

00361



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
POSTGRADO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

VARIACION POBLACIONAL DE LOS
MICROORGANISMOS QUE DEGRADAN
COMPUESTOS TOXICOS A TRAVES DE UN PROCESO
ANAEROBIO/AEROBIO INTEGRADO CON
BIOPELICULA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS
(**BIOLOGIA**) **EXPERIMENTAL**
P R E S E N T A
WILDER RODRIGUEZ ARTEAGA

Director de tesis
Dr. Germán Buitrón Méndez

MEXICO, D.F.

2000



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Esta tesis corresponde a los estudios realizados con una beca otorgada por el gobierno de México, a través de la Secretaría de Relaciones Exteriores

JURADO ASIGNADO

| | |
|-------------------|--------------------------------------|
| Presidente | Dr. Teófilo Herrera Suárez |
| Secretario | Dr. Germán Buitrón Méndez |
| Vocal | Dra. Marisa Mazari Hiriart |
| Suplente | Dr. Víctor Luna Pabello |
| Suplente | M. en C. Pedro Ramírez García |

Director de tesis
Dr. Germán Buitrón Méndez

Sustentante
Wilder Rodríguez Arteaga

AGRADECIMIENTOS

A la secretaría de Relaciones Exteriores del Gobierno de México por la beca otorgada.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, en especial al Postgrado de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias

Al Instituto de Ingeniería de la UNAM.

A la Universidad Nacional de Piura-Perú.

Dra. Margarita Collazo

Gracias por la oportunidad que me brindó para estudiar en la Facultad de Ciencias de la UNAM.

Dr. Germán Buitrón Méndez

Gracias por la dirección del trabajo de tesis y por sus valiosas enseñanzas para lograr cumplir las metas trazadas.

Dr. Teófilo Herrera y Dr. Víctor Luna miembros del comité tutorial y del jurado por su asesoría y valiosas aportaciones.

Dra. Marisa Masari y M. en C. Pedro Ramírez miembros del jurado por sus valiosas aportaciones.

Dra. Luz María López del Instituto de Biomédicas de la UNAM por sus consejos, asesoría y apoyo logístico en el trabajo experimental.

A Ericka Segura por su asistencia técnica.

A los Biólogos Armando Navarro y Luciano Hernández del postgrado de la Facultad de Medicina y de la Facultad de Química por su colaboración.

A Gloria Moreno Rodríguez, por sus consejos, ayuda y atención que siempre me brindó.

A Rosa María Melgoza, Arturo Cruz y Luis Juárez por su amistad y colaboración.

Al Dr. Alfonso Lugo por su colaboración en el manejo estadístico de la información.

A mis compañeros del Instituto de Ingeniería: Maribel Quezada, Claudia Mendoza, Italivi Linares, Gaby Soto, Laura Ojeda, Emilio Zuñiga, Mario Chew, Ivan Moreno, Alejandro Fonseca, gracias por su amistad.

A mis paisanos Héctor Zegarra y Rosario Quispe por su valiosa ayuda y amistad.

A mis compañeras de Maestría Ana Cecilia Mesa, Diana Escobar y María Esther Bandala, por la amistad brindada y por las experiencias compartidos juntos.

A la Familia Herrera Mesa por esa sincera y amplia amistad.

Gracias a todas las personas que de algún modo me ayudaron sin pedir nada a cambio.

DEDICATORIAS

A mis padres y hermanos

A mis suegros y cuñados

Por ser mi familia y guardar esa relación tan bella que existe entre nosotros, apoyándome en todo momento, dándome esa confianza y cariño que me anima a emprender cada meta de mi vida.

A mis Hijos Wilder Andrés y Omar Ricardo

Gracias por su confianza, paciencia y cariño.

A mi esposa Elizabeth

Gracias por tu apoyo incondicional en todos los aspectos, por tus palabras de aliento en los momentos cruciales y por tu confianza y amor.

Con todo cariño te dedico esta tesis fruto de nuestro esfuerzo.

CONTENIDO

| | página |
|---|----------|
| ABREVIATURAS | V |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | VII |
| ÍNDICE DE FIGURAS | VIII |
| RESUMEN | IX |
| INTRODUCCIÓN | X |
| OBJETIVO | XIII |
| HIPÓTESIS | XIII |
| | |
| CAPÍTULO 1 | |
| ANTECEDENTES | 1 |
| | |
| 1.1 Procesos biológicos para el tratamiento de aguas residuales ... | 1 |
| | |
| 1.1.1 Procesos anaerobio/aerobio para la degradación de tóxicos | 1 |
| 1.1.2 Estrategias para la degradación de tóxicos | 2 |
| | |
| 1.1.2.1 Proceso SBR (Sequencing Batch Reactor o Reactor Discontinuo Secuencial | 2 |
| | |
| 1.2 Métodos para identificar a los microorganismos | 5 |
| | |
| 1.2.1 Métodos genotípicos | 5 |
| | |
| 1.2.1.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) | 5 |
| 1.2.1.2 Desarrollo de sondas genéticas | 7 |
| | |
| 1.3.1 Métodos Fenotípicos | 8 |

| | | |
|-----------|--|----|
| 1.3.2.1 | Métodos Clásicos | 8 |
| 1.3.2.2 | Sistema API | 8 |
| 1.3.1.3 | Ácidos grasos celulares bacterianos..... | 9 |
| 1.3.2.3.1 | Cromatografía de gases | 14 |

CAPITULO 2

| | |
|---|-----------|
| ESTRATEGIA EXPERIMENTAL | 17 |
| 2.1 Validación de la Técnica | 17 |
| 2.2 Calibración e implementación de la técnica | 17 |
| 2.2.1 Cepas puras | 17 |
| 2.2.2 Consorcios microbianos | 18 |
| 2.2.2.1 Lodo aerobio | 18 |
| 2.2.2.2 Lodo anaerobio | 19 |
| 2.2.2.3 Biopelícula de un biorreactor anaerobio | 19 |
| 2.3 Aplicación de la técnica | 19 |
| 2.3.1 Biomasa del biorreactor anaerobio/aerobio secuenciado | 19 |
| 2.3.1.1 Características del biorreactor SBR anaerobio/aerobio | 19 |
| 2.3.1.2 Condiciones de operación del biorreactor SBR anaerobio/aerobio..... | 20 |
| 2.3.1.2.1 Biorreactor SBR anaerobio/aerobio alimentado con 4-nitrofenol | 20 |
| 2.3.1.2.2 Biorreactor SBR anaerobio/aerobio alimentado con 2,4-nitrofenol | 21 |
| 2.3.2 Preparación de los microorganismos para el análisis | 22 |

| | |
|---|----|
| 2.3.2.1 Cepas puras | 22 |
| 2.3.2.2 Consorcios bacterianos | 22 |
| 2.3.2.3 Biopelícula de biorreactores | 22 |
| 2.3.3 Tratamiento de las muestras biológicas | 24 |
| 2.3.3.1 Extracción y metilación de los ácidos grasos | 24 |
| 2.3.3.2 Análisis de los ácidos grasos | 25 |
| 2.3.3.3 Análisis estadístico para los AGC en los biorreactores anaerobio/aerobio. | 26 |

CAPITULO 3

| | |
|--|-----------|
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 28 |
| 3.1 Sustento teórico de la técnica | 28 |
| 3.2 Implementación de la técnica | 28 |
| 3.2.1 Establecimiento de las condiciones operatorias del cromatógrafo. | 28 |
| 3.2.2 Perfil de los ácidos grasos de cultivos puros | 32 |
| 3.2.3 Perfil de los ácidos grasos de consorcios aerobios y anaerobios | 35 |
| 3.2.4 Perfil de los ácidos grasos del reactor anaerobio | 37 |
| 3.2.5 Comparación de los perfiles obtenidos con la literatura | 39 |
| 3.3 Aplicación de la técnica al proceso anaerobio/aerobio | 41 |
| 3.3.1 Biorreactor SBR alimentado con 4-nitrofenol | 41 |
| 3.3.2.1 Distribución espacial de las bacterias a diferentes profundidades en el biorreactor | 41 |

| | |
|---|-----------|
| 3.3.1.2 Distribución espacial de las bacterias dentro del empaque de tezontle | 45 |
| 3.3.2 Biorreactor SBR alimentado con 2,4-dinitrofenol | 46 |
| 3.3.2.1 Distribución espacial de las bacterias a diferentes profundidades del biorreactor | 46 |
| 3.3.2.2 Distribución espacial de las bacterias dentro del empaque del tezontle..... | 48 |
| CONCLUSIONES | 51 |
| RECOMENDACIONES | 53 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 54 |

ANEXO 1

Datos normalizados en porcentajes de los ácidos grasos celulares obtenidos de dos reactores anaerobio/aerobio

ANEXO 2

Ácidos grasos celulares identificados en cada cromatograma de las muestras analizadas

ABREVIATURAS

| | |
|------------------|--|
| 2A-4NF | 2 amino 4 nitrofenol |
| 2,4-DAF | 2,4 diaminofenol |
| 4A-2NF | 4 amino 2 nitrofenol |
| ACP | Análisis por componentes principales |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ARA | Fermentación de la arabinosa |
| AGC | Ácidos grasos celulares |
| CO ₂ | Dióxido de carbono |
| CIT | Utilización de citratos |
| 2,4-DNF | 2,4 dinitrofenol |
| EMAG | Ésteres metilados de los ácidos grasos (FAMEs en inglés Fatty Acids Methyl Esters) |
| GLU | Fermentación/oxidación de la glucosa |
| H ₂ S | Producción de sulfuro de hidrógeno |
| HCL | Ácido clorhídrico |
| LCD | Lisina descarboxilasa |
| NAD | Nicotinamida adenina dinucleótido |
| O ₂ | Oxígeno molecular |
| OD | Oxígeno disuelto |
| ONPG | O-nitrofenil beta-galactosidasa |
| ORP | Potencial de óxido reducción |
| OX | Citocromo oxidasa |
| pH | Potencial de hidrogeniones |
| SBR | Reactor discontinuo secuencial (Sequencing Batch Reactor) |
| SFCH | Pies cúbicos por hora (Standard feed cubics hours) |
| SOR | Fermentación/oxidación del sorbitol |
| SSV | Sólidos suspendidos volátiles |

| | |
|------|--|
| TNT | Trinitrotolueno |
| TRA | Tiempo de retención absoluto |
| T | Temperatura |
| UNAM | Universidad Nacional Autónoma de México. |

