



**SEP**  
SECRETARÍA DE  
EDUCACIÓN PÚBLICA



# INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ

**“BIODEGRADACION DE BTX CON CELULAS LIBRES  
E INMOVILIZADAS DE *Acinetobacter lactucae* OTEC-  
02”**

**INGENIERIA BIOQUIMICA.**

**RESIDENTE:  
Cinthia Victoria Hernández Jiménez**

**ASESOR:  
DR. José Humberto Castañón González**

## Índice.

Resumen.....	4
Reporte de la residencia profesional. ....	5
Introducción. ....	5
1.2. Datos generales de la empresa. ....	6
1.2.1 Domicilio.....	6
1.2.2 Misión.....	6
1.2.3 Visión.....	6
1.3. Justificación del proyecto.....	7
1.4. Objetivos generales y específicos. ....	7
1.4.1 objetivo general. ....	7
1.4.2. Objetivos específicos.....	7
1.5. Alcances y limitaciones. ....	8
1.5.1 Alcances:.....	8
1.5.2 Limitaciones: ....	8
2. Procedimiento y descripción de las actividades realizadas. ....	8
2.1. Reactivación de la cepa.....	8
2.2. Preparación de medio mínimo salino (MMS).....	9
2.3 Adaptación de <i>Acinetobacter Lactucae</i> a los BTX en MMS.....	9
2.3.1 Cinética de crecimiento de <i>Acinetobacter Lactucae</i> en MMS.....	10
2.4 Inmovilización microbiana en soporte (PUF). ....	10
2.4.1Caracterización de espuma de poliuretano (PUF). ....	11
2.5 Cuantificación de células inmovilizadas. ....	11
2.6 Tratamiento a soporte (PUF) para leer en microscopio óptico de barrido.....	12
2.7 Purificación de exopolisacáridos.....	12
2.8. Cuantificación de exopolisacáridos por el método fenol-sulfúrico. ....	12
3. Diseño del biorreactor.....	13
3.1 Diagrama de bloques con flujos del reactor. ....	13
3.2. Diagrama de diseño.....	13
3.2.1. Dimensiones y empleo del reactor. ....	14

4. Resultados obtenidos.....	15
ANEXOS: .....	19
Referencias.....	21

## Resumen.

Se reactivó la cepa *Acinetobacter Lactucae* OTEC-02 en medio TSB y se realizó una cinética de crecimiento, el incremento de biomasa se midió por densidad óptica; conforme a los resultados se procedió a realizar una adaptación de la cepa en medio mínimo salino con concentraciones de BTX a 50 ppm y 100 ppm. Después de adaptar a la bacteria se realizan cinéticas de crecimiento por densidad óptica y recuento en placa así mismo se llevó a cabo cinéticas de degradación teniendo a los BTX como única fuente de carbono y energía.

Para las pruebas de inmovilización se utilizó espuma de poliuretano "PUF" pree tratado en medio TSB por un periodo de 20 días a 1 mes para comparar la capacidad y eficiencia de inmovilidad de la bacteria con respecto al soporte con variaciones en agitación, cantidad de medio y cambio de medio cada 24 horas; posteriormente se realizó una cuantificación de células adheridas al soporte.

En la evaluación de la degradación de los BTX se realizó por cromatografía de gases, detector FID inyectando cada 1 microlitro, para la evaluación durante la cinética.

## Reporte de la residencia profesional.

### Introducción.

Dentro de los contaminantes de mayor importancia en el mundo se encuentran los compuestos que se obtienen a través del fraccionamiento del petróleo, como son la gasolina, diesel y combustóleo. La elevada producción y uso de estos energéticos genera una alta contaminación ambiental encabezando la terrestre y atmosférica. Entre los problemas de contaminación terrestre se encuentra la contaminación de mantos acuíferos, causada por una gran variedad de contaminantes, entre los cuales se encuentran hidrocarburos presentes en la gasolina como pueden ser los denominados BTX.

Los BTX como (benceno, tolueno, y xilenos) son los compuestos más solubles de todos los componentes de la gasolina y son los agentes más contaminantes presentes en agua y suelo. Además de esto, los BTEX causan diferentes efectos a la salud humana. En México, existe una amplia variedad de industrias que utilizan los hidrocarburos aromáticos como materia prima, estos son liberados al medio ambiente y no existe ninguna legislación que limite el uso de los BTEX en la gasolina y en la industria.

