraz Erlenmeyer	5	75,0

Reactivos:		
Medio BG 11 =		
Cepa Bacteriana:		
<i>Anabaena sp.</i> CPB 4337	908g	457,8
Muestras de agua:	Unidades	Costo (dólares)
Con metales pesados	77	7700,0
Pura (1000 ml)	1	400,0
Infraestructura:		
Laboratorio ESPOL	1	200,0
Otros gastos:		
Alquiler bote	2	500,0
Papelería		40,0
TOTAL PRESUPUESTO:		25069,5

CAPITULO 4:

BENEFICIARIOS

BENEFICIARIOS HUMANOS:

Las personas que se beneficiaran con este proyecto serian; los estudiantes y profesores de la Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar que realizan sus prácticas en el embalse tomando agua del lugar para realizar cultivos acuícolas de organismos como microalgas que son productores primarios, tilapias, viejas, langostas, que al terminar el proceso son usadas para el consumo humano sin tener en cuenta la bioacumulación de los metales pesados. Así como también la extracción de especies del lago de forma recreacional que luego son igualmente consumidas.

Instituciones como SEBIOCA, CENAE, viveros y áreas verdes de las diferentes facultades que se encuentran a los alrededores, utilizan el agua del embalse para regar los cultivos de las distintas especies vegetales, sin tomar en consideración la

cantidad de metales que posee el cuerpo de agua y las futuras consecuencias que pudiera traer.

Otros beneficiarios son los Equipos Especiales del GOE y Bomberos que realizan determinadas actividades en el lugar sin tener en cuenta el grado de contaminación del mismo.

Personas que realicen prácticas deportivas como canotaje y recreacionales como paseos en bote, al poseer un conocimiento del grado de contaminación del mismo evitarían inmersiones en el embalse y exposiciones innecesarias.

Y futuros proyectos donde utilicen el embalse para otras actividades tanto recreacionales como deportivas, donde se pudiera tomar en cuenta los lugares que presenten menor contaminación para la realización de las mismas.

BENEFICIARIOS AMBIENTALES:

Dentro de los beneficiarios ambientales encontramos a las distintas especies que habitan en el lago tanto de fauna así como también de flora que en la actualidad es limitada, así como también las diferentes especies que bajan del bosque protector a tomar agua al embalse y aquellas especies de aves que utilizan a las distintas especies que habitan en el lago y alrededores como fuente de alimento como aves, depredadores e incluso las especies domésticas que habitan cerca del lugar como perros y gatos. Mejorando de esta manera el ecosistema.

BENEFICIARIOS CIENTÍFICOS:

El estudio de metales pesados en el embalse de la ESPOL usando una bacteria recombinante puede servir para futuros estudios de toxicidad en diferentes cuerpos de agua dulce, así como también el uso de la genética para la mejora de microorganismos que ya son en la actualidad usados como bioindicadores, haciéndolos más sensibles y más confiables el uso de los mismos.

CAPITULO 5:
RESULTADOS

1. 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.
2. 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.
3. 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.

RECOMENDACIONES:

1. Se recomienda la realización de estudios de sustancias químicas inorgánicas, nutrientes vegetales inorgánicos, sedimentos y materiales suspendidos que aportarían con un estudio completo de contaminación en el Embalse ESPOL.
2. Depuración de las descargas de aguas de las diferentes Unidades Académicas y Centros de Investigaciones como SEBIOCA.
3. Realización de estudios, mediante la obtención de huellas génicas, de la biodiversidad de microorganismos que puedan ser usados como bioindicadores.
4. Usando el modem MINTEQA2, que en estudios realizados en otras instituciones, se ha comprobado una gran confiabilidad en los análisis de sus datos. Por lo tanto, el uso de este instrumento proveería la inmovilización de las cepas con el objetivo de construir biosensores de mayor confiabilidad.
5. Hacer un estudio cuantitativo de iones, cationes y aniones presentes en el agua del embalse.