ÍNDICE DE TABLAS

| | Página |
|---|--------|
| Tabla 3.1 Ácidos grasos celulares y su interpretación | 29 |
| Tabla 3.2 Ácidos grasos del estándar comercial de Supelco y tiempos de retención | 30 |
| Tabla 3.3 Perfil cromatográfico de los ácidos grasos celulares de cepas puras | 33 |
| Tabla 3.4 Perfil de los ácidos grasos celulares de consorcios aerobios y anaerobios | 36 |
| Tabla 3.5 Perfil de los ácidos grasos celulares para un biorreactor anaerobio | 38 |
| Tabla 3.6 Ácidos grasos biomarcadores de comunidades bacterianas | 41 |
| Tabla 3.7 Distribución espacial de los ácidos grasos celulares para un biorreactor anaerobio/aerobio alimentado con 4-nitrofenol | 42 |
| Tabla 3.8 Correlación entre los ácidos grasos celulares de muestras de dos reactores anaerobio/aerobio por análisis de componentes principales | 43 |
| Tabla 3.9 Distribución espacial de los ácidos grasos celulares para el biorreactor anaerobio/aerobio alimentado con 2,4-dinitrofenol | 46 |
| Tabla 3.10 Correlación de los ácidos grasos celulares de muestras del biorreactor anaerobio/aerobio alimentado con 2,4-dinitrofenol por análisis de componentes principales | 48 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | Página |
|---|--------|
| Figura 1.1 Etapas del ciclo de tratamiento en un reactor SBR | 4 |
| Figura 1.2 Estructura de la membrana celular, donde se puede notar la doble capa fosfolipídica la cual la conforman en su mayor parte los ácidos grasos celulares | 10 |
| Figura 1.3 Esquema de un sistema cromatográfico | 15 |
| Figura 2.4 Diagrama del reactor SBR empacado utilizado para la degradación de 4-nitrofenol y 2,4-dinitrofenol | 20 |
| Figura 2.5 Toma de la muestra de la biopelícula en el reactor y del empaque. | 23 |
| Figura 3.6 Perfiles cromatográficos del estándar comercial | 31 |
| Figura 3.7 Perfil cromatográfico obtenido de <i>Escherichia coli</i> | 32 |
| Figura 3.8 Perfil cromatográfico obtenido de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 34 |
| Figura 3.9 Perfil cromatográfico obtenido de <i>Clostridium innocuum</i> | 34 |
| Figura 3.10 Perfiles cromatográficos de bacterias tomadas de las referencias bibliográficas | 40 |
| Figura 3.11 Análisis por componentes principales de comunidades bacterianas del reactor anaerobio/aerobio alimentado con 4-nitrofenol | 44 |
| Figura 3.12 Análisis por componentes principales de comunidades bacterianas del reactor anaerobio /aerobio alimentado con 2,4-dinitrofenol. | 49 |

RESUMEN

El análisis de los ácidos grasos celulares de los microorganismos se ha utilizado como un método adecuado para evaluar la diversidad taxonómica y funcional en distintos consorcios microbianos. El presente trabajo tiene como objetivo estudiar la distribución espacial de la comunidad bacteriana presente en un reactor SBR empacado con tezontle, bajo condiciones alternas de aerobiosis y anaerobiosis durante el tratamiento con 4-nitrofenol y 2,4-dinitrofenol, utilizando la técnica del perfil de ácidos grasos. El análisis de los extractos de ácidos grasos se llevó a cabo por cromatografía de gases. Los ácidos grasos se identificaron mediante comparación con un estándar comercial. Para calibrar el método se utilizaron cepas representativas de ambientes aerobios, facultativos y anaerobios como *Escherichia coli* FMU 047149, *Pseudomonas aeruginosa* FMU 195081 y *Clostridium innocuum* C19. En la primera etapa se obtuvieron resultados de los perfiles de los ácidos grasos de comunidades bacterianas de un lodo aerobio y de un lodo anaerobio, que se utilizaron para establecer el patrón característico de cada uno de estos ambientes. En la segunda etapa se tomaron muestras de la biomasa bacteriana a diferentes profundidades de los reactores alimentados, uno con 4 nitrofenol y otro con 2,4-dinitrofenol. En el reactor alimentado con 4-nitrofenol se determinó la existencia de dos comunidades bacterianas a diferente profundidad del reactor; en la parte externa del tezontle, para el nivel superior, predominan comunidades aerobias Gram positivas, mientras que para los niveles medio e inferior del reactor, predominaron los AGC comunidades aerobias y facultativas Gram negativas. En la parte interna del tezontle, en los tres niveles del reactor, predominaron comunidades bacterianas anaerobias. En el reactor alimentado con 2,4-dinitrofenol, se encontró que a diferente profundidad del reactor la parte externa del tezontle se encuentra colonizada por una comunidad bacteriana aerobia y facultativa Gram negativa. En tanto que, en la parte interna del tezontle existe una comunidad anaerobia y otra aerobia de los niveles medio e inferior.

INTRODUCCIÓN

La mayoría de los ríos, lagos y mares sufren de una contaminación intensiva, ocasionada por desechos y aguas residuales. La depuración natural del agua y suelos son de mucha importancia, pues debido a este proceso los cuerpos de agua eliminan contaminantes desagradables.

Los desechos generados en los procesos industriales son liberados al ambiente en forma de: aguas residuales, por descarga de efluentes a cielo abierto o a ríos, emisiones a la atmósfera y residuos sólidos. Estos desechos causan un impacto importante sobre los ecosistemas, sobre todo en aquellos casos en que se supera su capacidad natural de depuración.

Dentro de los contaminantes vertidos por fuentes antropogénicas, se encuentran los colorantes sintéticos azo y compuestos nitroaromáticos que son difíciles de degradar por los sistemas de tratamiento de tipo convencional (Meyer, 1981; Abo *et al.*, 1988; Groff y Kim, 1989; Prakash *et al.*, 1994; Weber y Adams, 1995; Seshandri y Bishop, 1994).

Los principales colorantes utilizados en el ámbito mundial en la industria textil, papelera, alimentaria, cosmética y farmacéutica son los de tipo azo. Estos colorantes sintéticos se caracterizan por la presencia de uno o varios grupos azo (-N=N-), este grupo divalente está unido a átomos de carbonos hibridizados sp^2 , por un lado a un núcleo aromático (benceno o naftaleno) o heterocíclico (como pirazol o tiazol), por el otro puede estar unido a una molécula insaturada de tipo carboxílico, heterocíclico o alifático (Kirk-Othmer, 1991). Existen aproximadamente 3000 tipos de estos colorantes (Bishop y Jiang, 1994).

Se han realizado muchos estudios sobre degradación de colorantes azo en diferentes condiciones metabólicas, dentro de los cuales se tienen a los procesos anaerobios (Wuhrmann *et al.*, 1980; Anliker, 1979; Razo, 1997; Guerrero, 1998), procesos aerobios (Kulla, 1981; Ghoropade y Spencer, 1993; Jian y Bishop, 1994, Coughlin *et al.*, 1997; Tepper *et al.*, 1997) y la combinación de estos dos procesos, es decir el tratamiento anaerobio/aerobio (Kudlich *et al.*, 1996, Haug, 1991)

Los nitrofenoles se emplean en la industria como intermediarios en la producción de colorantes, explosivos, y plaguicidas. Debido a su amplio uso, los nitrofenoles aparecen como contaminantes en efluentes industriales y por lo tanto en aguas naturales; de aquí la importancia de darles un tratamiento adecuado. Los tratamientos biológicos ofrecen mejores ventajas y tiene un considerable potencial para la degradación de residuos industriales.

Ante esta problemática, la industria se ha visto obligada a tratar las aguas residuales para eliminar sustancias contaminantes, de este modo el agua puede ser descargada sin ocasionar problemas ambientales o ser sometidas a tratamientos posteriores que permitan reutilizarla.

Existe una gran variedad de microorganismos que degradan compuestos nitroaromáticos y colorantes azo. Cuando los microorganismos utilizan estos compuestos químicos como única fuente de carbono, primero bajo condiciones anaerobias conduce a la formación de aminas aromáticas (Melgoza, *et al* 1999; Cruz y Buitrón 1999; Anliker 1979). En segundo lugar en condiciones aerobias, las aminas son mineralizadas siguiendo tres posibles rutas metabólicas: a) Formación de nitrógeno molecular (Spadaro *et al.*, 1994) b) Nitrificación; el nitrógeno en forma de amonio se oxida a nitratos (Characklis y Wilderer, 1989), c) Formación de biomasa microbiana. Estos procesos dan lugar finalmente a la formación de CO₂ y agua que

no son tóxicos para los propios microorganismos y fauna que habitan en cuerpos de agua.

Estos estudios representan un esfuerzo por encontrar un proceso adecuado para la degradación de tóxicos xenobióticos. Por lo tanto es importante continuar con los estudios para probar diferentes sistemas de biodegradación, estrategias de aclimatación de los microorganismos e identificar a las comunidades que participan en estos procesos. De este modo en el presente trabajo se proponen los siguientes objetivos y metas.

OBJETIVO

Determinar la variación de las comunidades de microorganismos que intervienen en la biodegradación de los compuestos tóxicos en el proceso anaerobio/aerobio integrado, con base en el perfil cromatográfico de sus ácidos grasos celulares.

METAS

- Calibrar el perfil cromatográfico de los ácidos grasos celulares de las bacterias provenientes de un lodo anaerobio y de un lodo aerobio a fin de establecer un patrón característico de cada uno de ellos, utilizando cromatografía de gases.
- Evaluar si, de acuerdo con el perfil cromatográfico de los ácidos grasos celulares obtenido, de muestras obtenidas de los reactores pilotos, es posible diferenciar a los microorganismos de acuerdo con el tipo de metabolismo respiratorio.
- Determinar la distribución espacial de las bacterias adheridas al soporte de los reactores pilotos utilizando el perfil cromatográfico de los ácidos grasos celulares.

HIPÓTESIS

Existen ciertos ácidos grasos contenidos en las membranas celulares bacterianas característicos de las comunidades anaerobias, aerobias y facultativas, las cuales servirían como biomarcadores para diferenciarlas.

OBJETIVO

Determinar la variación de las comunidades de microorganismos que intervienen en la biodegradación de los compuestos tóxicos en el proceso anaerobio/aerobio integrado, con base en el perfil cromatográfico de sus ácidos grasos celulares

METAS

- Calibrar el perfil cromatográfico de los ácidos grasos celulares de las bacterias provenientes de un lodo anaerobio y de un lodo aerobio a fin de establecer un patrón característico de cada uno de ellos, utilizando cromatografía de gases.
- Evaluar si, de acuerdo con el perfil cromatográfico de los ácidos grasos celulares obtenido, de muestras obtenidas de los reactores pilotos, es posible diferenciar a los microorganismos de acuerdo con el tipo de metabolismo respiratorio.
- Determinar la distribución espacial de las bacterias adheridas al soporte de los reactores pilotos utilizando el perfil cromatográfico de los ácidos grasos celulares.

HIPÓTESIS

Existen ciertos ácidos grasos contenidos en las membranas celulares bacterianas característicos de las comunidades anaerobias, aerobias y facultativas, las cuales servirían como biomarcadores para diferenciarlas

CAPITULO 1

ANTECEDENTES

1.1 Procesos biológicos para el tratamiento de aguas residuales industriales

1.1.1 Procesos anaerobio/aerobio para la degradación de compuestos tóxicos

Los efluentes industriales tienen la particularidad de ser variables tanto en su cantidad como en su calidad. En el caso de las industrias químicas y petroquímicas, poseen además la característica de ser tóxicos hacia los microorganismos. En la actualidad, el proceso biológico más utilizado para tratar aguas residuales es el de lodos activados. Sin embargo, pocas plantas de tratamiento operan satisfactoriamente.

