



INGENIERÍA BIOQUÍMICA

PROYECTO DE RESIDENCIA PROFESIONAL

*Evaluación de los productos de degradación de
decaclorobifenilo por Acinetobacter calcoaceticus en cultivo
líquido”*

Laboratorio de biotecnología

FECHA DE INICIO

26/Agosto/2014

FECHA DE TÉRMINO

26/Diciembre/2014

ASESOR INTERNO

Dra. Rocío Meza Gordillo

PRESENTA

Verónica del Carmen Velasco Sustaita

NÚMERO DE CONTROL

10270463

Tuxtla Gutiérrez Chiapas a 15 de diciembre del 2014

I.-JUSTIFICACIÓN

Los efectos de la contaminación del medio ambiente, sus causas y las consecuencias de la exposición de los sistemas biológicos a agentes nocivos es lo que motiva a la investigación de tecnologías más efectivas, rápidas y ecológicas para recuperar suelos contaminados.

Si se toman en cuenta los efectos contaminantes de los bifenilos policlorados y el riesgo potencial que estos implican para el organismo humano por su incorporación a través de la cadena alimenticia, se comprende la importancia de poder encontrar la metodología más eficiente que puede aminorar los problemas causados por la bioacumulación y biomagnificación de estos contaminantes.

II.-OBJETIVOS

2.1.- OBJETIVO GENERAL

Identificar mediante cromatografía de gases los productos de degradación de DCB generados por la cepa *Acinetobacter calcoaceticus*.

2.2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Acondicionar la cepa a diferentes sustratos
- Validar la metodología de extracción de decaclorobifenilo en caldo y biomasa
- Identificar los productos de degradación usando cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas

III.-PROBLEMÁTICA A RESOLVER

- Al término del proyecto “Evaluación de los productos de degradación de decaclorobifenilo por *Acinetobacter calcoaceticus en cultivo líquido*” se pretende conocer los productos de degradación de de BPC’s mediante la cromatografía de gases.

IV.-PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS.

Materiales y métodos:

4.1.- Materiales.

Decaclorobifenilo C₁₂Cl₁₀.

Peso molecular 499 g/gmol

Pureza 99.2%

Lote No. LB75738

Supelco Analytical

4.1.1-Reactivación de la cepa

Se procedió a reactivar la cepa *Acinetobacter calcoaceticus*, en medio PY Ca²⁺ líquido y sólido cuya composición del medio fue: 3 g extracto de levadura, 5 g de peptona de caseína, 15 g de agar; por aparte se preparó una solución de cloruro de calcio 0.7 M. Tomándose 2 asadas del tubo con cultivo previamente descongelado y se adicionaron a las cajas Petri previamente preparado y solidificado utilizando la técnica de estría cruzada; en el caso de los tubos se tomaron 2 asadas y se mezcló por vortex. Posteriormente se dejó incubar a 30°C por 24. Después de ello, se tomó una muestra de la caja con una asada y se colocó en un portaobjetos, realizándose una tinción de gram, el portaobjetos teñido se colocó en el microscopio óptico marca Carl Zeiss y se observó en el objetivo 100X.

4.1.2.-Adaptación del inóculo a fenol

La cepa *Acinetobacter calcoaceticus* previamente reactivada, se inóculo con el medio mínimo de sales (MMS) cuya composición fue: 5 g de NH₄Cl, 1.5g de K₂HPO₄, 0.5g de KH₂PO₄, 0.2g de MgSO₄ · 7H₂O, 0.01g de extracto de levadura, 0.25 de C₆H₆O, se adicionará agua destilada, se calentó a ebullición, después se esterilizó a 121 lb por 15 minutos, dejándose enfriar hasta 55°C, se tomaron 50 mL del medio y se colocaron en un matraz, se adicionó una suspensión de

Acinetobacter calcoaceticus en una proporción de 10 % (v/v), los matraces se incubaron a temperatura ambiente (25- 30°C), con una agitación de 125 rpm. Después de adaptar la cepa a fenol se procedió a realizar la curva patrón de crecimiento de la cepa *Acinetobacter calcoaceticus* OTEC 02, esto se realizó por 14 horas, realizándose monitoreos cada 2 horas, midiendo el aumento de biomasa por densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm, a su vez se realizó vaciado en placa.