Existen métodos para degradar los compuestos contaminantes entre ellos consorcios microbianos con tal habilidad. La degradación microbiológica de los hidrocarburos del petróleo se lleva a cabo bajo condiciones aerobias y anaerobias.

El presente trabajo se proyecta a la biodegradación de contaminantes aromáticos volátiles benceno, tolueno y xileno, conocidos como BTX empleando la bacteria aerobia, Gram negativa *Acinetobacter Lactucae* perteneciente a la familia *Moraxellaceae*; realizando diversas metodologías para determinar la más adecuada a ésta.

## 1.2. Datos generales de la empresa.

### 1.2.1 Domicilio.

Este proyecto fue realizado en el laboratorio de microbiología del polo Tecnológico Nacional en biocombustibles y servicios analíticos del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez ubicado en carretera panamericana kilómetro 1080 sin número.



**Figura 1- croquis del ITTG.**

### 1.2.2 Misión.

Formar de manera integral profesionistas de excelencia en el campo de la ciencia y la tecnología con actitud emprendedora, respeto al medio ambiente y apego a los valores éticos.

### 1.2.3 Visión.

Ser una Institución de Excelencia en la Educación Superior Tecnológica del Sureste, comprometida con el desarrollo socioeconómico sustentable de la región.

### 1.3. Justificación del proyecto.

Las emisiones de agentes contaminantes a la atmosfera son elevadas puesto que son compuestos altamente volátiles y dañino para la salud provocando enfermedades cancerígenas. En las gasolineras por ejemplo no se emplean equipos o métodos de prevención a la exposición de los BTX. En el presente proyecto se busca contrarrestar o disminuir la toxicidad de estos agentes por el método de biodegradación con microorganismos a nivel matraz y diseñar un reactor con las adecuaciones correspondientes.

### 1.4. Objetivos generales y específicos.

#### 1.4.1 objetivo general.

Cinética de degradación de BTX a nivel matraces con células libres e inmovilizadas.

#### 1.4.2. Objetivos específicos.

- 1.-** Reactivación de la cepa *Acinetobacter lactucae* OTEC-02; por medio de resiembra en placa con MTSA; proveniente del laboratorio no. 1 Ecología genómica.
- 2.-** Adaptación de células libres de *Acinetobacter lactucae* en medios salino con BTX.
- 3.-** Pruebas de formación de biopelículas en el soporte de poliuretano con variación de oxigenación y cantidad de medio al 50% y 100% de cobertura en el soporte.
- 4.-** cosecha de células adheridas al soporte para posteriormente hacer cuantificación de biomasa.
- 5.-** Diseño de un biorreactor para tratamiento en un sistema por lote considerando las posibles pérdidas por volatilidad de los BTX.

## 1.5. Alcances y limitaciones.

### 1.5.1 Alcances:

- ◆ Las cinéticas de crecimiento y biodegradación de los BTX a nivel matraces con el equipamiento de espectrofotómetro y cromatografía de gases.
- ◆ Adaptación de la cepa en medio mineral salino con BTX.
- ◆ Realización de la inmovilización celular en soportes de poliuretano.
- ◆ Pruebas de inmovilización con factores independientes.

### 1.5.2 Limitaciones:

- ◆ El tiempo de adaptación del microorganismo en medio salino fue mayor a lo especificado y ello retraso el seguimiento cronológico de las actividades.
- ◆ Por falta de reactivo no se pudo continuar con la cinética de biodegradación en células inmovilizadas.

## 2. Procedimiento y descripción de las actividades realizadas.

### 2.1. Reactivación de la cepa.

La cepa fue entregada del laboratorio 1 de Ecología genómica del ITTG, se mantenía en crio-preservación en un ultra congelador marca Revco™ UxF en tubos eppendorf con medio de tripticaseina de soya y glicerol al 30%. La reactivación ser llevo a cabo en placas Petri con medio agar de tripticaseina de soya por estriado a 30°C.