Se han explorado nuevos procesos aerobios (Buitrón y Ortiz, 1998) y anaerobios (Macarie, 1999) para el tratamiento de efluentes contaminados por compuestos tóxicos. Sin embargo, el uso de sistemas acoplados anaerobio/aerobio parece presentar ventajas sobre la biodegradabilidad de compuestos considerados recalcitrantes (Cruz y Buitrón, 1999; Kudlich, *et al.* 1996 ; Haug, 1991).

Una nueva estrategia en los procesos anaerobio/aerobio, es el uso del sistema SBR con ciclos alternantes de aeración y no aeración en un solo reactor. Esto es factible y se han logrado obtener altas eficiencias de remoción de compuestos nitroaromáticos (Juárez, *et al.* 1999 ; Melgoza, *et al.* 1999). La alternancia en la aeración, en un biorreactor genera un ambiente anaerobio/aerobio que da lugar al desarrollo y selección de comunidades microbianas mixtas, en donde los productos generados por los organismos anaerobios (metabolitos reactivos, que no los degradan), puedan ser empleados por otros microorganismos que en presencia del oxígeno, los utilicen como fuente primaria de energía llevándolos hasta su mineralización completa.

Es de suma importancia conocer, cuales son aquellos microorganismos que participan en la biodegradación de tóxicos en este tipo de biorreactores. Hasta ahora la identificación de los microorganismos se han centrado en los métodos de la microbiología clásica, las cuales se basan en el aislamiento y cultivo de microorganismos, que no necesariamente permiten reproducir en el laboratorio las condiciones que prevalecen en el ambiente de donde provienen los microorganismos. De tal manera que se reporta que únicamente del 0.01 al 12 % de una muestra ambiental, puede cultivarse e identificarse (Atlas, 1984).

Esto da lugar, a la obtención de un conocimiento sesgado o limitado de los microorganismos que habitan y participan en la degradación de tóxicos, en un ambiente determinado. Lo que conduce a atribuirles actividades biodegradativas sólo a aquellos microorganismos cultivables e identificados por la metodología clásica, y deja de lado a un gran número de ellos que no son cultivables y por tanto no identificados, los cuales también tienen una participación muy importante en el ciclo de la degradación de tóxicos. De aquí la importancia de conocer mejor el sistema.

1.1.2 Estrategias para la degradación de los compuestos tóxicos

1.1.2.1 Proceso SBR (Sequencing Batch Reactor o Reactor Discontinuo Secuencial).

El proceso SBR es un sistema constituido por un cultivo mixto de microorganismos en la forma de biomasa en suspensión o biopelícula. es una técnica orientada en el tiempo en adición con un flujo de nutrientes, aire (según el sistema) y tiempo de contacto determinado (Wilderer, 1991).

El proceso es una operación discontinua basada en un sistema de llenado y vaciado que se realiza en uno o varios tanques, una unidad o ciclo del proceso está conformada por cinco fases que tienen lugar en forma secuencial: 1) llenado, 2) reacción, 3) sedimentado, 4) vaciado y 5) tiempo muerto o inactivo (Figura 1)

Fase de llenado. El reactor inicialmente se encuentra con un volumen mínimo de agua y biomasa altamente concentrada; un aireador debe de estar funcionando para asegurar que los microorganismos obtengan oxígeno necesario para su supervivencia. Durante esta fase se alimenta el reactor con agua residual no tratada o pretratada hasta que el reactor se llena a su capacidad máxima. También se pone en funcionamiento un mezclador para uniformar la muestra y mantener la suspensión de los lodos para la siguiente fase.

Fase de reacción. Una vez lleno el reactor se continúa mezclando y aireando la suspensión de lodos activados hasta que la biomasa degrade todo el contaminante o sustrato. El tiempo que dura esta fase es determinada por el investigador sobre la base de mediciones y pruebas de laboratorio.

Fase de sedimentado. Cuando el agua ya ha sido tratada, se apaga el aerador y mezclador para permitir que los lodos se decanten. El tiempo de decantado depende de las condiciones específicas del reactor (por ejemplo la altura) el tipo de lodos que se empleen (tamaño de los flocos)

Fase de vaciado. Una vez decantados los lodos, el agua tratada que queda en la parte superior (sobrenadante) puede ser removida sin dificultad. Esta puede ser posteriormente descargada a un cuerpo de agua o enviada a otra planta para un tratamiento posterior.

Tiempo muerto. Debido a que el reactor puede ser parte de un banco de reactores que operan en paralelo o bien, que la carga de agua a tratar sea tan pequeña que no

amerite iniciar otro ciclo, se debe también considerar un tiempo muerto antes de repetir la operación. Durante este tiempo generalmente los lodos deben ser aireados para permitir a los microorganismos respirar, aunque se mantengan en ayuno. También en esta fase puede ocurrir que por muerte natural de los microorganismos, deba considerarse una purga de la biomasa vieja para sustituirla por biomasa nueva.

El sistema SBR esta basado en los sistemas naturales, por lo que impone condiciones oscilantes semejantes a las encontradas en el ambiente de manera que se busca que los microorganismos desarrollen mecanismos que los ayuden a soportar condiciones ambientales estresantes y hostiles. El sistema SBR puede extenderse también a los sistemas con biopelícula o biomasa fija que además de las ventajas adquiridas por el modo de operación del SBR convencional favorece la formación de gradientes de concentración a través de la biopelícula y menor pérdida de sólidos suspendidos volátiles (SSV), que se adhieren sobre un empaque

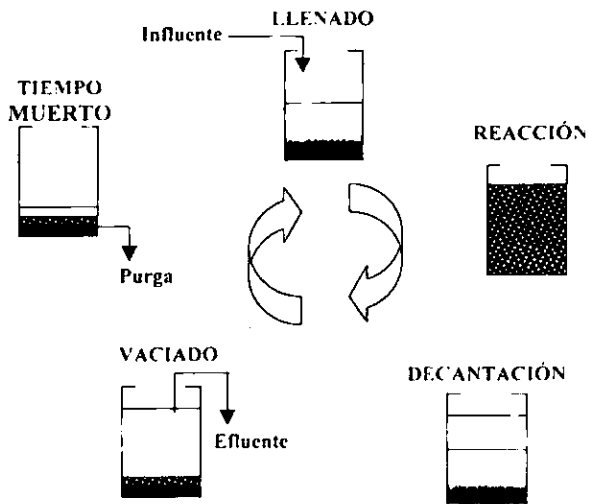


Figura 1. Etapas del ciclo de tratamiento en un reactor SBR

1.2 Métodos para identificar a los microorganismos que intervienen en la biodegradación de tóxicos

1.2.1 Métodos genotípicos

El gran avance de la microbiología ambiental en la última década ocurrió con la aplicación de los métodos basados en el análisis de los ácidos nucleicos para detectar genes catabólicos de bacterias y sus niveles de expresión en muestras ambientales.

Los métodos moleculares representan una herramienta muy poderosa por su gran sensibilidad y especificidad. Por ejemplo, cuando se aplican bajo condiciones muy controladas, una sonda genética de 17 pares de bases (pb) es capaz de detectar un gen único dentro de un genoma cuyo tamaño es de 3×10^9 pb (Berent *et al.*, 1985). Esta gran sensibilidad y especificidad proviene de los enlaces de hidrógeno entre los nucleótidos complementarios.

A través de las técnicas moleculares es posible conocer la estructura de una comunidad microbiana, la dinámica de cierta población y la frecuencia en la que se encuentran los genes catabólicos. La desventaja de estas técnicas es su alto costo (González, 1998, Milsic y Saval, 2000).

Dentro de las técnicas moleculares se mencionan las siguientes:

1.2.1.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La técnica de PCR fue desarrollada en 1985 y desde entonces se convirtió en el mayor avance tecnológico de la biología molecular (Saiki *et al.*, 1985). La técnica permite la amplificación *in vitro* de fragmentos específicos de ADN de interés.

durante un proceso con la enzima termoestable de polimerasa de ADN. Después de 20 ciclos de amplificación, la "secuencia blanco" se amplifica un millón de veces, si la eficiencia es del 100%. El mecanismo de reacción, la concentración de reactivos y las condiciones de reacción han sido ampliamente reportadas en la literatura (Innis y Gelfand, 1990; Saiki, 1992).

Al paso del tiempo, esta técnica ha mostrado ser una herramienta de gran utilidad para la detección de genes catabólicos involucrados en la degradación de contaminantes en muestras ambientales. Los principales componentes de la reacción de PCR son: la secuencia que se pretende amplificar, los "primers" preparados previamente, la enzima más común Taq DNA polimerasa y los nucleótidos, todo en una mezcla con la solución amortiguadora. Un ciclo de PCR consiste de 3 pasos: desnaturalización de las cadenas de ADN, alineamiento de los "primers" y extensión. Los "primers" son oligonucleótidos que reconocen los nucleótidos a los costados de la secuencia blanco y permiten que se adhiera la enzima Taq polimerasa para que comience el proceso de polimerización.

Existen variaciones de la técnica de PCR, por ejemplo AP-PCR (arbitrarily primed PCR), también llamado RAPD (randomly amplified polymorphic DNA) y rep-PCR (repetitive PCR), donde se usa un solo "primer" para amplificar una región específica, pero definida del genoma. De esta manera se obtiene un patrón de los fragmentos de ADN (fingerprint) que permite identificar a un microorganismo específico (Milsic y Saval, 2000).

Las ventajas de estas técnicas en comparación con la PCR clásica son que se pueden aplicar sin tener información previa sobre el sistema genético del microorganismo de interés.

1.2.1.2 Desarrollo de sondas genéticas

Las sondas genéticas se han desarrollado con el fin de detectar secuencias nucleotídicas específicas. Las sondas que más se utilizan en la práctica son los oligonucleótidos (menos de 40 pb) que se sintetizan químicamente a nivel industrial. Son de alta especificidad y se utilizan principalmente para detectar mutaciones en los ensayos de hibridación y como "primers" en la PCR. También, los productos de PCR de hasta 1000 pb se pueden marcar y servir como sondas genéticas.

Los métodos de marcaje pueden ser radioactivos o inmunoenzimáticos que incluyen el uso de biotina y de colorantes bioluminiscentes.

Las sondas genéticas se diseñan con base en los genes que codifican para enzimas clave de las rutas de biodegradación y se aplican para detectar bacterias responsables de la degradación completa de hidrocarburos y de compuestos clorados. También se pueden aplicar durante la detección, aislamiento y monitoreo de ciertos grupos de bacterias, como por ejemplo, las bacterias nitrificantes y sulfatoreductoras.