4.1.2.1 Adaptación del inóculo a Aroclor 1242, 1254,1260

Después de adaptar de la cepa a fenol, se procedió a adaptar a Aroclor, en sus distintos grados de cloración (1242, 1254, 1260), esto en medio Mineral Salino sin fenol, se procedió a preparar y esterilizar el medio, dejándose enfriar se adiciono 22.5 mL de medio y después 2.5 mL de Aroclor, esto en condiciones asépticas; dejándose agitar a 120 rpm por 24 horas. Después se adiciono 2.5 mL de la cepa previamente crecida en fenol; el crecimiento se observó por inspección visual. Este procedimiento se realizó primero con Aroclor 1242, luego con Aroclor 1254 y finalmente Aroclor 1260.

4.1.2.2. Adaptación del inóculo a decaclorobifenilo

El inóculo adaptado a fenol, sirvió como semillero para la siembra en decaclorobifenilo con medio mineral salino sin fuente de carbono; dejándose a 125 rpm a temperatura ambiente, y se midió el aumento de biomasa por medio de densidad óptica $\lambda=600$ nm cada 24 horas, para este experimento se usará un diseño experimental Categórico Individual, que consiste en un factor (decaclorobifenilo) y 4 niveles para este factor: 0, 50, 150 y 250 ppm.

4.2.- Desarrollo del experimento

Se adicionaron a un matraz enlemeyer, 50 mL de medio MMS con decaclorobifenilo. Para preparar el contaminante, se tomo 1 mg de decaclorobifenilo, el cual se disolvio con 100 mL de pentano, esta solución tiene una concentración de 1000 ppm, a partir de esta solución se hicieron diluciones

hasta obtener las concentraciones de 50, 150 y 250 ppm (Adesbusoye *et al.*, 2007). Se adiciono al matraz una suspensión de *Acinetobacter calcoaceticus* en una proporción de 10 % (v/v), el matraz se incubo a temperatura ambiente, con una agitación de 150 rpm por 162 horas, se realizaron monitoreos cada 2 horas hasta completar las 24 horas y posteriormente hasta las 36, después se hicieron los monitoreos cada 36 horas, esto se realizo por triplicado y con su respectivo blanco (Cisneros, 2011)

4.3.-Extracción de decaclorobifenilo

Se adicionaron pentano (1:1) al medio de cultivo, después se uso vortex por diez minutos, luego se sonifico por 40 minutos; después con un embudo de separación se almaceno la fase orgánica y esto se repitió dos veces más (Adebusoye *et al.*, 2007).

4.4.-Cuantificación de decaclorobifenilo

Se tomaron tubos Falcón con la muestra extraída y concentrada en 1 mL aproximadamente para resuspenderlas en 5 mL de pentano (98%), utilizando una pipeta de 5mL. La muestra se agito durante 5 min en un Vortex para una mejor homogenización. Después la muestra de 1 μ L se inyecto mediante una microjeringa de 10 μ L a un cromatógrafo de gases (GC) marca Agilent Technologies modelo 5975 con detector de espectrometría de masas (EM) modelo 597C VLMSD, empleando una columna cromatográfica PE-XLB con dimensiones 30m x 0.25 μ m x 0.25mm, utilizando como gas acarreador He a 16 psi, la temperatura de inyección fue de 110°C, la del detector de 150°C y la temperatura inicial 110°C por 0.5 min. El programa de temperaturas fue de 110°C - 300°C - 15°C/min y de 300°C - 320°C por 5 min y la temperatura final fue de 320°C, mientras que el flujo se mantuvo a 1.4 mL/min, el equipo estuvo en modos Splitless, en un intervalo de 50- 500 unidades de masa atómica (amu) (EPA, 2003).

Previamente a la lectura de las muestras en el CG se realizara una curva patrón de pentano con concentraciones conocidas de BPC's que serán desde 5- 100 ppm, se inyectará 1 μ L de las soluciones preparadas, el estándar del experimento será el decaclorobifenilo (EPA, 2003).

X.-RESULTADOS

5.1.-Reactivación de la cepa:

En la figura 1, se observa el crecimiento de *Acinetobacter calcoaceticus* en caja observándose colonias cóncavas, lisas, opacas, cuyo diámetro es de 0.1-0.5 mm, mucosas y redondas.



Figura 1.- *Acinetobacter calcoaceticus*
(crecimiento en caja).

Después de ello se realizó la tinción de Gram, observándose coco bacilos, gram negativos (figura 2).

