

RESIDENCIA PROFESIONAL
INGENIERÍA BIOQUÍMICA

TEMA

“EVALUACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS DE *Acinetobacter calcoaceticus* EN CULTIVO LÍQUIDO UTILIZANDO COMO SUSTRATO DECACLOROBIFENILO”

QUE PRESENTA:
Ariana Yaseli Zavala de la Cruz

NUMERO DE CONTROL
10270466

ASESOR
Dra. Rocío Meza Gordillo

1. JUSTIFICACIÓN

Por las características de estabilidad que presentan los BPC's resulta difícil su disposición y tratamiento, algunos de estos procesos son los métodos físicos, químicos y biológicos; de ellos, los comúnmente empleados son la incineración e hidrodecloración catalítica (López *et al.*, 2001). Muchos métodos biológicos se han aplicado en la investigación (Gómez *et al.*, 2013).

Estudios recientes de sistema de remoción biológica, han evidenciado que *Pseudomona putida* KF715, ha desarrollado el mecanismo de *meta*-ruptura para la degradación de BPC's (Furukawa *et al.*, 2004). La transformación de BPC's se realiza por dos procesos, anaerobio y aerobio. Los procesos anaerobios, remueven los cloros del anillo bifenílico sin causar ninguna daño a su estructura, mientras que los procesos aerobios oxidan al anillo, lo cual genera compuestos carbonados más pequeños y oxidados (Gómez *et al.*, 2013).

Los bifenilos altamente clorados (Cl>5) son más difíciles de degradar. Sin embargo, Furukawa y Fujihara (2008) destacan a *Dehalococcoides*, *Thermonagales*, *Chloroflexi* como cepas degradadoras de dichos compuestos, mientras que los bifenilos menos clorados (Cl<4) han sido mineralizados aeróbicamente por varias uniones microbianas estudiados en laboratorio; Abramowickz (1990) reportó que las cepas encargadas de realizar esta función son *Alcaligenes sp*, *Alcaligenes eutrophus*, *Alcaligenes faecalis*, *Pseudomonas sp*. *Acinetobacter sp*. Mientras tanto Cisneros, 2011 reportó el uso de *Acinetobacter calcoaceticus* en la degradación de fenol.

Por ello la biodegradación de los BPC's por microorganismos resulta una buena alternativa para eliminar su presencia del contorno, y este trabajo se valorará esta nueva tecnología para la remediación de suelos y sedimentos contaminados.

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar los parámetros cinéticos de *Acinetobacter calcoaceticus* en cultivo líquido utilizando como sustrato decaclorobifenilo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Adaptar la cepa *Acinetobacter calcoaceticus* utilizando BPC's como fuente de carbono.
- Determinar la concentración máxima no inhibitoria.
- Realizar la curva de crecimiento a diferentes concentraciones de decaclorobifenilo.
- Determinar los parámetros cinéticos de la cepa *Acinetobacter calcoaceticus* utilizando como sustrato decaclorobifenilo.

3. PROBLEMAS A RESOLVER

Al finalizar el proyecto “Evaluación de parámetros cinéticos de *Acinetobacter calcoaceticus* en cultivo líquido usando como sustrato decaclorobifenilo”, se pretendió reconocer los productos de degradación y/o destitución de BPC’s mediante el uso de *Acinetobacter calcoaceticus* OTEC 02 en medio líquido usando como único sustrato decaclorobifenilo.

4. PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS

8.1.- Cepa

La cepa utilizada durante el desarrollo del experimento fue *Acinetobacter calcoaceticus* ya que ésta ha sido usada en la degradación de fenol por Cisneros, (2011). La cepa pura se conservó en congelador marca Revco™ UxF, en tubos eppendorf con medio LB y glicerol al 30% a -20°C.