Cuando ya se tienen preparadas las sondas genéticas, el siguiente paso es aplicar las técnicas de hibridación con el ADN total extraído de la muestra ambiental que se pretende analizar. Casi todas las técnicas de hibridación se basan en la desnaturalización de las cadenas de ADN, introducción de sondas genéticas y realineamiento de las bases complementarias formando el híbrido de doble cadena. El grado de complementariedad entre las cadenas es un factor importante que influye en la hibridación, además de la longitud y concentración de la secuencia nucleotídica y de la sonda genética, así como la temperatura y la concentración de las soluciones amortiguadoras (Milsic y Saval, 2000).

1.2.2 Métodos fenotípicos

Los métodos fenotípicos como los morfométricos, citológicos y bioquímicos han sido y son usados hasta la fecha para determinar el grado de semejanza entre los microorganismos, que en la práctica han demostrado que proveen una amplia información, y que en ocasiones por razones técnicas y de tiempo no son utilizados totalmente, además de implicar trabajo extra en el laboratorio, con más consumo de tiempo en su proceso, sobre todo en áreas donde el acortar tiempo es importante como en la clínica, ingeniería sanitaria, calidad del agua, veterinaria e industria alimentaria. La quimiotaxonomía con el uso de los lípidos en bacterias propone una alternativa: ganar tiempo, métodos sencillos y exactos.

1.2.2.1 Métodos clásicos

Dentro de ellos se encuentran los métodos morfológicos macroscópicos para las colonias crecidas en agar y microscópicos para observar la forma de cada microorganismo. El primero toma en cuenta el color, la superficie, densidad y consistencias de las colonias, y el segundo el tamaño, forma, disposición de las células y presencia de estructuras específicas de los individuos.

La tinción de Gram es otro método clásico para la identificación de bacterias, el cual identifica a dos grupos: gram positivos (se tiñen de color azul) y gram negativos (se tiñen de color rojo o rosado).

1.2.2.2 Sistema API

Este sistema sirve para la identificación de enterobacterias y otras gram negativas principalmente, aunque también es aplicable para bacterias gram positivas utilizando otro tipo de sustratos

Se basa en el metabolismo de las bacterias y consta de 23 pruebas bioquímicas miniaturizadas y estandarizadas. Cada prueba se realiza en microtubos que contienen medios específicos deshidratados, estos medios son reconstituidos adicionando la suspensión celular. Las pruebas del sistema son o-nitrofenil beta-galactosidasa (ONPG), lisina descarboxilasa (LDC), utilización de citratos (CIT), producción de sulfuro de hidrógeno (H₂S), fermentación de glucosa (GLU), sorbitol (SOR), arabinosa (ARA), y oxidasa (OX) entre otras

Para usar el indicador del perfil analítico, los perfiles bioquímicos obtenidos son transformados en perfiles numéricos, por ejemplo, un número que ayude a facilitar la transcripción de todos los resultados obtenidos para un organismo y comparar con los perfiles listados en el índice del manual API.

El principio de codificar es condensar las piezas binarias de información (+ o -) dentro de un perfil numérico. Para hacer esto, las pruebas son divididas en grupos de tres y para cada reacción positiva se le da un valor igual a 1, 2 o 4 de acuerdo a la posición de la prueba en su respectivo grupo: primero, segundo o tercero. La suma de estos tres valores (0 para reacciones negativas) da el correspondiente dígito con un valor entre 0 y 7. Luego se recurre al Manual API para identificar a las especies de bacterias (API, 1990).

1.2.2.3 Ácidos grasos celulares bacterianos

El contenido total de ácidos grasos de la mayoría de las especies de bacterias se encuentran distribuidos en la pared celular, membrana celular e inclusiones citoplasmáticas (Figura 2).

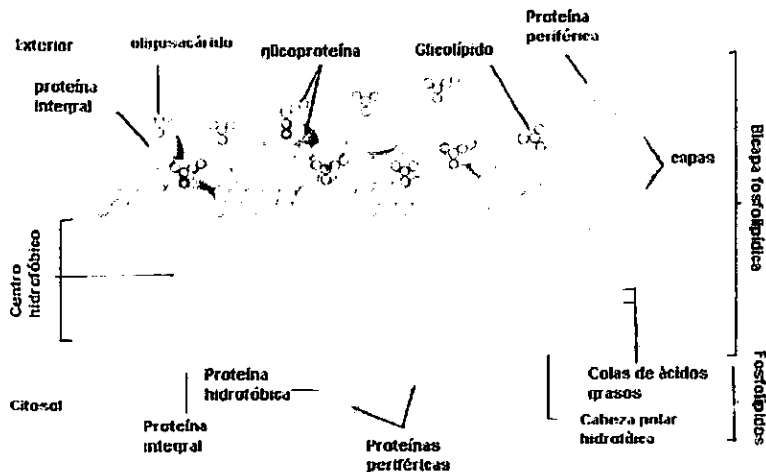


Figura 2. Estructura de la membrana celular donde se puede notar la doble capa fosfolipídica, la cual la conforman en su mayor parte los ácidos grasos celulares

Incluyendo todos los lípidos, estos son mucho más abundantes en la pared de las bacterias gram negativas que en las gram positivas. Las bacterias no acumulan lípidos como material de reserva, sin embargo contienen cantidades considerables de ellos como constituyentes de sus sistemas membranosos (Gottschalk, 1979).

Los ácidos grasos en las células bacterianas, se sintetizan por separado y luego son esterificados para formar lípidos más complejos. Se han encontrado muchas clases de ácidos grasos en las bacterias: los que contienen un número diferente de átomos de carbono, los de cadena recta o de cadena ramificada, pueden tener o no dobles enlaces, pueden contener o no grupos OH, y contener o no anillos de ciclopropano (Stainer, 1986).

Los ácidos grasos de las bacterias pueden ser saturados o no saturados, tener uno o más dobles enlaces, y el precursor de dichos ácidos grasos es la acetil coenzima A (Gottschalk, 1979).

Los ácidos grasos saturados iso y anteiso se encuentran en las bacterias gram positivas. Las gram negativas contienen cadenas lineales de ácidos grasos con una doble ligadura. Esta característica se utiliza como guía para la clasificación taxonómica de bacterias.

Los ácidos grasos no saturados iso y anteiso son aún raros en la naturaleza. La determinación de la posición de la doble ligadura en estos ácidos grasos se consideró necesaria en aspectos de biosíntesis, esto aumenta el valor taxonómico (Bonn *et al.*, 1977).

La composición de ácidos grasos presentes en los fosfolípidos juega un papel importante en la membrana de los microorganismos ya que determina la extensión de los fluidos en la membrana. Este fluido es necesario para funciones relacionadas con procesos metabólicos (Bonn *et al.*, 1977. Lenhinger, 1979).

Los ácidos grasos celulares (AGC) se usan para estimar la biomasa microbiana, diversidad taxonómica y estatus nutricional de los microorganismos. Pues se asume que los AGC se encuentran en una proporción relativamente constante y su variación entre los diversos grupos taxonómicos, permitirá usarse como un biomarcador e interpretado sin ambigüedad (Vestal and White, 1989).

La extracción y análisis de los AGC de una comunidad bacteriana es otra forma de medir la biomasa. En sus membranas, todas las células contienen principalmente fosfolípidos, los cuales no se almacenan debido a su constante renovación y degradación. Por lo tanto esto indica la biomasa viable (White *et al.*, 1979).

Los AGC se usan para estudiar la estructura de las comunidades microbianas, esto es importante para discriminar entre los diferentes tipos de microbios y el análisis del contenido de los ácidos grasos patrones provee uno de tales medios

En la mayoría de las células los fosfolípidos de las membranas contienen ácidos grasos unidos a enlaces éster (a excepción de las Arqueobacterias que tienen sus ácidos grasos unidos a enlaces éter, por lo tanto las bacterias de este grupo no pueden ser medidas por este método).

Debido a que los lípidos totales de una célula pueden ser extraídos instantáneamente, un análisis cuantitativo y cualitativo de los ácidos grasos, puede revelar la presencia y abundancia de cierto tipo de microorganismos, y lo más importante, bajo condiciones naturales, dando con ello una representación de los microbios presentes en un momento particular. La presencia de ciertos AGC puede servir como marcadores para ciertos tipos de microbios (Vestal y Chite, 1989).

La fracción lipídica total de la célula microbiana, puede ser posteriormente fraccionada o hidrolizada, usando para ello un medio ácido o alcalino, generando ácidos grasos libres que pueden ser esterificados con metanol para formar los ésteres metilados de los ácidos grasos (EMAG), (White *et al.*, 1979). Los EMAG pueden ser analizados cuantitativamente y cualitativamente por cromatografía de gases y posteriormente ser verificada por espectrometría de masas.

Aunque no es imposible pero implica mayor esfuerzo caracterizar a los microbios como género, si es posible determinar cualitativamente y cuantitativamente los grupos de microbios presentes cuando la muestra fue extraída. Estos ácidos grasos en general representan marcadores específicos para diferentes tipos de células microbianas.

En un estudio del microcosmos en sedimentos marinos e incubados bajo condiciones aerobias, facultativas y anaerobias, se encontró que los perfiles de los EMAG obtenidos para cada grupo, presentaban diferencias. En efecto, los ácidos grasos ciclopropanos se incrementaron bajo condiciones anaerobias y facultativas, lo cual indicó que estos ácidos grasos serían buenos marcadores para microbios anaerobios (Guckert *et al.*, 1985).

Por otro lado, el incremento de los ácidos grasos insaturados en el microcosmos aerobio, mostró que estos ácidos serían buenos marcadores de microbios aerobios. La carencia de ácidos grasos poliinsaturados en estos perfiles, indicó la ausencia de microeucariontes

Verker y Hall (1998), usando el perfil de los ácidos grasos celulares, encontraron diferencias entre una biomasa microbiana suspendida y una biomasa fija en biorreactores, concluyendo que ambas comunidades son distintas

Debido a los inconvenientes que implica el uso de técnicas tradicionales de identificación, se hace necesaria la implementación y el uso de nuevas técnicas de identificación microbiana, como es el caso del análisis de los AGC por cromatografía de gases. Entre las ventajas que ofrece es la minimización del error humano, reducción de tiempo y bajo costo económico y además amplía la información con respecto a las pruebas bioquímicas y es aplicable a diversas áreas, como la alimentaria, agrícola, sanitaria, clínica y ecológica

Por lo tanto, esta técnica también puede ser aplicable a la biopelícula de los biorreactores que tratan compuestos tóxicos, con la finalidad de identificar las comunidades microbianas que participan en el proceso de la biodegradación de compuestos xenobióticos. Sobre todo, cuando esta biopelícula se forma sobre

material poroso como el tezontle, el cual permitiría el desarrollo de diversos ambientes (anaerobios, micro aerobios y aerobios)

1.2.2.3.1 Cromatografía de gases

La cromatografía de gases es hasta la fecha una herramienta auxiliar en muchos campos de la investigación científica y dentro de su aplicación están las investigaciones específicas relacionadas con el contenido de los ácidos grasos celulares. Con ello se ha obtenido un gran avance en los aspectos taxonómicos de los organismos.