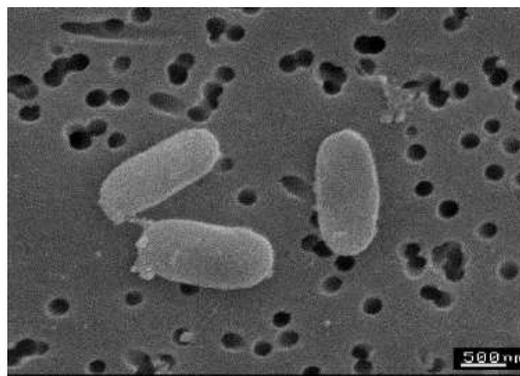
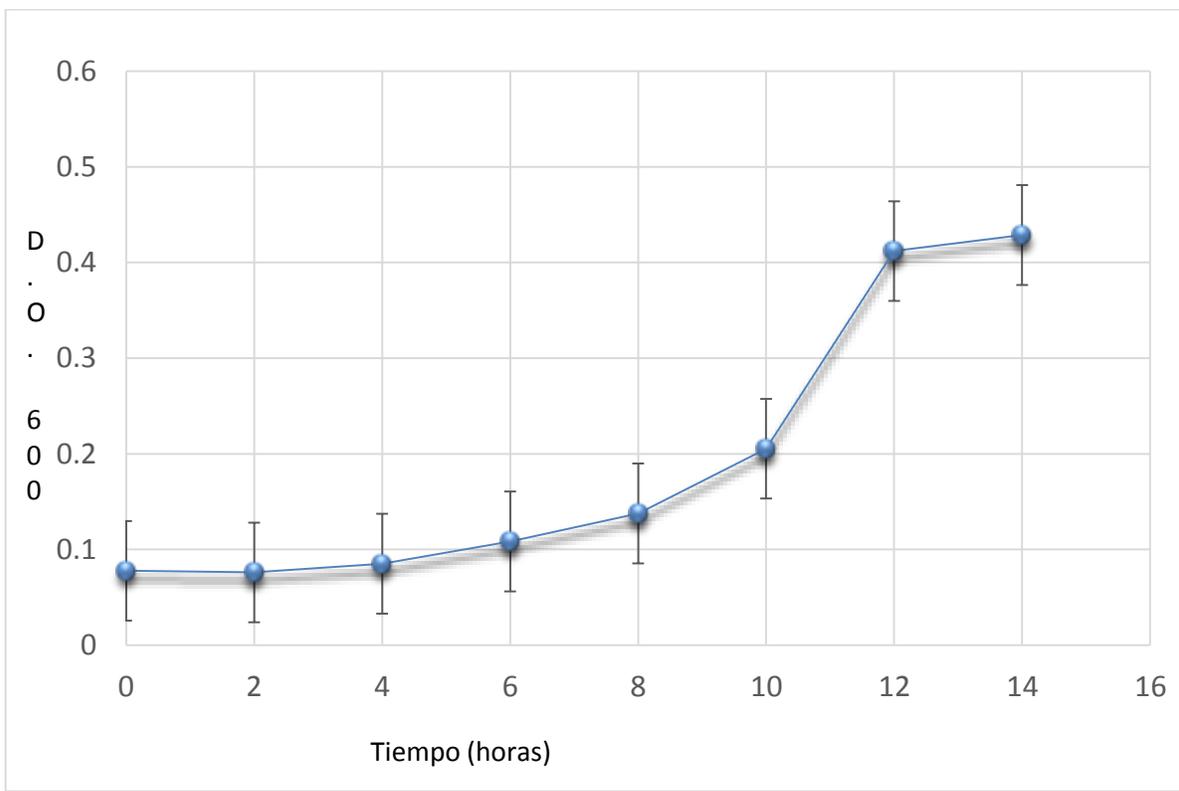


Figura 2.- Foto microscópica de
Acinetobacter calcoaceticus.

5.2.-Adaptación a diferentes sustratos

Se observó que la cepa *Acinetobacter calcoaceticus* creció en 5 días en fenol, después se realizó su respectiva cinética de crecimiento, la cual se observa en la gráfica no. 1



Gráfica 1.- Cinética de crecimiento de *Acinetobacter calcoaceticus* en fenol.