8.1.1-Reactivación de la cepa

La cepa contenida en él tubo se sembró en medio rico en sales para su reactivación. El medio de cultivo para reactivar la cepa estuvo compuesto como sigue: 10 g de manitol, 0.5 g de K_2HPO_4 , 0.2 g $MgSO_4$, 0.1 g de NaCl, 3 g $CaCO_3$, 3 g de extracto de levadura, 15 de agar bacteriológico y 2.5 mL de rojo Congo al 1%. Todos fueron disueltos en un litro de agua destilada, se esterilizo a 121 lb por 15 minutos en una autoclave, se colocó de 20- 25 mL de medio en cajas Petri. Para inocular la cepa se tomaron 5 μ L del tubo con cultivo y se adicione a las cajas Petri usando la técnica de estría cruzada. Subsiguientemente se incubo a 30°C por 24 horas en una incubadora. Para evaluar la viabilidad de la cepa, se tomo 1 μ L del tubo con cultivo, se colocó en un portaobjetos y se tiño con azul de metileno al 0.1%, colocándose el portaobjetos en el microscopio óptico y se observó en el objetivo 100X.

8.1.2.-Adaptación del inóculo a fenol.

La cepa *Acinetobacter calcoaceticus* ya reactivada, se inóculo en medio mineral salino (MMS) la composición fue la siguiente: 5 g de NH_4Cl , 1.5g de K_2HPO_4 , 0.5g de KH_2PO_4 , 0.2g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.01g de extracto de levadura, 0.25 de C_6H_6O , se adicione agua destilada, después se esterilizó a 121 lb por 15 minutos en autoclave, se tomaron 50 mL del medio y se colocaron en un matraz enlemeyer, 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 150 rpm.

Ya la cepa adaptada a fenol se procedió a realizar la curva patrón de crecimiento de la cepa *Acinetobacter calcoaceticus* OTEC 02, esto se realizó por 14 horas, se midió el aumento de biomasa por densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm

8.1.2.1 Adaptación del inculó a Aroclor 1242, 1254,1260.

Después de la adaptación de la cepa a fenol, se procedió a adaptar a Aroclor, en diferentes grados de cloración (1242, 1254, 1260), esto en medio Mineral Salino sin fenol, se preparo y esterilizo el medio, dejándose enfriar se adiciono 22.5 mL de medio y después 2.5 mL de Aroclor; se dejó en agitación a 120 rpm por 24 horas. Después se adiciono 2.5 mL de la cepa crecida en fenol; el crecimiento se observó por turbidez del medio. Se llevó a cabo primero con Aroclor 1242, después con Aroclor 1254 y finalmente Aroclor 1260.

8.1.2.2. Adaptación del inculó a decaclorobifenilo.

El inculo adaptado a fenol, sirvió como muestra para la siembra en decaclorobifenilo con medio mineral salino sin fuente de carbono; dejándose en agitación a 125 rpm a temperatura ambiente, y se midió el aumento de biomasa mediante la densidad óptica $\lambda=600$ nm cada 24 horas.

8.2.- Diseño experimental

Para este experimento se usó un diseño experimental Categórico Individual, que consiste en un factor (decaclorobifenilo) y 4 niveles para este factor: 0, 25, 50 y 75 ppm y tres repeticiones.

A continuación es detallado el diseño

Tabla 3.- Diseño experimental Categórico Individual, usado para la degradación de decaclorobifenilo por *Acinetobacter calcoaceticus*

Factor	Niveles			
Concentración de BPC's	0	25	50	75
Variable de respuesta	Concentración de BPC's			

8.3.- Desarrollo del experimento

Se adiciono a un matraz erlemeyer, 50 mL de medio MMS con decaclorobifenilo. Para preparar el contaminante, se tomó 1 mg de decaclorobifenilo, el cual se disolvio con 100 mL de pentano, esta solución tuvo una concentración de 1000 ppm, a partir de esta solución se hicieron diluciones hasta obtener las concentraciones de 25, 50 y 75 ppm (Adesbusoye *et al.*, 2007). Se adicionaron al matraz una suspensión de *Acinetobacter calcoaceticus* en una proporción de 10 % (v/v), el matraz se incubo a temperatura ambiente (25- 30°C), con una agitación de 150 rpm por 162 horas, se realizaron monitoreos cada 2 horas hasta las 24 horas y hasta las 36, después se hicieron los monitoreos cada 36 horas, esto se realizó por triplicado y con su respectivo blanco (Cisneros, 2011).

8.3.1.-Extracción de decaclorobifenilo

Al matraz con medio se le adicionó pentano (1:1), para obtener un buen mezclado se usó vortex por 5 minutos, después se hizo una extracción orgánica-acuosa, repitiendosé dos veces para la fase acuosa recuperada; se dejó concentrar por 24 horas en la campana de extracción (Adebusoye *et al.*, 2007).