La cromatografía de gases consiste en la separación de los componentes volátiles de una mezcla, por medio de la elución de éstos a través de una fase estacionaria adsorbida sobre un soporte y el paso de una fase móvil o gas acarreador

Cuando la fase estacionaria es un líquido se llama cromatografía gas-líquido, y cuando la fase estacionaria es un sólido como carbón o gel de sílice se denomina cromatografía gas-sólido

Las partes integrantes de un cromatógrafo de gases son: 1) Tanque de gas acarreador 2) inyector 3) horno 4) columna 5) detector 6) registrador (Figura 3)

En el cromatógrafo se utiliza un gas acarreador (fase móvil) que bajo presión moviliza una muestra de vapor desde el inyector y a través de una columna (donde se encuentra la fase estacionaria), la muestra es adsorbida sobre el soporte de la fase estacionaria, donde se efectúa la separación, luego pasa al detector donde se convierte en una señal eléctrica, la cual se registra en un graficador

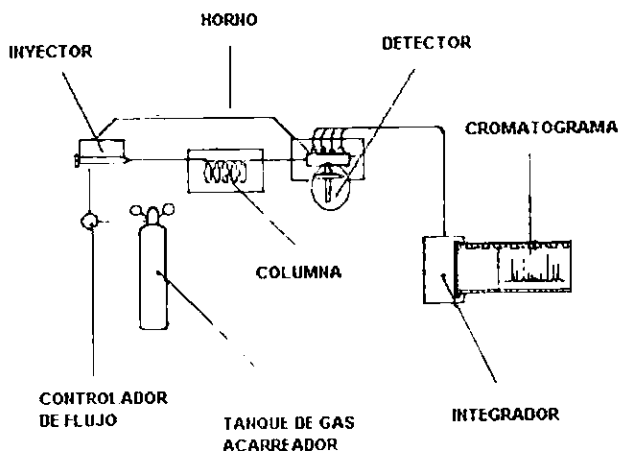


Figura 3: Esquema de un sistema cromatográfico

A la gráfica obtenida se le llama cromatograma y los parámetros registrados son tiempo en las abscisas y milivolts en las ordenadas.

El detector da una respuesta proporcional a la concentración del compuesto eluido. el detector de ionización de flama produce cromatogramas formados por picos o curvas que corresponden a cada uno de los componentes de la mezcla, el área bajo la curva de cada pico es proporcional a la masa total del componente.

El parámetro utilizado para determinar la elución de un compuesto es el tiempo de retención absoluto (TRA), bajo condiciones constantes de presión, flujo y temperatura, tomando en cuenta que el flujo es lineal con respecto al tiempo. Este tiempo de retención es característico de la muestra y es usado para la identificación de la muestra problema.

La identificación se basa en una comparación de los tiempos de retención del componente desconocido con los datos obtenidos de un compuesto estándar, analizado bajo las mismas condiciones (Yañez, 1992).

CAPITULO 2

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

El estudio se dividió en tres fases, en la primera se realizó la validación de la técnica, en la segunda fase se implementó la técnica de cromatografía de gases, para encontrar las condiciones adecuadas de operación y en la tercera fase se realizó la aplicación de la técnica para el análisis de la biopelícula de los biorreactores SBR.

2.1 Validación de la técnica

Con la finalidad de encontrar ácidos grasos celulares que sirvan como biomarcadores y que permitan lograr la identificación de las comunidades microbianas en un ambiente determinado, se consideró realizar una revisión y análisis de referencias bibliográficas relacionadas con la utilización de los AGC y obtener una base de datos bibliográficos de aquellos AGC que identifiquen a comunidades bacterianas de ambientes anaerobios, facultativos y aerobios.

2.2 Calibración e implementación de la técnica

2.2.1 Cepas puras

Las especies *Pseudomonas aeruginosa* FMU 095081 y *Escherichia coli* FMU 047149, fueron obtenidas del cepario del Postgrado de la Facultad de Medicina Humana de la UNAM. *Clostridium innocuum* C19, se obtuvo del cepario del postgrado de la Facultad de Química de la UNAM. Estas tres cepas se escogieron teniendo en cuenta dos aspectos, el primero como representativas de ambientes aerobios, facultativos y anaerobios y el segundo por ser organismos no patógenas.

El género *Pseudomonas* pertenece a la familia *Pseudomonadaceae*, se caracterizan por ser bacilos Gram negativos, aerobios estrictos, metabolismo respiratorio nunca

fermentativo, reacción catalasa y oxidasa positiva. Son capaces de usar mas de un compuesto de carbono orgánico como única fuente de carbono y energía (Bergey's, 1984).

El género *Escherichia* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* las cuales presentan algunas características como, ser bacilos Gram negativos, crecer en la presencia de oxígeno, metabolismo respiratorio y fermentativo, reacción catalasa positiva y oxidasa negativa, reducir nitratos a nitritos (Bergey's. 1984).

El género *Clostridium* se caracteriza por ser anaerobio estricto, carecer de sistemas de citocromos y de un mecanismo para la fosforilación oxidativa por transporte de electrones, obtener el ATP por fosforilación a nivel sustrato. La separación de los géneros en subgrupos se basa principalmente sobre sus propiedades y en la naturaleza del donador de electrones usados. Algunos grupos del género *Clostridium* se caracterizan por fermentar solo carbohidratos, fermentar proteínas o aminoácidos, fermentar carbohidratos o aminoácidos, fermentar purinas y fermentar etanol hasta ácidos grasos (Brock, 1997)

2.2.2 Consorcios microbianos

2.2.2.1 Lodo aerobio

Se obtuvieron dos tipos de lodos aerobios, ambos provenientes de plantas de tratamiento de aguas residuales municipales; uno de la UNAM y el otro de Cerro de la Estrella en México D.F. Estos lodos sirvieron para obtener perfiles de ácidos grasos de una comunidad bacteriana en un lodo aerobio para establecer un patrón característico de estos ambientes.

2.2.2.2 Lodo anaerobio

Este lodo se obtuvo de un biodigestor ubicado en Almoloya del Río, Estado de México que trata aguas residuales municipales que recibe descargas de fábricas textiles. Esta muestra también se usó para encontrar un patrón de ácidos grasos en un ambiente anaerobio.

2.2.2.3 Biopelícula de un reactor anaerobio

Se obtuvo la biopelícula de un reactor anaerobio operativo, para el análisis de los ácidos grasos, el cual sirvió como un patrón comparativo frente a la biopelícula de los reactores analizados (Cruz y Buitrón 1999).

2.3 Aplicación de la técnica

2.3.1 Biomasa del reactor anaerobio/aerobio secuenciado

2.3.1.1 Características del biorreactor SBR anaerobio/aerobio

El experimento fue realizado con un reactor SBR a escala laboratorio y el equipo fue instalado en el Laboratorio de Bioprocesos Ambientales del Instituto de Ingeniería de la UNAM, en la Ciudad de México y los análisis de cromatografía se realizaron en el laboratorio de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Para este estudio se emplearon dos biorreactores tipo SBR empacados con piedra volcánica (tezontle) y enchaquetado con agua para mantener la temperatura en 25 ± 2 °C (Figura 4).

El SBR consiste de un tanque cilíndrico de material de acrílico de 60 cm de alto y 14 cm de diámetro interior, las piezas del reactor se encuentran selladas con

pegamento silicón y la tapa superior sujeta por medio de tornillos. Cuenta con un espacio en la parte inferior en donde se aloja el difusor de aire (8 cm de altura).

El reactor, con capacidad de 7 litros, fue empacado con piedra volcánica (*puzolana*) de 2-3 cm de diámetro. El reactor tiene una cama de soporte de 40 cm. En la parte superior del reactor se tienen 6 orificios de 1 pulgada de diámetro por donde se colocaron los sistemas de medición (ORP, OD, pH, T) y mangueras

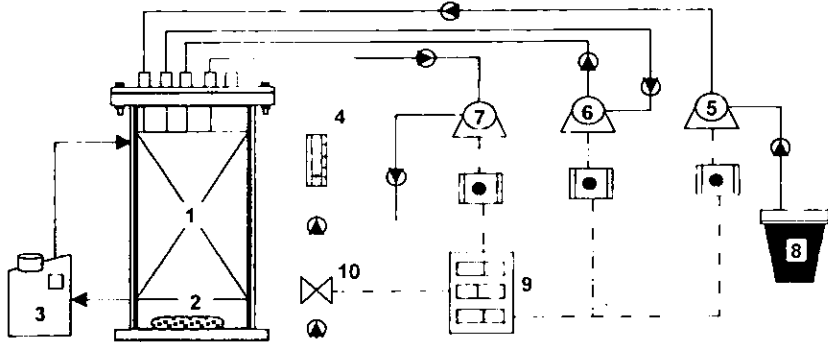


Figura 4. Diagrama del reactor SBR empacado utilizado para la degradación de 2,4-DNF. (1) Reactor empacado, (2) difusor de aire, (3) calentador, (4) rotámetro, (5) bomba de llenado, (6) bomba de recirculación, (7) bomba de descarga, (8) tanque de alimentación, (9) Controlador de tiempo (10) válvula selenoide

2.3.1.2 Condiciones de operación del biorreactor SBR anaerobio/aerobio

2.3.1.2.1 Biorreactor SBR anaerobio/aerobio alimentado con 4-nitrofenol

En cada ciclo de operación del reactor se empleó un tiempo de sedimentación de cinco minutos, descarga cinco minutos y alimentación de cinco minutos. El volumen de intercambio al final de cada ciclo de operación entre 70 a 85 %, la velocidad de

recirculación se mantuvo en 200 mL/minuto. El flujo de aireación se mantuvo en 1.90 L/minuto controlado por un rotámetro de 5 SFCH.

El biorreactor fue alimentado con 4-nitrofenol con una concentración de 62 mg/l operado durante 247 días, con ciclos anaerobios de cuatro horas y ciclos aerobios de 3.5 horas. Las eficiencias de remoción fueron del 98%, a una temperatura de 27°C y con pH variable, durante el ciclo, de 7.2 a 8.2 (Melgoza *et al.*, 1999).

2.3.1.2.2 Biorreactor SBR anaerobio/aerobio alimentado con 2-4 dinitrofenol

Las siguientes condiciones se mantuvieron en todas las etapas de operación del reactor en esta investigación. En cada ciclo de operación del reactor se empleó un tiempo de sedimentación de 20 minutos, descarga diez minutos y alimentación de cinco minutos. El volumen de intercambio al final de cada ciclo de operación fue del 75%, es decir, siempre se dejó en el reactor el 25% del total del volumen de operación (volumen de llenado).

La velocidad de recirculación se mantuvo siempre constante durante el ciclo de operación del reactor y en contracorriente de la difusión de aire, es decir, con flujo descendente. La salida de aire se controló mediante un rotámetro con flujo constante de 5 SFCH, manteniendo en la etapa aerobia del proceso una concentración mayor a 2 mg/L de oxígeno disuelto.