Formula: gramos por litro de agua destilada	
NaCl <sub>2</sub>	5.0
Dextrosa	2.5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.5
Peptona de caseína	17.0
Peptona de soya	3.0
agar	15

### **Composición de medio agar selectivo.**

#### 2.2. Preparación de medio mínimo salino (MMS).

El medio mineral salino se empleó para controlar los BTX como única fuente de carbono presente. se utilizaron los siguientes reactivos en (g/l) de agua destilada: 4.27 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ; 3.48 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 0.34 (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub> ; 0.46 MgSO<sub>4</sub> \* 7H<sub>2</sub>O ; 0.001 FeSO<sub>4</sub> ; 0.018 CaCl<sub>2</sub> \* 2H<sub>2</sub>O; y como elementos traza (mg/l): 0.01 CuC<sub>2</sub> \* 2H<sub>2</sub>O ; 0.2 CoCl<sub>2</sub> \* 6 H<sub>2</sub>O ; 0.1 ZNSO<sub>4</sub> \* 7H<sub>2</sub>O ; 0.03 MgCl<sub>2</sub> \* 4H<sub>2</sub>O ; 0.03 Na<sub>2</sub>Mo<sub>4</sub> \* H<sub>2</sub>O ; 0.02 NiCl<sub>2</sub> \* 6H<sub>2</sub>O. Posteriormente se repartieron en matraces erlenmeyer de 250ml. con 100ml. De medio cada uno; se esterilizo en el autoclave a 121°C por 15 minutos (Kureel, 2017).

#### 2.3 Adaptación de *Acinetobacter Lactucae* a los BTX en MMS.

Para llevar a cabo la adaptación del microorganismo al medio, se incrementó su densidad en 100 ml. de medio caldo de soya y tripticaseina en un matraz erlenmeyer de 250ml. por 24 horas a 150 RPM y 30°C posteriormente se centrifugo a 4000 RPM por 20 minutos, el pellet se lavó dos veces con MMS, se re suspendió con medio salino nuevamente y centrifugó. Una vez obtenida la pastilla, se usó como inóculo para la adaptación en presencia de BTX.

En botellas serológicas ámbar de 125ml. se agregó 100 mg/L de BTX (1:1:1), con 50ml. de MMS, más la pastilla microbiana obtenida de la centrifugación, se sellaron herméticamente con anillos metálicos y tapón de vitón para evitar la volatilización dejándose por 20n días a 150 RPM y 30°C; realizando mediciones constantes por densidad óptica y cambio de medio (Padhi & Gokhale, 2016).

#### 2.3.1 Cinética de crecimiento de *Acinetobacter Lactucae* en MMS.

Todo el procedimiento se llevó a cabo con esterilidad para evitar cualquier tipo de contaminación. De las botellas serológicas con diferentes concentraciones se tomó un tubo eppendorf estéril una alícuota del cultivo, se realizó una dilución seriada en tubos con MMS hasta la dilución E-7 para el recuento en placa, agitar en vortex para homogeneizar, posteriormente se hace un vaciado en placas de medio salino y agar con las diluciones 5,6 y 7, con perlas de cristal agitar por 10 segundos de lado a lado, arriba y abajo para una dispersión uniforme, retirar perlas y envolver las cajas, dejar en incubación a 30°C por 24 horas. Se toma una alícuota en tubos eppendorf para leer en el espectrofotómetro a 600 nm.

#### 2.4 Inmovilización microbiana en soporte (PUF).

La inmovilización de células bacterianas con la espuma de poliuretano se realizó en matraces erlenmeyer de 125ml. con medio caldo de tripticaseina de soya y 3 piezas de soporte a cada uno; los factores a variar fueron con 50 y 100% de cobertura a las piezas de soporte a tres diferentes revoluciones por minuto: 50, 100 y 150 para así determinar cuáles son las condiciones con mejores resultados de inmovilización. (Nie & He, febrero 2016). Se cambió el 50% de medio a los matraces cada 48 horas para un constante crecimiento y llevar el experimento por 20 días, todo en condiciones estériles y por triplicado (Nabweteme, Kwon, Park, Lee, & Ahn, May 2016).

