

UNIVERSIDAD DEL MAR

Campus Puerto Ángel



Obtención y caracterización de un exopolisacárido proveniente de la arquea *Haloterrigena hispanica*

Tesis

Que para obtener el título profesional de:

Ingeniero Ambiental

Presenta:

Laura Yessenia Vásquez Martínez

Director de tesis

Dr. Edson Edinho Robles Gómez

Puerto Ángel, Oaxaca 2021

Resumen

En este trabajo se estudió la Arquea *Haloterrigena hispanica*, considerando que en un medio M372 excreta exopolisacáridos que poseen la capacidad de coagular-flocular un sistema modelo caolín-agua, observando una actividad de floculación similar a la del sulfato de aluminio; floculante empleado frecuentemente en procesos de tratamiento de agua. Para la obtención y purificación del exopolisacárido se emplearon métodos cromatográficos (Cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de exclusión molecular). La identificación de monómeros de manosa en la estructura del exopolisacárido se dio por técnicas de Cromatografía en Capa Fina en conjunto con espectrometría de masas (MALDI-TOF) que a su vez revelaron la presencia de un “core” en la molécula y una masa molecular total del EPS de 3759.26 Da. Los análisis de Infrarrojo de Transformada de Fourier y Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno confirman la presencia de grupos funcionales propios de carbohidratos e identifican los posibles grupos funcionales como amida y carboxilo presentes en el “core” del polisacárido. Esta información permite incrementar la biblioteca molecular de floculantes naturales disponibles y establecer relaciones estructurales y moleculares con otros floculantes naturales reportados.

Palabras clave: Exopolisacárido, *Haloterrigena hispanica*, tratamiento de agua, actividad de floculación, elucidación estructural.

Abstract

This study establishes that the Archeon *Haloterrigena hispanica* in an M372 medium excretes exopolysaccharides that have the capacity to flocculate a kaolin-water model system, observing a flocculation activity like that of aluminum sulfate, a flocculant frequently used in water treatment processes. To obtain and purify the exopolysaccharide, chromatographic methods were used (Ion exchange chromatography and molecular exclusion chromatography). The identification of mannose monomers in the structure of the exopolysaccharide was given by thin layer chromatography techniques together with MALDI-TOF which in turn revealed the presence of a "core" in the molecule and overall PW of EPS of 3759.26 Da. Fourier Transform Spectroscopy and Nuclear Magnetic Resonance analyses permitted confirming the presence of functional groups of carbohydrates and identifying the possible functional groups such as amide and carboxyl present in the "core" of the polysaccharide. This information obtained to increase the molecular library of available natural flocculants and to establish structural and molecular relationships with other reported bioflocculants.

Keywords: Exopolysaccharide, *Haloterrigena hispanica*, water treatment, flocculation activity, structural elucidation.

Dedicatoria

A mi madre, Isabel, quien ha estado a mi lado brindándome su apoyo incondicional, comprensión, y sobre todo su amor, es mi motor para seguir adelante. Este es nuestro logro, sin duda alguna gran parte es gracias a ti.

A mi hermano José Manuel por ser mi cómplice de travesuras y aventuras.

A mi tía Mili por todo su apoyo, consejos y amor que en vida me dio, no sabe la falta que nos hace, sé que donde quiera que este me cuida y se siente orgullosa de mí.

A todos mis tías, tíos, primas y primos por ser las personas más amorosas y comprensibles que la vida me pudo dar, gracias por todo su cariño y apoyo, siempre motivándome para dar lo mejor de mí.

A mis sobrinas y sobrinos quienes me contagian de esa alegría e inocencia que los caracteriza, me hacen sacar al niño interior que llevo dentro y me alegran el alma.

Agradecimientos

A la universidad del Mar (UMAR) por ser mi casa de estudios. En especial a los Laboratorios de Ingeniería Ambiental por brindarme las condiciones necesarias para llevar a cabo parte de este proyecto.

A mi director de tesis, el Dr. Edson Edhino Robles Gómez, por creer en mí, por brindarme su confianza y apoyo en todo momento. Gracias por darme la oportunidad de trabajar con usted.

Al Laboratorio de Análisis de Ficotoxinas, en especial a la Dra. Ivonne Sandra Santiago Morales por donar el cultivo de la arquea *Haloterrigena Hispanica*, el cual fue fundamental para el desarrollo de este proyecto.

A la M.C María del Rocío Gutiérrez, al M.C Cervando Sánchez, al M.C Cristóbal Santos y al Dr. Jorge Castro por sus observaciones y consejos. Gracias por formar parte de mis sinodales.

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), particularmente al laboratorio de Bio-macromoléculas del instituto de química, a la Dra. Erika Antúnez y el Dr. Manuel Soriano quienes participaron en la realización de los análisis de FTIR, RMN y MALDI- TOF.