CONCLUSIONES

1. Las muestras de agua analizadas en el embalse ESPOL posiblemente tendrán concentraciones comprendidas entre el control número 1 es decir, la muestra de agua que carece de metales pesados y el control número 2, que es la muestra de agua donde los metales pesados fueron agregados en el laboratorio a concentraciones elevadas.
2. La zonificación del embalse que presenten contaminación puede servir para una diversificación de actividades que se realizan en la actualidad en el lugar.
3. Establecimiento de un medidor eficiente que pueda determinar la concentración de metales pesados para ahorrar cantidad de análisis.
4. La realización de este proyecto podría determinar la limitación de actividades como extracción de agua del lago para actividades acuícola realizas por los estudiantes de la FIMCM ya que su productos son consumidos.
5. El estudio de la toxicidad del embalse ESPOL puede servir como una línea base para futuras investigaciones, así como también para proyectos de recuperación y mejoramiento de la calidad del agua en el embalse de la ESPOL.
6. En la actualidad existen varios usos de microorganismos como bioindicadores por ejemplo en la contaminación de alimentos, en la calidad de agua y de suelo, para le medición de condiciones de asepsia en

hospitales, biorremediaciones entre otros, los cuales han tenido resultados positivos y confiables.

7. Este estudio servirá para que los funcionarios de la Universidad de la ESPOL presten atención a la descarga de efluentes y que se les de un respectivo y adecuado tratamiento a las mismas.

BIBLIOGRAFIA

1. Jannasch H, Peter W; *Advances in Aquatic Microbiology*; Volumen 3; Editorial Academic Press; Pag. 49,50.
2. 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.
3. Madigan M; John M; *Biología de los microorganismos Décima Edición*; Editorial Pearson Prentice Hall; Pag. 419,420,421.
4. Carlos Álvarez Carreño; *Diseño de circuitos genéticos para la traducción de reacciones químicas en fenotipos seleccionables (trampas genéticas), basados en la interacción entre reguladores transcripcionales y sus moléculas efectoras.*
5. Atlas R, Richard B; *Ecología Marina y Microbiología ambiental*; Cuarta edición; Editorial Addison Wesley; Pag. 416
6. Rafael Vicente Candela ; *Evolución de la Toxicidad y la biodegradabilidad de contaminantes persistentes en medios acuosos durante un proceso de fotocatalisis solar empleando diferentes técnicas analíticas*; Abril 2007
7. Fernández-Piñas F, González-García C, Rodea-Palomares I, Leganés F. Departamento de Biología. Universidad Autónoma de Madrid. Canto blanco. 28049 Madrid.

8. Barbara J, Rice D, Haselkorn R; Identification of blue green algal nitrogen fixation genes by using heterologous DNA hybridization probes; Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America; Vol. 77, N. 1; Pag. 186-190; 1980.
9. Madrid Mateo, P., Perona E., Douterelo I., Rodríguez V., Loza V. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid
10. Iván Saltos; Plan De Manejo Ambiental Del Campus Gustavo Galindo-ESPOL- 1998 (mapa Planificación-ESPOL 2005)
11. Romero M, Diggle. S, Hedro, S, Cámara M; Quorum quenching activity in *Anabaena sp.* PCC 7120: Identification of AIIC, a novel AHL-acylase; Federation of European Microbiological Societies; 2008.
12. Rafael Blasco Plá. Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Genética Universidad de Extremadura.
13. Leo Yen-Cheng Lin, Progen Biotech Inc. and Edward A. Meighen Department of Biochemistry, McGill University, Bacterial Bioluminescence.
14. Iván Benito García, Universidad Autónoma de Madrid, "Ecotoxicología de contaminantes emergentes" 2009.
15. F. M. Melo Sanchez, C. Márquez Estrada, M. Juárez Juárez, F. J. Martínez Martínez, P. Miranda Reyes, L. F. Esquivel Ruiz, M. Juárez Juárez.

“Análisis de metales pesados en las aguas residuales del río San Javier y repercusiones en la salud e impacto ambiental”. 1994.

16. Eduardo Soto Regalado, Tomás Lozano Ramírez, Juan Manuel Barbarín Castillo, Mónica Alcalá Castillo. “Remoción de metales pesados en aguas residuales mediante agentes químicos”. Abril-Junio 2004, Vol II.