#### 2.4.1 Caracterización de espuma de poliuretano (PUF).

Propiedad	Definición	Resultado
Densidad real	La <b>densidad real</b> es el peso de las partículas sólidas, relacionado con el volumen que ocupan.	19.6916 g/cm <sup>3</sup>
Densidad aparente	La densidad aparente se define como la masa por unidad de volumen.	0.1231 gr. /cm <sup>3</sup>
porosidad	La porosidad se define como la relación entre el volumen de huecos del lecho y el volumen total (huecos más sólido) del lecho	93.7598 %



**Material de soporte-espuma porosa de poliuretano**

#### 2.5 Cuantificación de células inmovilizadas.

Los reactivos y materiales utilizados fueron tubos con NaCl al 0.09%, tubos con caldo tripticaseína de soya, cajas con agar tripticaseína de soya; pinzas, bisturí, vortex y micropipeta. El procedimiento: tomar el soporte con células inmovilizadas con las pinzas, hacer en trozos con el bisturí, agregarlos en un tubo con NaCl 0.09% y agitar en vortex por 8 minutos para suspender las células, hacer una dilución en serie en los tubos con caldo de tripticaseína de soya y posteriormente vaciar en placa las diluciones 5,6, y 7, con 100 microlitros de inóculo, agitar con perlas de vidrio, envolver y encubar a 30°C por 24 horas. (Alessandrelloa, Tomása, & E., 2017).

## 2.6 Tratamiento a soporte (PUF) para leer en microscopio óptico de barrido.

Las soluciones necesarias fueron: buffer de fosfatos 0.1 M, etanol al 50, 70, 80, 90, y 95%, buffer salino (PBS) y glutaraldehído al 2.5% o 4%.

Poner el soporte con células inmovilizadas en suspensión de glutaraldehído durante 4 horas, posteriormente sacar y agregar en solución buffer de fosfatos cubriéndolo completamente por 10 minutos, tomar el soporte y lavar 3 veces con buffer salino por 5 minutos cada lavado, posteriormente, las piezas se lavan con la solución de etanol a diferentes concentraciones con un periodo de 10 minutos cada lavado. Finalmente se deja secar a temperatura ambiente en un desecador o en horno (Quek, Ting, & Tan, April 2005).

## 2.7 Purificación de exopolisacáridos.

El proceso de purificación de exopolisacáridos excretados de la espuma de poliuretano durante la inmovilización fue la siguiente:

Se tomó una pieza del soporte con células inmovilizadas de cada experimento y por duplicado, se suspendieron en caldo de tripticaseína de soya, con ayuda de un vortex se agitó de manera uniforme por 3 minutos, centrifugar a 4000 RPM por 20 minutos, separar el sobrenadante y desechar el precipitado, agregar dos volúmenes de etanol frío a 4°C y llevar a refrigeración por 24 horas a la misma temperatura.

Al día siguiente centrifugar a 2000 RPM durante 15 minutos; decantar y suspender la pastilla en agua destilada, para formar la precipitación agregar dos volúmenes de etanol frío a 4°C, agitar en vortex y centrifugar a 2000 RPM durante 15 minutos y finalmente secar los gránulos.

## 2.8. Cuantificación de exopolisacáridos por el método fenol-sulfúrico.

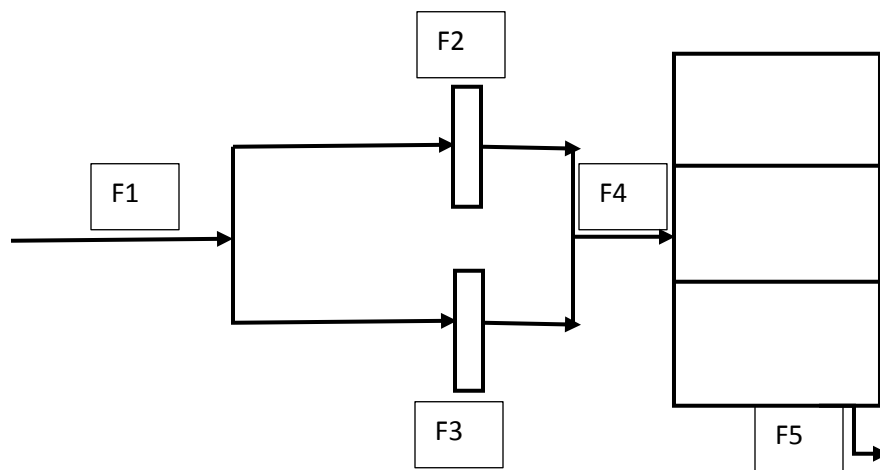
Se realizó una curva patrón con dextrosa con una concentración de 100 mg/L. Los gránulos extraídos del método anterior se suspenden en agua destilada y agitar bien. En tubos de ensaye se agrega 1ml. de la solución problema, 1ml. de agua destilada, 1 ml. de fenol al 5% y 5 ml. de ácido sulfúrico al 98%. Se agita cuidadosamente por 5 minutos, se lleva a baño hirviendo por 15 minutos y posteriormente a baño de hielo por 15 minutos. Pasado ese tiempo, realizar lectura por densidad óptica a 490 nm.