8.3.2.-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. Después la muestra de 1µL se inyectó con una microjeringa de 10µL a un cromatógrafo de gases (GC) con detector de espectrometría de masas (EM), empleando una columna cromatográfica PE-XLB con dimensiones 30m x 0.25µm x 0.25mm, utilizando como gas acarreador He a 16 psi, la temperatura de inyección será de 110°C, la del detector de 150°C y la temperatura inicial 110°C por 0.5 min. El programa de temperaturas será 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 estará 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 realizó una curva patrón de pentano con concentraciones conocidas de BPC's desde 5- 100 ppm, se inyectó 1µL de las soluciones preparadas, el estándar del experimento fue el decaclorobifenilo (EPA, 2003).

5. RESULTADOS

Reactivación de la cepa:

En la figura 5, podemos observar el crecimiento de *Acinetobacter calcoaceticus* en caja, se observan colonias cóncavas, lisas, opacas, con diámetro de 0.1-0.5 mm, mucosas y redondas.



Figura 5.- *Acinetobacter calcoaceticus*
(crecimiento en caja).

Después de la reactivación de la cepa se realizó la tinción de Gram, observándose coco bacilos, Gram negativos (figura 6).

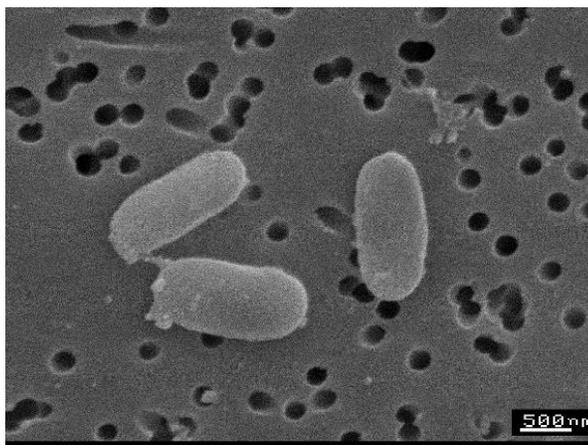
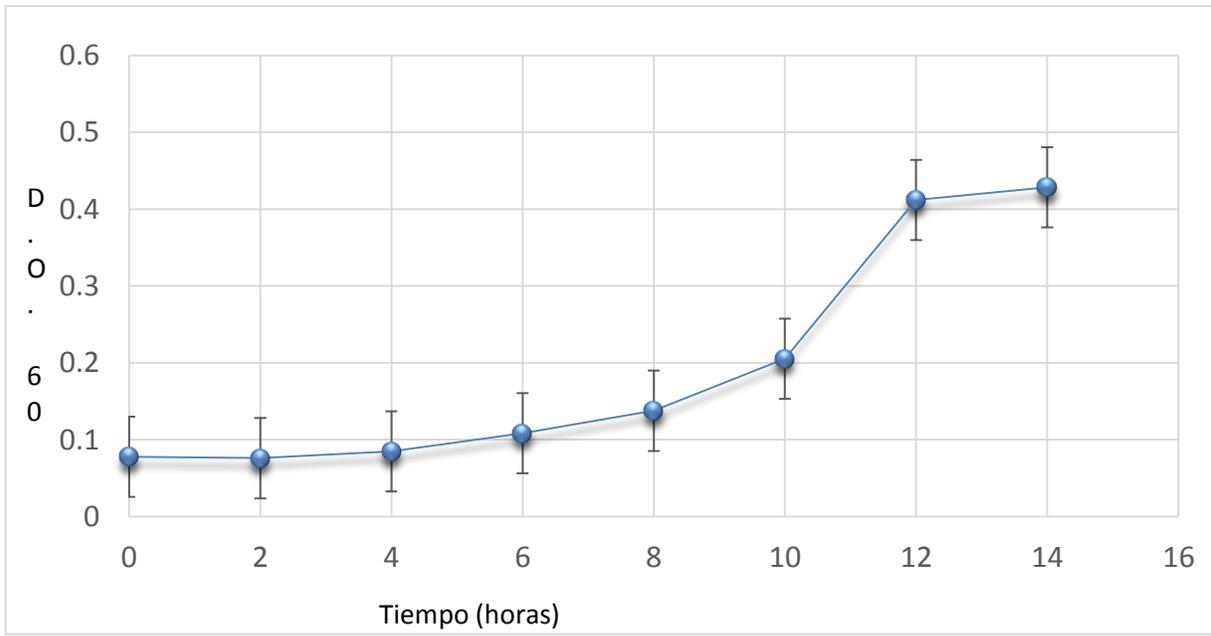


Figura 2.- Foto microscópica de
Acinetobacter calcoaceticus.