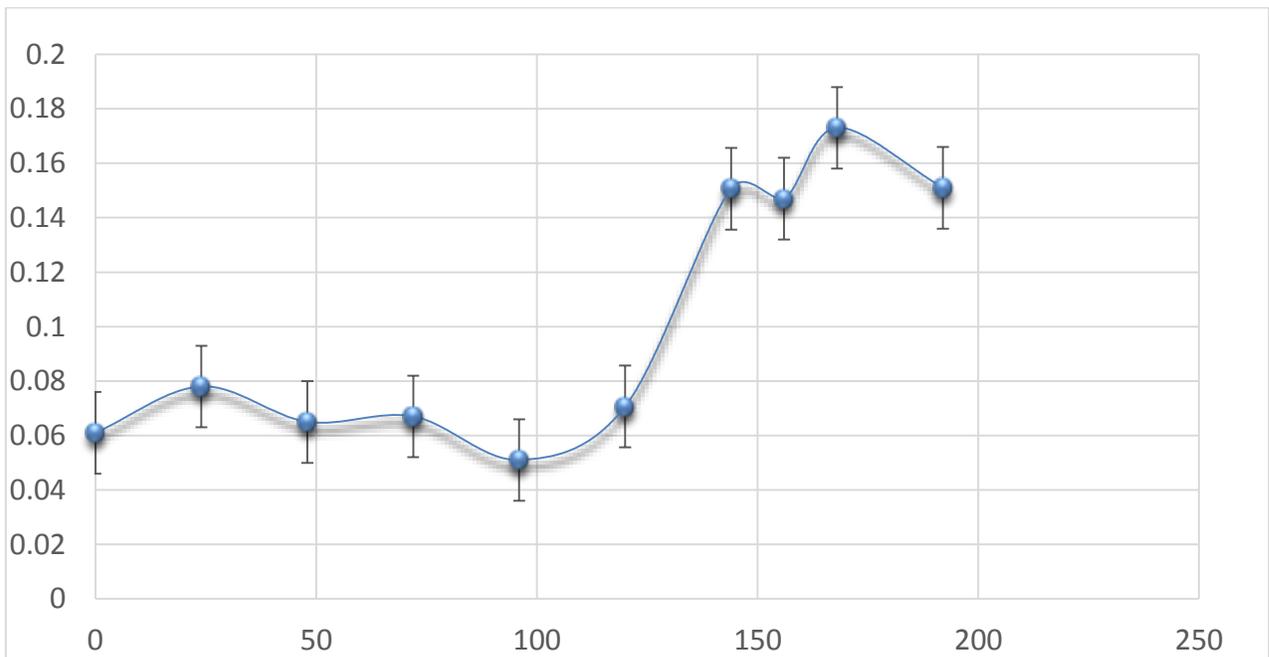
Podemos observar que de la hora 0 a la 6 esta en fase lag, arrancando su fase log de la hora 8 a la 12, después entra a fase estacionaria.

Después de realizar esta cinética se procedio a inocular en diferentes Arocloros (mezclas de BPC's con diferente grado de cloración), en la tabla 1, se observa la densidad óptica al día 0 y al día 5 de los respectivos Arocloros usados, evidenciando el crecimiento y a la vez la capacidad que tiene la bacteria para crecer en este sustrato.

Tabla 1.-Densidad óptica obtenida con los diferentes Arocloros usados.

	Día 0	Día 5
Aroclor 1242	0.079	0.294
Aroclor 1254	0.076	0.305
Aroclor 1260	0.078	0.278

Respecto a la adaptación del inóculo a decaclorobifenilo, esto fue evidenciado mediante densidad óptica a continuación se muestra la cinética de adaptación (gráfica 2).



Gráfica 2.-Cinética de adaptación de *Acinetobacter calcoaceticus* en decaclorobifenilo.

5.3.-Cuantificación de decaclorobifenilo

No se logro cuantificar el decaclorobifenilo ya que todos nuestros cromatogramas nos indicaban linea base por lo cual creemos que el metodo de extraccion es la incorrecta.

XI.-Conclusión

Uno de los problemas que enfrenta México en la actualidad es el tratamiento de los residuos peligrosos que generan los diversos procesos industriales. Dentro de estos residuos se encuentran los bifenilos policlorados (BPCs), que se han convertido en un grave problema ambiental.

Queremos crear alternativas de tratamiento empleando microorganismos que se Están estudiando para disminuir su presencia del medio ambiente.

Nosotros pudimos observar que efectivamente la eliminación de BPCs es posible con *Acinetobacter calcoaceticus* ya que esta bacteria es capaz de obtener su fuente de carbono de diversos compuestos entre ellos los BPCs, cabe mencionar que aun se determinara cuales son los productos de degradacion mediante la cromatografia.

La eliminación de los BPCs en el medio ambiente depende del grado de cloración del bifenilo, y ahí dependerá de que tal efectiva será la degradación de los BPCs. En general, la persistencia de los BPCs aumenta con el grado de cloración y por lo tanto aumenta su difícil remoción. Por las características de estabilidad que presentan los BPCs, resulta difícil su disposición y tratamiento mediante otros métodos. Cabe mencionar que aun se determinara cuales son los productos de degradacion mediante la cromatografia.