### 3. Diseño del biorreactor.

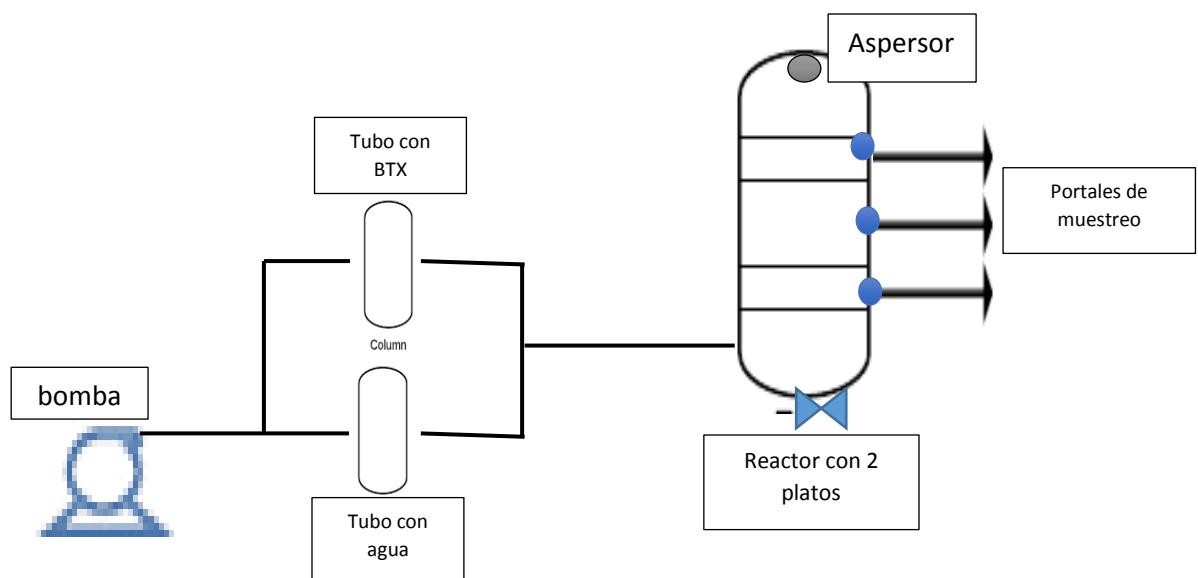
El diseño se establece de acuerdo a las necesidades del microorganismo, empleando así sus condiciones óptimas.

#### 3.1 Diagrama de bloques con flujos del reactor.

F= flujos.



#### 3.2. Diagrama de diseño.

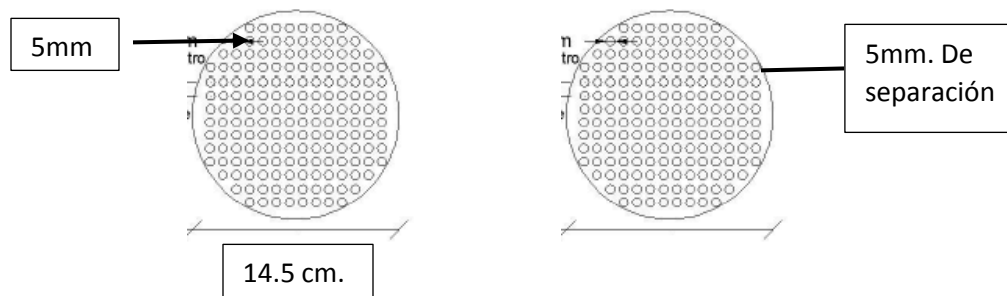


### 3.2.1. Dimensiones y empleo del reactor.

El reactor se realizó a nivel laboratorio con dimensiones de 25 centímetros de altura, 15 centímetros de diámetro y un volumen de 4.5 litros aproximadamente de capacidad.