Adaptación adiferentes sustratos

Se observó que la cepa *Acinetobacter calcoaceticus* presentó la mayor lectura de densidad óptica (DO) a los 5 días utilizando como única fuente de carbono al fenol, después se realizó su respectiva cinética de crecimiento, como podemos apreciar en la gráfica 1.



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

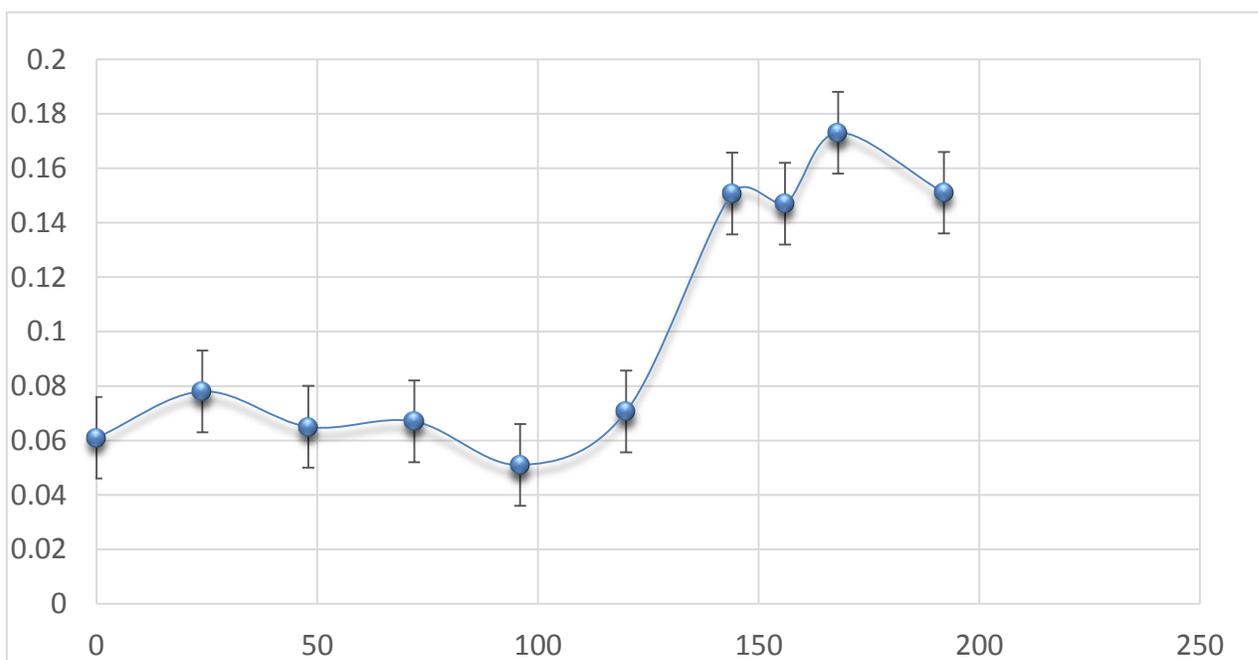
Podemos observar que de la hora 0-6 esta en la fase de adaptación, arrancando su fase exponencial de la hora 8-12, después entra a fase estacionaria.

Después de realizar esta cinética se procedió a inocular en diferentes Arocolores, los cuales se muestran en la tabla 4, así también podemos observar la densidad óptica de los diferentes Arocolores usados al día 0 y al día 5, con ello demostrando el crecimiento y a su vez la capacidad que tiene la bacteria para crecer en este sustrato.

Tabla 4.-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

En cuanto a la adaptación del inoculo a decaclorobifenilo se refiere, esto se demuestra por medio de la densidad optica y a continuacion se muestra la cinetica de adaptacion (gráfica 2).