XII.-Competencias

Capacidad de análisis y síntesis

Eficacia para identificar un problema y los datos pertinentes al respecto, reconocer la información relevante y las posibles causas del mismo

Toma de decisiones

Capacidad de trabajo en un equipo

Capacidad de comunicarse con expertos en otras áreas

Capacidad de aplicar los conocimientos en la práctica

VIII.-Bibliografía

1._Abraham, W-R., Nogales, B., Golyshin, P.N., Pieper, D.H. y Timmis, K.N. (2002) Polychlorinated biphenyl-degrading microbial communities in soils and sediments, *Current Opinion in Microbiology*, 5(3), 246-253.

2._Adebusoye, S., Ilori, M., Picardal, F., Amund, O. 2008. Extensive biodegradation of polychlorinated biphenyls in Aroclor 1242 and electrical transformer fluid (Askarel) by natural strains of microorganisms indigenous to contaminated African systems. *Chemosphere*. 73:126-132.

3._ALEXANDER M. Biodegradation and Bioremediation. 2 ed. Academic Press; 1999.

4._ANG EL, ZHAO H, OBRAD JP. Recent Advances in the Bioremediation of Persistent Organic Pollutants Via Biomolecular Engineering. *Enzyme Microb Technol*. 2005;37:487-496

5._ARP DJ, YEAGER CM, HYMAN MR. Molecular and Cellular Fundamentals of Aerobic Cometabolism of Trichloroethylene. *Biodegradation*. 2001;12(2): 81-103.

6._Brown, J., Lynch, M. 1983. Method for removing polichlorinated biphenyls from transformer oil. US patent N. 4,377,471. General Electric Company

7._Desouky, A. 2003. *Acinetobacter*: environmental and biotechnological applications. *African Journal of Biotechnology*. 2:71-74.

8._Eaton, D.C. (1985). Mineralization of polychlorinated biphenyls by *Phanerochaete chrysosporium*: a ligninolytic fungus, *Enzyme Microbiol Technol* 7, 194-196. Golden, R., Doull, J., Waddell, W. y Mandel, J. (2003) Potential human cancer risks from exposure to PCBs: a tale of two evaluations, *Critical Reviews in Toxicology* 33(5), 543-580.

9._Hartkamp-Commandeur, L.C.M., Gerritse, J., Govers, H.A.J.y Parsons, J.R. (1996). Reductive dehalogenation of polychlorinated biphenyls by anaerobic microorganisms enriched from dutch sediments, *Chemosphere* 32(7), 1275-1286. Hutzinger, O., Safe, S. y Zitko, V. (1974). *The chemistry of PCBs*, CRC Press Inc., USA.

10._Keum, Y.S. y Li, Q. X. (2004). Fungal laccase-catalyzed degradation of hydroxy polychlorinated biphenyls, *Chemosphere* 56, 23-30.

11._OCDE (1982). Report on the implementation by member countries of the decision by the council on the protection of the environmental by control of

polychlorinated biphenyls, Organization of Economic Co-operation and Development, *Env Chem* 81, 2.

12._OMS (1976). Polychlorinated biphenyls and terphenyls, en *Environmental Health Criteria* 2, World Health Organization, pp 85. Geneva.

13._OMS (1993). Polychlorinated biphenyls and terphenyls, en *Environmental Health Criteria* 140, 2da. Edición, World Health Organization, Geneva.

14._Quensen III, J.F., Boyd, S.A. y Tiedje, J.M. (1990). Dechlorination of four comercial polychlorinated biphenyls mixtures (Aroclors) by anaerobic microorganisms from sediments, *Appl Environ Microbiol* 56(8), 2360-2369.

15._Valli, K. y Gold, M.H. (1991). Degradation of 2,4-dichlorophenol by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*, *J Bacteriol* 173(1), 345-352.

16._ Vasilyeva G. K., Strijakova E.R. 2007. Bioremediation of soils and sediments contaminated by polychlorinated biphenyls. *Microbiology*, 76 (6): 639-653.

17._ Wesche, J., Hammer, E., Becher, D., Burcchardt, G., Schauer, F. 2005. The *bphC* gene-encoded 2,3-dihidroxybiphenyl-1.2-dioxygenase is involved in complete degradation of bibenzofuran by the biphenyl-degrading bacterium *Ralstoniasp.* SBUG 290. *Journal of Applied Microbiology*. 98:635-645.

18._ Wu, Q., Wiegel, J., 2000. Microbial reductive dehalogenation of polychlorinated biphenyls. *FEMS Microbiology Ecology*. 32: 1-15.