El diseño consta en un flujo de entrada inyectado por una bomba, que conecta a dos tubos uno con agua y el otro con BTX, formando entre ellos un nuevo flujo que se incorpora directamente al reactor. El reactor contiene en la parte superior un aspersor para riego de medio a su interior; en el interior se encuentran dos platos distribuidores; contiene tres portales de muestreo en la parte inferior, media y superior y en la parte inferior conlleva una válvula de salida para el medio.

Los platos son perforados con semejanza a un filtro de medidas: diámetro de 14.5 centímetros; los poros con un tamaño de 0.5 centímetros y el espacio entre cada poro es de 0.5 centímetros. La función de los platos es sostener el soporte espuma de poliuretano (PUF) con células adheridas y por los poros filtrar los vapores de BTX.

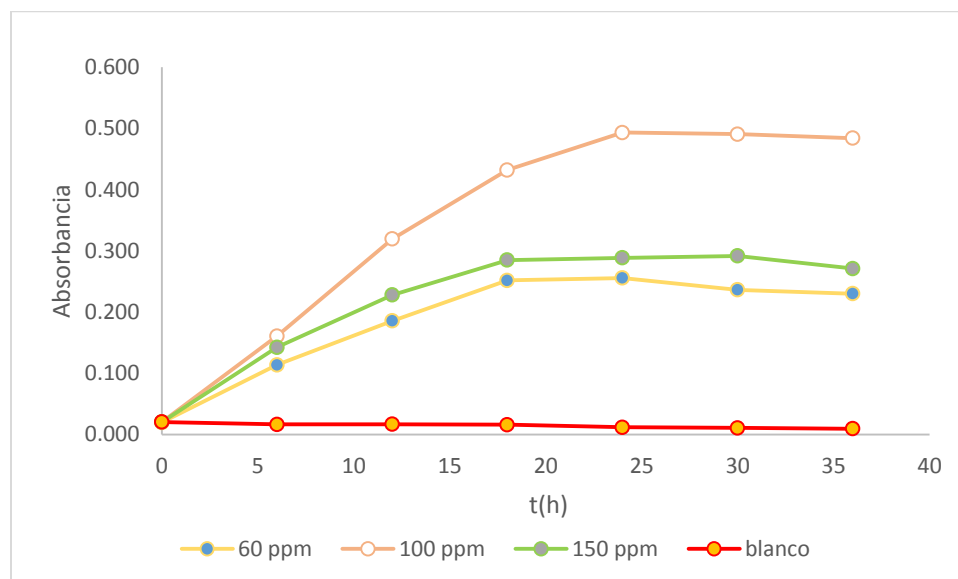


**Platos distribuidores**

## 4. Resultados obtenidos.

### Cinéticas de crecimiento.

En la siguiente grafica se observa el comportamiento de *Acinetobacter lactucae* con las diferentes concentraciones de BTX.