A los maestros de la UMAR por compartir parte de sus conocimientos, me llevo todo lo aprendido.

A la Q.F.B Coral Mirón por mantener siempre una chispa de alegría en el laboratorio, haciendo amena las largas jornadas de trabajo.

A mi madre, Isabel, que sin el apoyo de ella y de la familia no hubiera podido llegar en donde ahora estoy.

Al Ing. Marlo Sayeg por motivarme a realizar mi optativa en la cual me encamine a este proyecto, pero sobre todo por su amistad.

A mis colegas Alejandro, David, Nereida y Alexis, por su amistad, cariño y compañía, todos esos buenos momentos quedaran grabados en mi para siempre.



A Eduardo Cid, por compartir su sabiduría de la vida, las buenas conversaciones, consejos y apoyo.

A mis demás compañeros del “Hormiguero” Moya, Lalo, Liz, Luis, Chucho, Diego, y los que me faltan, gracias por los buenos y malos momentos que vivimos ha sido un gusto conocerlos, sobre todo convivir con ustedes. A los ambientales de otros semestres Jackie, Dianita, Liz, Pachuca y demás, que buenas aventuras.

A esas personas ajenas a la universidad, Migue y Cosmito, siempre alegrándome.

Puerto Ángel y sus alrededores gracias por albergarme durante toda esta estancia de mi formación, por la naturaleza, los paisajes y sobre todo su gente.

Gracias a la vida por este nuevo triunfo, gracias a todas las personas que me apoyaron y creyeron en mí.

Tabla de contenido

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1 Características generales del agua y sus contaminantes	4
2.2 Coloides: un tipo de sólidos en suspensión	6
2.3 Proceso de coagulación-floculación	6
2.3.1 Coagulación.....	7
2.3.2 Mecanismos de coagulación	8
2.3.3 Tipos de coagulantes.....	11
2.3.4 Floculación.....	12
2.3.5 Mecanismos de floculación	12
2.3.6 Parámetros y factores fisicoquímicos que influyen la floculación	13
2.3.7 Floculantes	13
2.3.8 Floculantes Naturales	15
2.4 Los polímeros como floculantes	15
2.4.1 Polímeros Naturales	15
2.4.2 Microorganismos productores de polisacáridos	16
2.4.3 <i>Haloterrigena hispanica</i>	17
2.5 Técnicas de purificación	17
2.5.1 Cromatografía de Intercambio Iónico	18
2.5.2 Cromatografía de Exclusión Molecular.....	18
2.5.3 Cromatografía en Capa Fina.....	19
2.6 Técnicas de caracterización estructural.....	19
2.6.1 Espectrometría de Masas MALDI-TOF	19
2.6.2 Espectroscopía Infrarroja de Transformada de Fourier (FTIR)	20
2.6.3 Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	20
3. ANTECEDENTES.....	22
4. JUSTIFICACIÓN.....	25
5. HIPÓTESIS	26
6. OBJETIVOS	26
6.1 Objetivo General	26
6.2 Objetivos Específicos	26