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

6. CONCLUSIÓN

Por su naturaleza, los BPC's son difíciles de degradar . La biodegradación que para muchos contaminantes es el principal mecanismo de degradación, es limitada , ya que la dificultad de su degradación se atribuye a su estructura química estable (gran tamaño molecular y alto número de cloros), a su carácter xenobiótico y a su baja biodisponibilidad, dada su baja solubilidad en agua y fuerte adsorción en el suelo.

Para llevar a cabo la degradación microbiana (bioaumentación microbiana) de un sitio contaminado con BPC's hay que tener en cuenta que la contaminación es una mezcla de congéneres. Esto es especialmente clave cuando se trata de degradación biológica. Las enzimas que catalizan la degradación presentan un rango limitado de moléculas que pueden ser degradadas y hasta la fecha, no hay bacteria que degrade al BPC's en su totalidad, por ello es mejor contar con la comunidad microbiana.

Por lo tanto , el éxito de la biorremediación para tratar estos compuestos todavía es limitado. Por ello, las técnicas más usadas en el control de de la contaminación por estos compuestos son la incineración , la excavación y disposición en rellenos sanitarios de seguridad y el aislamiento del contaminante en el sitio, mediante capas que eviten o disminuyan su dispersión y su contacto con organismos del tope de la pirámide trófica.

La degradación secuencial anaeróbica-aeróbica es especialmente importante para BPC's, ya que los congéneres con mayor número de cloros se transforman exclusivamente en condiciones anaeróbicas en procesos de deshalogenación reductiva y los productos de dechlorinación, congéneres de menor número de cloros, se degradan exclusivamente en condiciones aeróbicas.

El metabolismo anaeróbico de BPC's se produce mediante deshalogenación reductiva. El proceso más común es la desclorización de un cloro en posición

meta o para situados entre dos cloros. El que lo sigue es la declorización de cloro en posición meta o para situados al lado de un cloro.

La biodegradación de BPC's ocurre, con enzimas no específicas o mediante enzimas altamente específicas que tienen como objeto aprovechar tales moléculas como fuentes de nutrientes y/o energía que aporta el crecimiento de dichos microorganismos.

Por lo tanto se considera que la bacteria del género *Acinetobacter* degrada hidrocarburos del suelo con una eficacia del 70% ya que se observó degradación de BPC's.

7. RECOMENDACIONES

Los estudios de degradación para valorar el potencial y condiciones medioambientales para el éxito de la biorremediación de un lugar contaminado, deben de ser desarrollados bajo condiciones controladas para poder determinar los porcentajes de remoción del contaminante, bajo determinadas condiciones físicas, químicas y biológicas en el lugar.

8. COMPETENCIAS DESARROLLADAS Y/O APLICADAS

- Capacidad de organizar y planificar.
- Capacidad de análisis y síntesis.
- Análisis y solución de problemas.
- Toma de decisiones.
- Capacidad para trabajar en equipo.
- Capacidad de aplicar los conocimientos en la práctica.
- Capacidad de adaptarse a nuevas situaciones.
- Habilidades de investigación.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Abboud, M., Khleifat, K., Batarseh, M., Tarawneh, K., Al-Mustafa, A., Al-Madadhah, M. 2007. Different optimization conditions required for enhancing the biodegradation of linear alkylbenzulfonate and sodium docecyl surfactants by novel consortium of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Pantoea agglomerans*. *Enzyme and Microbial Technology*. 41:432-439.
2. Adebuseye, S., Picardal, W., Ilori, M., Amund, O., Fuqua, C., Grindle, N. 2007. Aerobic degradation of di- and trichlorobenzenes by two bacteria isolated from polluted tropical soils. *Chemosphere*. 66:1939-1946.
3. Arensdorf, J., Focht D. 1995. A meta cleavage pathway for 4-chlorobenzoate, an intermediate in the metabolism of 4-chlorobiphenyl by *Pseudomonas cepacia* P166. *Applied and Environmental Microbiology*. 61: 443-447.
4. Bedard, D., Bailey, J., Reiss, B., Van Slyke, G. 2006. Development of Stable Sediment-Free Anaerobic Bacterial Enrichment Cultures That Dechlorinate Aroclor 1260. *Applied and Environmental Microbiology*. 72: 2460-2470.
5. Borja, J., Auresenia, J., Gallardo, S. 2006. Biodegradation of polychlorinated biphenyls using biofilm grown with biphenyl as carbon source in fluidized bed reactor. *Chemosphere*. 64:555-559.
6. Brown, J., Lynch, M. 1983. Method for removing polychlorinated biphenyls from transformer oil. US patent N. 4,377,471. General Electric Company
7. Cortinas de Nava C. Diagnóstico Nacional de Bifenilos Policlorados en México. Reporte Final. Acosta y Asociados. Proyecto INE-1/01. Diciembre del 2001/ Abril 2003. Preparado para: Instituto Nacional de Ecología No. INE/AD-084/2001.
8. Chen, C., Chen, C., Teng, C., Chung, Y. 2011. Decolorization characteristics and mechanism of Victoria Blue R removal by *Acinetobacter calcoaceticus* YC210. *Journal of Hazardous Materials*. 196:166-172.