Para la operación de los ciclos se emplearon tres bombas peristálticas Cole-Parmer, dos de velocidad variable: una para alimentación (de 6-600 r.p.m.) otra para descarga (de 100 r.p.m.) y una de velocidad constante (de 60 r.p.m para recirculación). Todo el equipo eléctrico, bombas y válvulas selenoide de aire fueron operadas por un controlador de tiempo marca Chrontroni (Linburg Enterprises, San

Diego, CA, USA), de cuatro canales de entrada. Es importante señalar que durante la experimentación el pH no fue controlado.

El biorreactor fue alimentado con 2-4 dinitrofenol a una concentración de 30 mg/L. operado durante cuatro meses. con ciclos anaerobios de 21 horas y ciclos aerobios de seis horas. Las eficiencias de remoción fueron del 95% y a una temperatura de 25°C (Juárez *et al.*, 1999)

2.3.2 Preparación de los microorganismos para el análisis

2.3.2.1 Cepas puras

De cada cepa de *P. aeruginosa* y *E. coli*, se tomó una de las colonias crecidas en agar nutritivo y se hicieron resiembras mediante el método de estrias en placa de agar e incubadas por 24 horas a 37°C, después se obtuvo una muestra por raspado de aproximadamente 10 mg. La cepa de *Clostridium innocum*, se resembró en caldo tioglicolato por 48 horas a 37°C, en condiciones de anaerobiosis. Para el análisis se concentró por centrifugación a 3000 r.p.m. durante 15 minutos.

2.3.2.2 Consorcios bacterianos

La biomasa de los lodos anaerobios y aerobios se filtraron, usando papel de filtro grueso, luego el filtrado fue sometido a centrifugación a 3000 r.p.m. por 15 minutos con la finalidad de obtener el sedimento o pellets, para el análisis respectivo.

2.3.2.3 Biopelícula de biorreactores

Las muestras de la biopelícula adherida al empaque de los reactores anaerobio/aerobio, se obtuvieron mediante raspado. A fin de establecer si existían

diferencias de la biomasa a distintas profundidades del reactor, se tomaron muestras de biopelícula del empaque del nivel superior, medio e inferior (20, 40 y 60 cm, respectivamente).

Posteriormente, con el propósito de conocer la distribución de los microorganismos a diferente profundidad en el tezontle, las piedras de tezontle de cada nivel se partieron cuidadosamente por la mitad, usando para ello un cincel, para luego obtener por raspado, mediante una espátula de acero, una muestra de la parte externa y otra de la parte interna (Figura 5).

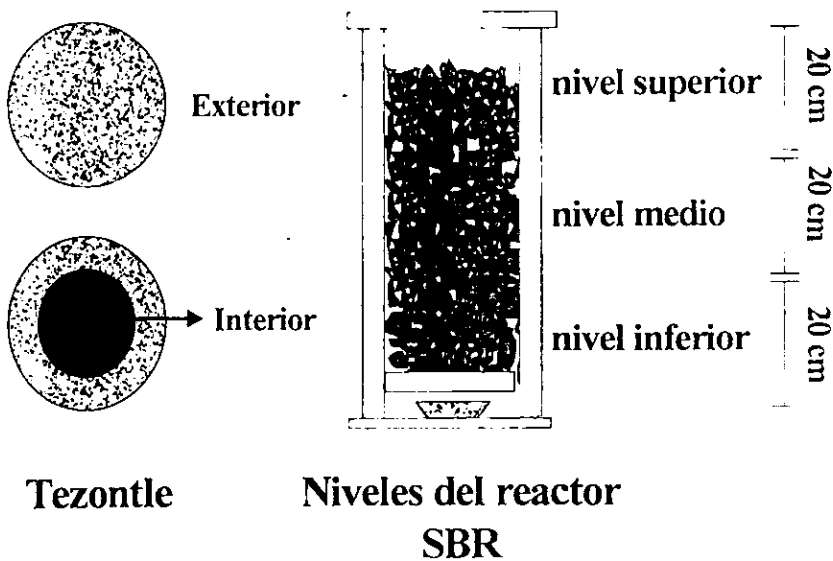


Figura 5. Toma de muestra de la biopelícula del biorreactor y del empaque

2.3.3 Tratamiento de las muestras biológicas

2.3.3.1 Extracción y metilación de los ácidos grasos

Todas las muestras fueron colectadas en tubos de prueba de material de vidrio y sometidas directamente al proceso de la extracción de los ácidos grasos totales de la siguiente manera (Muñoz *et al.*, 1997):

a) Saponificación bajo reflujo, con una solución de KOH al 5% más una mezcla de metanol-benceno 8:2 v/v a 70°C, por espacio de 16 horas. Después de este tiempo cada tubo de prueba con las muestras se sometió a una corriente de aire para evaporar el solvente.

b) Extracción de los lípidos con éter etílico: A cada una de las muestras se le agregó 1 mL de HCl al 10% más 1 mL de éter etílico, después de agitar, el sobrenadante orgánico éter, que contenía a los lípidos disueltos de cada tubo, se extrajo con una pipeta pasteur y fue colocado en nuevos tubos de prueba, esta operación se repitió por tres veces.

Seguidamente a cada tubo conteniendo el sobrenadante se le agregó 1 mL de agua destilada con el fin de lavar impurezas, se agitaron nuevamente y el sobrenadante fue colocado en nuevos tubos de prueba, esta operación se repitió tres veces.

Después se sometieron todas las muestras a una corriente de aire para evaporar el solvente

c) Esterificación de los ácidos con diazometano: Los ácidos obtenidos en el paso anterior fueron resuspendidos en 1 mL de éter etílico y se adicionó 1 mL de una solución de diazometano (mezcla de éter etílico con nitrosometilurea), para su metilación, se dejó reaccionar por quince minutos, después se evaporó el solvente en baño de agua a 60°C, quedando finalmente los ácidos grasos adheridos a las paredes del tubo y listos para inyectarse en el cromatógrafo.

2.3.3.2 Análisis de los ácidos grasos

Cada muestra conteniendo los ácidos grasos esterificados, antes de ser inyectados en el cromatógrafo fueron resuspendidos con 3 gotas de éter de petróleo y de esta suspensión se tomó con una jeringa un volumen de 3 μL , el cual se inyectó en el cromatógrafo.

Los ácidos grasos se analizaron en forma de derivados metilados en un cromatógrafo VARIAN STAR 3600 CXGC (Varian Associates, Inc USA), equipado con una columna capilar de sílice fundida DB-1, de 30 m de longitud, 0.32 mm de diámetro y 1 μm de grosor y con un detector de ionización de flama.

La elución se efectuó con nitrógeno como gas acarreador a un flujo de 1 mL/min con un gradiente de temperatura de 150°C a 250°C, a razón de 4°C/min mantenida por cuatro minutos la temperatura inicial y por 15 minutos la temperatura final. el tiempo de análisis fue de 45 minutos.

Los resultados se obtuvieron en un Registrador/Integrador Varian 4400, acoplado al cromatógrafo. Los datos obtenidos y registrados en el integrador aparecen en un cromatograma, en el cual se muestran los tiempos de retención y las áreas bajo la curva que son proporcionales a la cantidad de los ácidos grasos constituyentes de la célula bacteriana.

Los cromatogramas fueron comparados contra un estándar comercial para identificación de bacterias, catálogo 4-7080-U (Supelco/Sigma Aldrich Co. USA), el cuál contiene una concentración de 100 mg/mL de ácidos grasos bacteriales disueltos en metil caproato y que sirvió para lograr la identificación de las muestras.

2.3.3.3 Análisis estadístico para los ácidos grasos celulares (AGC) en los biorreactores anaerobio/aerobio

El análisis por componentes principales (ACP), fue utilizado para interpretar el perfil de los ácidos grasos, contando para ello con el programa Statgraphics versión 5.0 1991 de la Statistics Graphic Corporation (Schmid, 1983).

El análisis por componentes principales, es un método estadístico multivariado, cuyo propósito es recoger la variación total de un conjunto de variables originales, en variables artificiales compuestas por las primeras, que sucesivamente acumulan la máxima variabilidad en los datos. La varianza explicada por cada componente se denomina valor propio (autovalor) y los coeficientes de las variables originales en la ecuación lineal que representa a cada componente, se denominan vectores propios (autovector), indicando su contribución la mayor o menor importancia de las mismas en la variabilidad explicada por ese eje o componente, es decir, cuáles variables son las responsables de esa variabilidad en el mismo (Velázquez y Colmenares, 1999).

Posteriormente, una vez establecidos los componentes que explican la mayor fracción de la variabilidad total, los mismos son representados gráficamente en un plano, lo cual permite establecer un diagrama de dispersión de los individuos de la muestra estudiada en función de los componentes obtenidos, estableciendo posibles agrupamientos (Velázquez y Colmenares, 1999; Sundh *et al.* 1997).

De los picos que se obtuvieron (que representan el contenido de los ácidos grasos), en los cromatogramas, el punto de interés son aquellos ácidos grasos identificados mediante el estándar y que se repiten continuamente en cada cromatograma. Una vez seleccionados aquellos picos de importancia se siguieron los siguientes pasos

Normalización de los datos

- a) Se agruparon para cada cromatograma los picos seleccionados con sus respectivas áreas bajo la curva, obtenidos en un intervalo de tiempo de 45 minutos.
- b) Se sumaron todas las áreas bajo la curva, de solo aquellos picos identificados con el estándar, para cada cromatograma a fin de obtener un total y sobre la base de este total se calcularon los porcentajes para cada uno de los picos.

Análisis por componentes principales

Se utilizaron dos columnas de datos: la primera columna representó a cada una de las muestras analizadas y la segunda columna a los ácidos grasos expresados como porcentajes y contenidos en cada muestra.

CAPITULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Sustento teórico de la técnica

Con el objeto de sustentar el método de los ácidos grasos celulares (AGC) como indicador de la actividad respiratoria de los microorganismos, se realizó una búsqueda bibliográfica sobre el tema, desde el año 1980 hasta el 2000. Del análisis bibliográfico, se encontró que los AGC pueden ser usados para identificar género y especie principalmente; para cultivos de microorganismos puros, para comunidades microbianas que se encuentran habitando en sedimentos y suelos (Zelles *et al.*, 1997; Bossio y Scow, 1998).

La información obtenida se ordenó y sistematizó. Los resultados se muestran en la Tabla 1. Ahí se indican los AGC que sirven como biomarcadores del metabolismo respiratorio de bacterias que habitan en diversos ambientes y que nos permite utilizarlos para nuestro propósito experimental.

3.2 Implementación de la técnica

3.2.1 Establecimiento de las condiciones operatorias del cromatógrafo

Tomando en consideración las indicaciones dadas por el fabricante del estándar comercial, las condiciones del cromatógrafo fueron las siguientes: Temperaturas del inyector y detector, 260 y 280°C. El programa de temperatura del horno fue 150°C a 250°C, a razón de 4°C/minuto, la temperatura inicial fue mantenida por cuatro minutos y la temperatura final por cinco minutos.