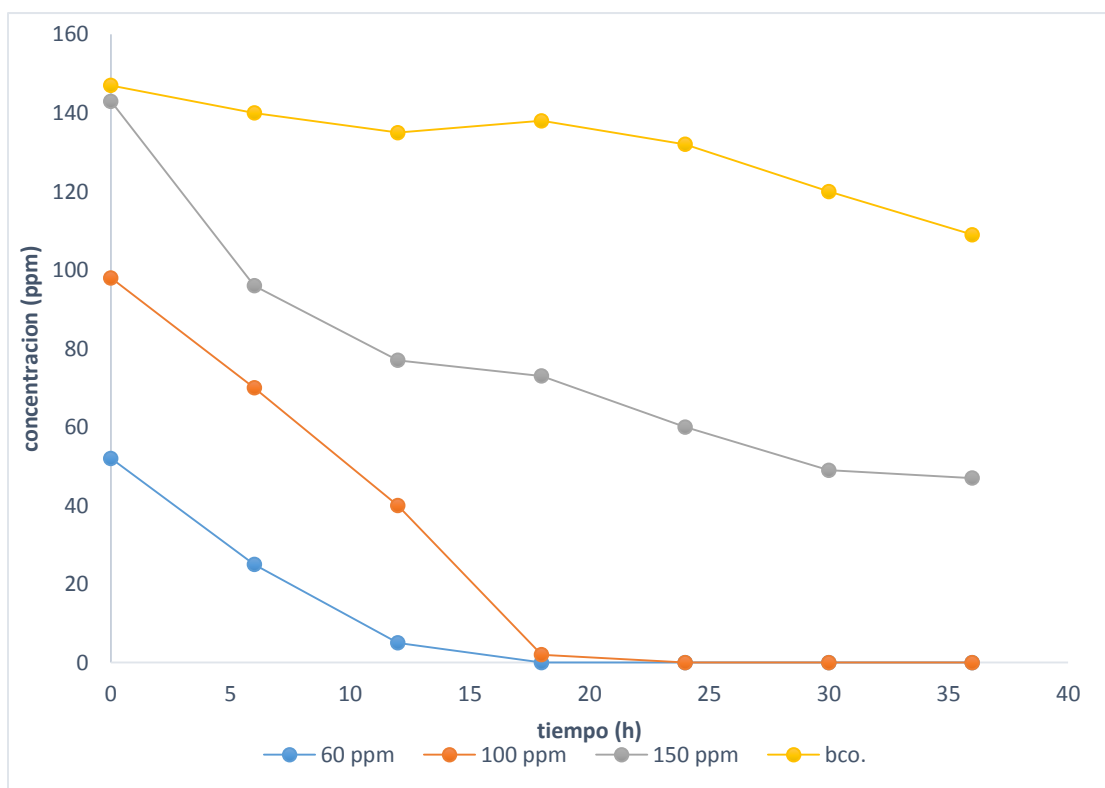


**Grafico 1- cinética de crecimiento de *Acinetobacter lactucae*.**

Como se puede observar el mejor crecimiento de *Acinetobacter* es a 100 ppm con una velocidad específica ( $\mu$ ) de  $0.0824 \text{ h}^{-1}$  y un tiempo de duplicación igual a 8.4120 horas, con base a esos resultados podemos determinar que a 60 ppm que no es una concentración suficiente para su buen crecimiento, sin embargo, a 150 ppm se determinó que es una concentración tóxica para la bacteria por lo cual causa su inhibición.

## Cinéticas de biodegradación.

En la siguiente grafica se observa como *Acinetobacter* degrada los compuestos BTX a las diferentes concentraciones en un periodo de tiempo de 36 horas.



**Gráfico 2- Cinética de degradación de *Acinetobacter lactucae*.**



## **Inmovilización y cuantificación bacteriana.**

En las siguientes tablas se representa los valores obtenidos de los tres tratamientos de inmovilización.

<b>RPM</b>	<b>Log UFC/mg. de soporte</b>
50	8.1
100	7.9
150	8.6

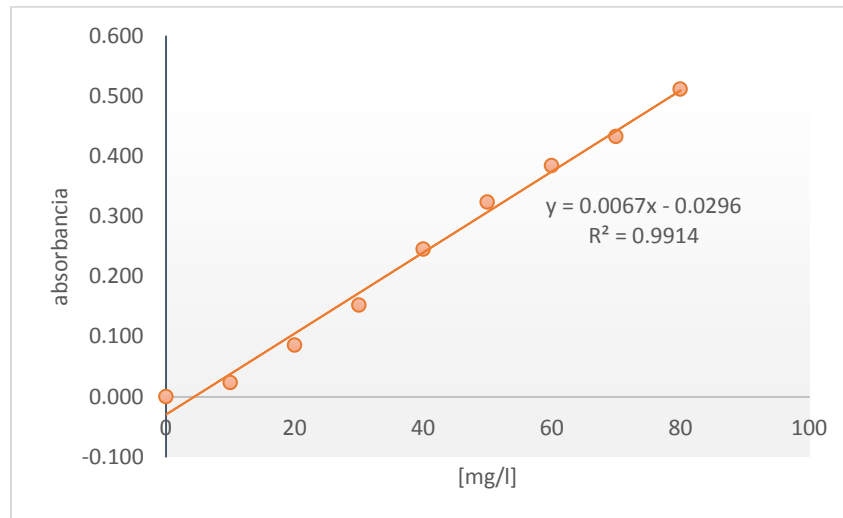
### **Log. UFC/mg. de soporte adheridas.**