9.Cisneros, C. 2011. Identificación y caracterización de cepas degradadoras de fenol.156 pp.

10.Dudkova, V., Demnerova, K., Bedard, D.2009 a. Microbial dechlorination of polychlorinated biphenyls.Nova Biotechnologica. 9: 119-123.

11.Dyke, P., Foan, C., Fiedler, H. 2003. PCB and PAH releases from power stations and waste incineration processes in the UK. Chemosphere. 50:469-480.

12.Environment Protection Agency. 2003. The determination of polychlorinated biphenyls by gas chromatography using mass spectrometric detection. Methods for the examination of waters and associated materials.

13.Field, J., Sierra-Alvarez, R. 2008. Microbial transformation and degradation of polychlorinated biphenyls. Environmental pollution. 155:1-12.

14.Furukawa, K., Tonomura, K., Kamibayashi, A., 1978. Effect of chlorine substitution on the biodegradability of polychlorinated biphenyls. Applied and Environmental Microbiology. 35:223-227.

15.Furukawa, K. 2000. Biochemical and genetic bases of microbial degradation of polychlorinated biphenyls (PCBs). Journal of Genetic Applied Microbiology. 46:283-296.

16.Furukawa, K., Suenaga, H., Goto, M. 2004. Biphenyl Dioxygenases: Functional Versatilities and Direct Evolution. Journal of Bacteriology. 186:5189-5196.

17.Furukawa, K., Fujihara H. 2008. Microbial Degradation of Polychlorinated Biphenyls: Biochemical and Molecular Features. Journal of Bioscience and Bioengineering. 105:433-449.

18.Gomes, H. Dias-Ferreira., Ribeiro, A. 2013. Overview of in situ and ex situ remediation technologies for PCB- contaminated soils and sediments and obstacles for full-scale application.Science of the Total Environment. 445-446:237-260.

- 19.Ghodake, G., Jadhav, S., Dawkar, V., Govindwar, S. 2009. Biodegradation of diazo Direct brown MR by *Acinetobacter calcoaceticus* NCIM 2890. *Biodeterioration and Biodegradation* 63:433-439.
- 20.Grabowska, I. 2010. Polychlorinated Biphenyls (PCB's) in Poland: Occurrence, Determination and Degradation. *Polish Journal of Environmental*. 1:7-13.
- 21.Komancová M., Jurcová I., Kochanková L., Burkhard J. 2003. Metabolic pathways of polychlorinated degradation by *Pseudomonas* sp. 2. *Chemosphere* 50: 537-543
- 22.López Martínez E., Díez Sanz F. V., Ordoñez García S. 2001. Contaminación por bifenilos policlorados. *Ingeniería química. Medio ambiente*: 199-207.
- 23.Maier, T., Foerster, H., Asperger, O., Hahn, U. 2001. Molecular Characterization of the 56-kDa CYP153 from *Acinetobacter* sp. EB104. *Biochemical, Biophysical Research Communications* .286, 652-658.
- 24.Pentyala, S., Rebecchi, M., Mishra, S., Rahman, A., Stefan, R., Rebecchi, J., Kodavanti, P. 2010. Polychlorinated Biphenyls: *In situ* Bioremediation from the Environment. *Environmental Pollution Ecology Human Health*. 249-262.
- 25.Pieper, D., Seeger, M. 2008. Bacterial Metabolism of Polychlorinated Biphenyls. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 15: 121-138.
- 26.Rahuman, M., Pistone, L., Trifito, F., Miertus, S. 2000. Destruction Technologies for polychlorinated biphenyls (PCB's). ICS-UNIDO PUBLICATIONS.1-55.