Tabla 1. Ácidos grasos celulares y su interpretación

| Grupo | Ácidos grasos | Organismos |
|---------------------|---|--|
| Saturados | C12:0, C14:0, C15:0, C16:0, C17:0, C18:0, C19:0, C20:0 | Altos porcentajes en anaerobios (<i>Clostridium</i> , <i>Desulfovibrio</i> , <i>Bacteroides</i>) y en Enterobacterias Boe y Gjerde (1980), Vestal y White (1989), Welch (1991), Ghanem <i>et al</i> (1991), Helander y Haikara (1995), Ringelberg <i>et al</i> (1997), Ospov y Turoba (1997), Bossio <i>et al</i> (1998), Yamamoto <i>et al</i> (1998), Inghan <i>et al</i> (1998), Evans <i>et al</i> (1998), Chhib <i>et al</i> (1999), Flahaut <i>et al</i> (2000) |
| Insaturados | C16:1 ⁿ , C18:1 ^{n,12} , C18:1 ⁿ cis, C18:1 ⁿ trans | Gram negativos Principalmente anaerobio facultativos como <i>Enterobacteriaceae</i> y en segundo lugar aerobios como <i>Pseudomonas</i> Boe y Gjerde (1980), Vestal y White (1989), Rajendran (1992), Basile <i>et al</i> (1995), Ospov y Turoba (1997), Sunh <i>et al</i> (1997), Zelles <i>et al</i> (1997), Lindahl <i>et al</i> (1997), Los y Murata (1998) |
| Ramificados | C i-14:0, C i-15:0, C a-15:0, C i-16:0, C i-17:0, C a-17:0, C i-18:0 | Principalmente en aerobios Gram positivos (<i>Bacillus</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Corynebacterium</i>) Komagata y Susuki (1987), Vestal y White (1989), Kaneda (1991), Welch (1991), Haack <i>et al</i> (1994), Basile <i>et al</i> (1995), Lindahl <i>et al</i> (1997), Sundh <i>et al</i> (1997), Ringelberg <i>et al</i> (1997), McNabb <i>et al</i> (1997), Bossio <i>et al</i> (1998), Bossio y Scow (1998) |
| Hidroxi | C2-OH10:0, C2-OH12:0, C3-OH12:0, C3-OH 14:0 | Principalmente aerobios estrictos Gram negativos como <i>Pseudomonas</i> Komagata y Susuki (1987), Veys <i>et al</i> (1989), Haack <i>et al</i> (1994), Ibañez <i>et al</i> (1997), Ospov y Turoba (1997), Olsson <i>et al</i> (1999) |
| Ciclopropano | C17:0 ³ , C19:0 ³ | Anaerobio facultativos y aerobios <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Pseudomonas</i> Boe y Gjerde (1980), Vestal y White (1989), Rajendran <i>et al</i> (1992), Bossio y Scow (1998), Flahaut <i>et al</i> (2000) |

Con estas condiciones se inyectó en el equipo 1 µL del estándar, luego de un lapso de 30 minutos que duró el análisis se presentaron e identificaron 20 de los 26 ácidos grasos indicados en el catálogo del fabricante del estándar. Frente a ello, se decidió incrementar por más tiempo la temperatura final de 250°C, primero se mantuvo por diez minutos y luego por quince minutos.

Tabla 2. Ácidos grasos del estándar comercial de Supelco y tiempos de retención.

| Nº Pico | Tiempo de retención | Nomenclatura | Nombre del ácido graso |
|---------|---------------------|----------------------|-------------------------------|
| 1. | 13.35 | 11:0 | Undecanoato |
| 2. | 13.63 | 2-OH 10:0 | 2-hidroxi decanoato |
| 3. | 16.25 | 12:0 | dodecanoato |
| 4. | 19.19 | 13:0 | tridecanoato |
| 5. | 19.56 | 2-OH 12:0 | 2-hidroxi decanoato |
| 6. | 20.29 | 3-OH 12:0 | 3-hidroxi decanoato |
| 7. | 22.09 | 14:0 | tetradecanoato |
| 8. | 23.94 | n-15:0 | 15-metilpentadecanoato |
| 9. | 24.18 | a-15:0 | 12-metiltetradecanoato |
| 10. | 24.94 | 15:0 | pentadecanoato |
| 11. | 25.38 | 2-OH 14:0 | 2-hidroxi tetradecanoato |
| 12. | 26.07 | 3-OH 14:0 | 3-hidroxi tetradecanoato |
| 13. | 26.71 | n-16:0 | 14-metilpentadecanoato |
| 14. | 27.11 | 16:1 ⁿ | cis-9-hexadecanoato |
| 15. | 27.67 | 16:0 | hexadecanoato |
| 16. | 29.37 | n-17:0 | 15-metilhexadecanoato |
| 17. | 30.02 | 17:0 ⁿ | cis-9,10-metilenhexadecanoato |
| 18. | 30.56 | 17:0 | heptadecanoato |
| 19. | 30.93 | 2-OH 16:0 | 2-hidroxi hexadecanoato |
| 20. | 31.67 | 18:2 ^{n,12} | cis-9,12-octadecadienoato |
| 21. | 32.38 | 18:1 ⁿ | cis-9-octadecenoato |
| 22. | 32.63 | 18:1 ⁿ | trans-9-octadecenoato |
| 23. | 33.46 | 18:0 | octadecanoato |
| 24. | 36.62 | 19:0 ⁿ | cis-9,10-metilenoctadecanoato |
| 25. | 37.21 | 19:0 | nonadecanoato |
| 26. | 41.82 | 20:0 | eicosanoato |

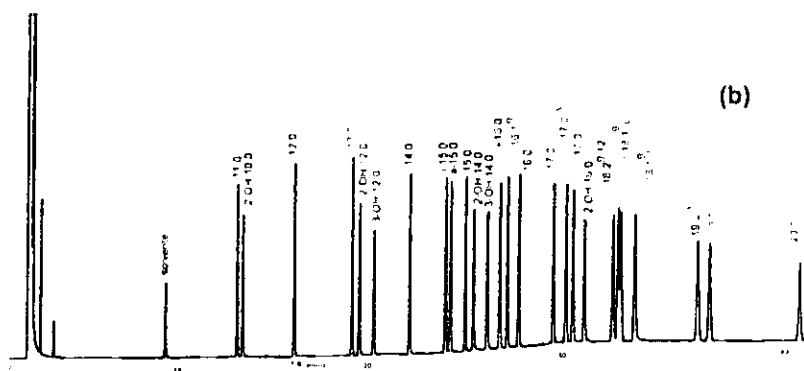
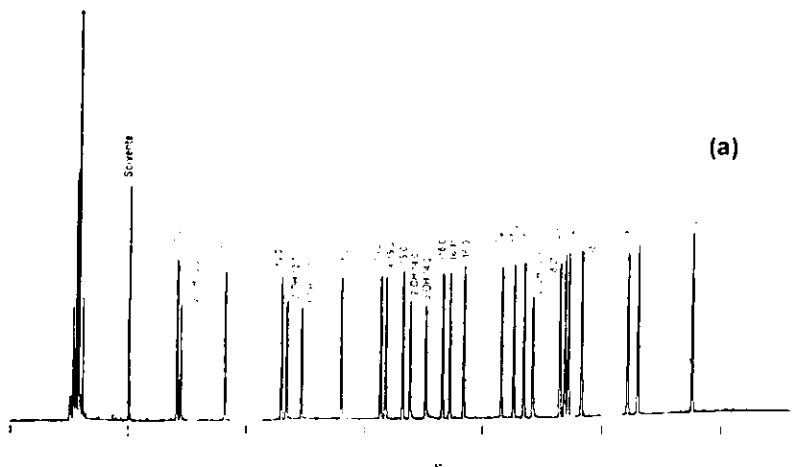


Figura 6. Picos cromatográficos del estándar comercial a) proporcionado en el catálogo del fabricante y b) obtenido experimentalmente en nuestro equipo.

Con este último tiempo y durante su espacio se observó en el cromatograma, la completa presencia de los ácidos grasos del estándar comercial (Tabla 2, Figura 6 Anexo 2 Figura A1) Con ello quedaron definidas las condiciones del cromatógrafo, para el análisis posterior de las muestras problemáticas.

3.2.2 Perfil de los ácidos grasos de cultivos puros

En la Tabla 3 se presentan los ácidos grasos de las tres cepas de referencia *Escherichia coli*, es una bacteria anaerobia facultativa en la cual se observa la presencia de los ácidos grasos C12:0, C16:1⁹, C18:1⁹ cis y C17:0¹, los cuales son reportados para la familia *Enterobacteriaceae*, dentro de los cuales se encuentra *E. coli* (Figura 7). Esta familia se distingue de otros Gram negativos por presentar altos porcentajes de ácidos grasos C12:0, C16:0, C16:1⁹ y C17:0¹ (Boe y Gjerde, 1979, Ingram, 1977).



Figura 7. Perfil cromatográfico obtenido de *Escherichia coli*

En *Pseudomonas aeruginosa*, se notó la presencia de los ácidos grasos C2-OH 12:0 y C3-OH12:0 similares a los reportados por Welch (1991) y Kaneda (1991) Veys *et al.* (1989). Estos ácidos son componentes de las paredes y membranas celulares de bacterias aerobias Gram negativas, no fermentadoras como *Pseudomonas Flavobacterium* y *Alcaligenes*.

También se encontraron en esta cepa los ácidos grasos ciclopropanos C17:0^λ y C19:0^λ los cuales se reportan para *Pseudomonas* en porcentajes bajos en comparación de las enterobacterias (Figura 8), (Boe y Gjerde, 1979; Veys *et al.*, 1989). Por otro lado *P. aeruginosa* presenta el ácido graso insaturado C18:1⁹ trans, el cual se encuentra presente en el género *Pseudomonas* y se le relaciona también a organismos aerobios y facultativos en los sedimentos según Parkes y Taylor, (1983); Veys *et al.* (1989).