<b>Cantidad de medio</b>	<b>Log. UFC/mg. De soporte</b>
50%	8.01
100%	8.4

### **Log. UFC/mg. de soporte adheridas.**

Como podemos observar respecto a los resultados, la mejor agitación para la inmovilización fue en 150 RPM y con una cobertura total del soporte con medio tripticaseína de soya.

## Cuantificación de exopolisacáridos.



**Gráfico 3- Curva patrón de EPS.**

### Concentración de EPS.

Se determinó la concentración de exopolisacáridos producido por *Acinetobacter lactucae* durante la inmovilización.

muestras	Concentración (mg/ml)
blanco	0
problema	0.0846

## ANEXOS:

Densidad real.

Se obtiene empleando el método del picnómetro con la siguiente ecuación.

$$Dp = \frac{(Mpss - Mpv)(Dw)}{(Mpw - Mpv) - (Mpssw - Mpss)}$$

$$Dp = \frac{(15.7184 - 15.5077)(1)}{(34.7662 - 15.5077) - (34.9662 - 15.7184)} = 19.6916$$

Dónde:

Dp=densidad real. = 19.6916 g/ml.

Mpss= masa del picnómetro + muestra. = 15.7184

Mpv= masa del picnómetro vacío. = 15.5077

Mpw= masa del picnómetro + agua. = 34.7662

Mpssw= masa del picnómetro + agua + muestra.= 34.9662

Dw= densidad del agua. = 1gr/ml.

Densidad aparente.

Método de la probeta y empleando la siguiente ecuación.

$$\rho_a = \frac{\text{masa muestra (g)}}{\text{vol. aparente (cm}^3\text{)}}$$

$$\rho_a = 0.1231 \text{ gr. /cm}^3$$

Datos:

Volumen del soporte= 16ml.

Peso del soporte= 1.97 gr.

Porosidad:

Calculo con probeta.

Medidas de la probeta

Diámetro: 1.8 cm.

radio: 0.9 cm.

altura (h): 8.7 cm.

Para calcular la porosidad se obtuvieron los siguientes datos:

Volumen total de la probeta:

$$p = \frac{\text{vol. agua añadido}}{\text{vol. total}} * 100$$

$$V_t = (\pi) (r^2) (h)$$

$$V_t = (3.1416) (0.9)^2 (8.7\text{cm.})$$

$$V_t = 22.1388$$

Volumen de agua añadido:

$$\text{Porosidad} = 93.7598\%$$

$$V_v = V_1 - V_2$$

$$V_v = 23.6707 - 2.9134$$

$$V_v = 20.7573$$

## Referencias

(s.f.).

Alessandrello, M. J., Tomás, M. S., & E., E. (2017). Petroleum oil removal by immobilized bacterial cells on polyurethane foam. *Marine Pollution Bulletin*.

Kureel, M. (2017). Biodegradation and kinetic study of benzene in bioreactor packed with PUF and. *BIORESOURCE TECHNOLOGY*.

Nabweteme, R., Kwon, H.-S., Park, S., Lee, C.-H., & Ahn, I.-S. (May 2016). Immobilized culture of *Sulfurovum lithotrophicum* 42BKTT in. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*.

Nie, M., & He, M. (febrero 2016). Immobilization of biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* NY3 and their. *Journal of Environmental Management*, 30-40.

Padhi, S. K., & Gokhale, S. (2016). Benzene biodegradation by indigenous mixed microbial culture:. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 1- 9.

Quek, E., Ting, Y.-P., & Tan, H. M. (April 2005). *Rhodococcus* sp. F92 immobilized on polyurethane foam. *BIORESOURCE TECHNOLOGY*, 38.