6.3 Objetivos Metodológicos	26
7. MATERIALES Y MÉTODOS	27
7.1 Metodología	27
7.2 Obtención del cultivo y medio extracelular.....	28
7.3 Obtención de exopolisacáridos.....	28
7.4 Evaluación de la actividad de floculación.....	28
7.5 Purificación del biofloculante	29
7.5.1 Cromatografía de Intercambio Iónico	29
7.5.2 Cromatografía de exclusión molecular	30
7.6 Caracterización estructural del biofloculante	30
7.6.1 Resonancia Magnética Nuclear	30
7.6.2 Espectroscopia Infrarroja de Transformada de Fourier (FTIR)	31
7.7 Identificación de carbohidratos presentes en el floculante	31
7.7.1 Hidrólisis Ácida	31
7.7.2 Cromatografía en capa fina.....	31
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
8.1 Obtención de la muestra EHH-1	32
8.2 Purificación de bio-floculantes	33
8.2.1 Paso 1: Precipitación con etanol (96%).....	33
8.2.2 Paso 2: Cromatografía de Intercambio Iónico	35
8.2.3 Paso 3: Cromatografía de Exclusión Molecular.....	40
8.3 Caracterización estructural.....	42
8.3.1 Cromatografía de capa fina.....	42
8.3.2 Espectrometría de masas MALDI-TOF	43
8.3.3 Correlación entre los datos obtenidos por MALDI-TOF y cromatografía en capa fina.....	44
8.3.4 Espectroscopia Infrarroja de Transformada de Fourier (FTIR)	45
8.3.5 Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno	46
8.4 Análisis adicionales	47
9. CONCLUSIONES.....	48
10. PERSPECTIVAS	49
Apéndice A	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proceso de coagulación y floculación de un sistema coloidal.....	7
Figura 2 Doble capa de una partícula coloidal.....	9
Figura 3. Energía potencial de interacción entre dos coloides.....	9
Figura 4 Representación de la estabilidad de los coloides presentes en el agua, cuando se adiciona un coagulante.	10
Figura 5 Formación de puente químico con polímero, las moléculas del polímero contienen grupos funcionales que pueden adsorber las partículas coloidales.....	11
Figura 6 Contacto entre dos partículas, i y j, moviéndose bajo la influencia de un gradiente de velocidad dv/dz	13
Figura 7 Proceso de Floculación.....	14
Figura 8 Ejemplo de posibles señales generadas por un espectrómetro de masas MALDI-TOF al analizar una fracción proveniente de una separación cromatográfica..	19
Figura 9 Ejemplo de posibles señales generadas por un espectro infrarrojo de transformada de Fourier.	20
Figura 10 Ejemplo de posibles señales generadas por un espectro de ^1H - RM.	21
Figura 11 Metodología general de la obtención, purificación y caracterización del exopolisacárido obtenido de la Arquea <i>H. hispanica</i> crecida en un medio M372.	27
Figura 12 Prueba de floculación de la muestra EHH1.....	32
Figura 13 Precipitación con etanol (96%) de la muestra EHH-1 para la obtención de la muestra EHH-2.....	33
Figura 14 Evaluación de la actividad de floculación de la muestra EHH-1 y EHH-2 sobre sistema caolín-agua.....	34
Figura 15 Cinética de floculación de la muestra EHH-2 eluida con soluciones de NaCl 0, 100, 300, 600 y 1000 mM en una cromatografía de intercambio iónico.	35
Figura 16 Cromatografía de intercambio iónico, de la muestra EHH-2, utilizando como fase móvil soluciones de NaCl 0, 100, 300, 600 y 1000 mM.....	35
Figura 17 Cinética de floculación de la fracción de NaCl 100 mM comparando con el sulfato de aluminio (control positivo) y agua (control negativo).....	36
Figura 18 Cinética de floculación de la muestra EHH-2 eluida con soluciones de NaCl 10, 40, 70 y 100 mM en una cromatografía de intercambio iónico	38
Figura 19 Cromatografía de intercambio iónico de la muestra EHH-2, utilizando como fase móvil soluciones de NaCl 10, 40, 70 y 100 mM.....	38

Figura 20 Cinética de floculación de la muestra EHH- 2 eluida con soluciones de NaCl 100 y 130 mM en una cromatografía de intercambio iónico.	39
Figura 21 Cromatografía de intercambio iónico de la muestra EHH-2, utilizando como fase móvil soluciones de NaCl 100 y 130 mM	39
Figura 22 Cinética de la actividad de floculación en un sistema caolín-agua, a pH de 7.8, comparando las diferentes concentraciones de EHH-4 empleadas como floculante.	41
Figura 23 Cromatografía en capa fina.....	42
Figura 24 Espectro MALDI-TOF de la fracción 130.....	43
Figura 25 Ionización de la muestra EHH-4 en el ensayo de MALDI-TOF.....	44
Figura 26. Espectro infrarrojo de la muestra EHH-4.....	45
Figura 27 Espectro de resonancia magnética nuclear de la muestra EHH-4.	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los contaminantes del agua	5
Tabla 2. Clasificación de sólidos en suspensión	6
Tabla 3 Ecuación de regresión lineal obtenida sobre los valores de cambio de turbidez en el tiempo para la muestra EHH-2, usando como potencial floculante fracciones eluidas con soluciones de NaCl, 0, 100, 300, 600 y 1000 mM, en un sistema caolín- agua, en un intervalo de tiempo de 0 a 30 min.....	36
Tabla 4. Ecuación de regresión lineal sobre los valores de cambio de turbidez en el tiempo de la fracción 100 con NaCl 100 mM, en comparación con un floculante comercial, en un intervalo de tiempo de 0 a 30 min.....	37
Tabla 5 Ecuación de regresión lineal obtenida sobre los valores de cambio de turbidez en el tiempo para la muestra EHH-2, usando como potencial floculante fracciones eluidas con soluciones de NaCl 10, 40, 70 y 100 mM en un sistema caolín agua, en un intervalo de tiempo de 0 a 30 min.	38
Tabla 6 Ecuación de regresión lineal obtenida sobre los valores de cambio de turbidez en el tiempo para la muestra EHH-2, usando como potencial floculante fracciones eluidas con soluciones de NaCl 100 y 130 mM, en un sistema caolín- agua, en un intervalo de tiempo de 0 a 30 min.	40
Tabla 7 Ecuación de regresión lineal obtenida sobre los valores de cambio de turbidez en el tiempo de las concentraciones de EHH-4 empleadas como floculante en un sistema caolín- agua a pH 7. 8, en un intervalo de tiempo de 0 a 30 min.	42