Tabla 3. Perfil cromatográfico de los ácidos grasos celulares de cepas puras

| Ácido Graso | <i>Escherichia coli</i> Facultativa | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Aerobia | <i>Clostridium innocuum</i> Anaerobio |
|-------------------------|--|--|--|
| 11:0 | | | |
| 2-OH 10:0 | | | |
| 12:0 | ● | ● | ● |
| 13:0 | | | |
| 2-OH 12:0 | | ● | |
| 3-OH 12:0 | | ● | |
| 14:0 | | | ● |
| i-15:0 | | | |
| a-15:0 | | | |
| 15:0 | | | |
| 2-OH 14:0 | | | |
| 3-OH 14:0 | | | |
| i-16:0 | | | |
| 16:1 ⁹ | ● | ● | ● |
| 16:0 | | ● | |
| i-17:0 | | | |
| 17:0 ^λ | ● | ● | |
| 17:0 | | | ● |
| 2-OH 16:0 | | | |
| 18:2 ^{9,11} | | | |
| 18:1 ⁹ cis | ● | | ● |
| 18:1 ⁹ trans | | ● | |
| 18:0 | | | ● |
| 19:0 ^λ | | ● | |
| 19:0 | | | |
| 20:0 | | | |

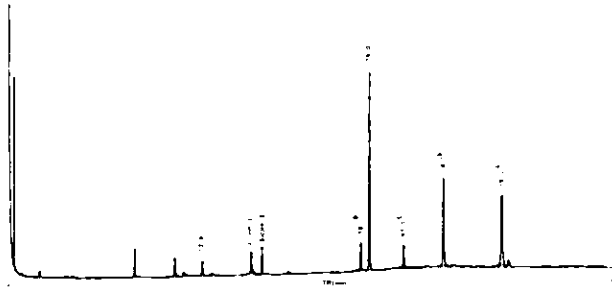


Figura 8. Perfil cromatográfico obtenido de *Pseudomonas aeruginosa*

El análisis de los ácidos grasos de la bacteria anaerobia, *Clostridium innocuum*, mostró una mayor predominancia de los ácidos grasos saturados C12:0, C14:0, C16:0 C17:0 y C18:0, y un insaturado el C18.1⁹ cis (Figura 9). Los tres primeros concuerdan con los reportados como característicos y abundantes para *Clostridium perfringens* por Moss y Lewis (1967)

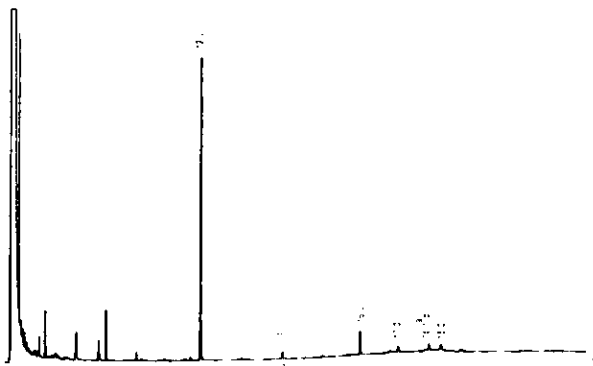


Figura 9. Perfil cromatográfico obtenido de *Clostridium innocuum*

Otros AGC reportados en altos porcentajes para *Clostridium botulinum* son C14:0, C16:0, C18:0, C18:1⁹ cis (Evans *et al.*, 1998), para *Clostridium tyrobutyricum* C16:0, C14:0, C18:0 y C18:1⁹ cis (Ingham *et al.*, 1998).

Cabe resaltar que los AGC con grupo hidroxilo y ciclopropano no se observan en *Clostridium*, que es una bacteria anaerobia (Tabla 3).

3.2.3 Perfil de los ácidos grasos de consorcios aerobios y anaerobios

En el caso del primer lodo aerobio proveniente de la planta de tratamiento de aguas residuales de la UNAM, se observó una predominancia de los ácidos insaturados, que corresponden a bacterias anaerobias facultativas Gram negativas, principalmente enterobacterias. Se destaca también la presencia del ácido graso insaturado C18:2^{9,12} encontrado en algunas bacterias Gram negativas. Sin embargo este ácido es un indicador de microeucariontes (Bossio y Scow, 1998; Boe y Gjerde, 1979), Tabla 4, Anexo 2 Figura A2 a).

En el otro lodo aerobio, proveniente de la planta de tratamiento de aguas municipales del Cerro de la Estrella, se notó la presencia de varios tipos de AGC como, saturados, insaturados, ramificados, con grupos ciclopropano e hidroxilo, indicando la presencia de comunidades principalmente aerobias y anaerobias facultativas (Tabla 4, Anexo 2 Figura A2 b).

Nuestros resultados encontrados para este tipo de lodos se refuerzan con lo encontrado por otros investigadores quienes trabajaron con sedimentos y suelos. Por ejemplo, se reporta que existe una estrecha relación entre los AGC saturados e insaturados, de tal forma que cuando existen condiciones aerobias, los AGC insaturados se incrementan y los saturados disminuyen (Ringeberg *et al.*, 1997).

Tabla 4. Perfil de los ácidos grasos celulares de consorcios aerobios y anaerobios

| Ácido Graso | ^a Lodo aerobio | ^b Lodo aerobio | Lodo anaerobio |
|-------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------|
| 11:0 | | | |
| 2-OH 10:0 | | | |
| 12:0 | ● | ● | ● |
| 13:0 | | | |
| 2-OH 12:0 | | | |
| 3-OH 12:0 | | ● | |
| 14:0 | | ● | ● |
| i-15:0 | ● | ● | ● |
| a-15:0 | | ● | ● |
| 15:0 | | | |
| 2-OH 14:0 | | | |
| 3-OH 14:0 | | ● | |
| i-16:0 | ● | | |
| 16:1 ⁵ | ● | ● | ● |
| 16:0 | | ● | ● |
| i-17:0 | | | |
| 17:0 ^Δ | | | |
| 17:0 | | | |
| 2-OH 16:0 | | | |
| 18:2 ^{ST3} | ● | ● | ● |
| 18:1 ⁷ cis | ● | ● | ● |
| 18:1 ⁹ trans | ● | ● | ● |
| 18:0 | | ● | ● |
| 19:0 ^Δ | | ● | |
| 19:0 | | ● | |
| 20:0 | | | |

a: Planta de tratamiento UNAM

b: Planta de tratamiento Cerro de la Estrella

Cuanto más superficial es un suelo mayor es la presencia de los AGC insaturados, por otro lado en zonas donde ocurren inundaciones estacionales, los sedimentos se tornan más anaerobios y los AGC insaturados disminuyen por existir menor concentración de oxígeno, tomando en cuenta este parámetro. (Ringelberg *et al.*, 1997; Rajendran *et al.*, 1992; Bossio y Scow, 1998; Yanagibayashi *et al.*, 1999).

De igual manera se reporta que los AGC ramificados son muy abundantes en suelos y sedimentos en microcosmos expuestos a una aeración continua, aunque también

se reportan en proporciones muy bajas para ambientes anaerobios (Sunh *et al.* 1997; Bossio y Scow, 1998; Zelles *et al.*, 1997).

El análisis de los ácidos grasos del lodo anaerobio, reveló una mayor presencia de los AGC saturados seguido de los AGC insaturados, estos resultados nos indicarían que las comunidades existentes en ese lodo son predominantemente anaerobias y en segundo término anaerobio facultativo Gram negativas como las Enterobacterias. (Guckert *et al.*, 1985,1986 y Kaneda, 1977).

También se observó la presencia de ácidos grasos ramificados, lo que nos indicaría que también habitan en muy baja proporción algunos microorganismos aerobios (Tabla 4, Anexo A2 Figura A3 a).

3.2.4 Perfil de los ácidos grasos del reactor anaerobio

Al analizar los microorganismos de este reactor, se encontró una predominancia de los ácidos grasos saturados como el C12:0, C14:0, C16:0, C17:0 y C18:0, los tres primeros son muy abundantes en bacterias anaerobias como *Clostridium perfringens* (Moss y Lewis, 1967), el tercero y cuarto también se reporta para Enterobacterias como *Eschericia coli* y *Salmonella* (Welch, 1991), el quinto se reporta para *Fusobacterium* otra bacteria anaerobia (Tabla 5, Anexo 2 Figura A3 b).

También en esta biopelícula se puede observar la presencia de ácidos grasos insaturados y con grupo hidroxilo, los cuales abarcarían tanto a las bacterias Gram negativas como las Enterobacterias las cuales son anaerobias facultativas (Boe y Gjerde, 1979).

Se encontraron también AGC ramificados como C i-15:0, C a-15:0, los cuales son reportados como predominantes en sedimentos de tipo aerobio (Guckert *et al.*, 1986, Harwood y Rusell, 1984), pero se reportan también en algunos casos para bacterias anaerobias como *Propionibacterium* y sulfatoreductoras (Welch, 1991).

Los ácidos C i-16:0 y C i-17:0 se presentan también en bacterias Gram negativas como la familia *Vibrionaceae* (McNabb *et al.*, 1997).

Tabla 5. Perfil de los ácidos grasos celulares para un biorreactor anaerobio

| Ácido Graso | Reactor anaerobio (Azul disperso 79) |
|-------------------------|--------------------------------------|
| 11:0 | |
| 2-OH 10:0 | • |
| 12:0 | • |
| 13:0 | |
| 2-OH 12:0 | |
| 3-OH 12:0 | • |
| 14:0 | • |
| i-15:0 | • |
| a-15:0 | • |
| 15:0 | • |
| 2-OH 14:0 | |
| 3-OH 14:0 | |
| i-16:0 | |
| 16:1 ^v | • |
| 16:0 | • |
| i-17:0 | • |
| 17:0 | |
| 17:0 | • |
| 2-OH 16:0 | |
| 18:2 ^{v,11} | • |
| 18:1 ^v cis | • |
| 18:1 ^v trans | • |
| 18:0 | • |
| 19:0 | |
| 19:0 | |
| 20:0 | |

3.2.5 Comparación de los perfiles obtenidos con la literatura

Los perfiles de los AGC, obtenidos para las cepas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Clostridium innocuum*, comparten algunos AGC reportados para la amplia gama de microorganismos de este tipo.

Por ejemplo, la cepa de *E. coli*, presenta los AGC C12:0, C16:1⁹, C18:1⁹ y C17:0¹, los cuales se reportan como abundantes en la familia *Enterobacteriaceae*, las cuales son bacterias anaerobias facultativas Gram negativas y lo podemos observar en la Figura 7 y 10a (Boe y Gjerde, 1979; Komagata y Susuky, 1987).

Para *Pseudomonas aeruginosa*, otra Gram negativa no fermentativa, presentó ocho AGC, de los cuales son representativos y reportados para este grupo, aquellos que contienen el grupo hidroxilado C2-OH12:0 y C3-OH12:0, estos ácidos grasos proveen evidencias de la oxidación microbiana, como un paso importante hacia la degradación de los AGC en sistemas biológicos (Ibañez *et al.*, 1997; Veys *et al.*, 1989; Komagata y Susuky, 1987) (Figuras 8, 10b y 10 c).

Por otro lado en la Figura 10, se puede notar la mayor presencia de AGC ramificados para una bacteria aerobia Gram positiva como *Arthrobacter globiformis* CNF 022, los cuales identifican principalmente a las comunidades aerobias Gram positivas (Komagata y Susuky, 1987; Welch, 1991; Kaneda, 1991; Rajendran, 1992; Bossio y Scow, 1998).

En *Clostridium innocuum*, una bacteria anaerobia estricta, se nota la predominancia de los AGC saturados, similares a los que presentan otros anaerobios estrictos reportados para especies del género *Clostridium* y *Pectinatus*, observados en el perfil cromatográfico de las Figuras 9 y 10e (Helander y Haikara, 1995; Ghanem *et al.*, 1991).

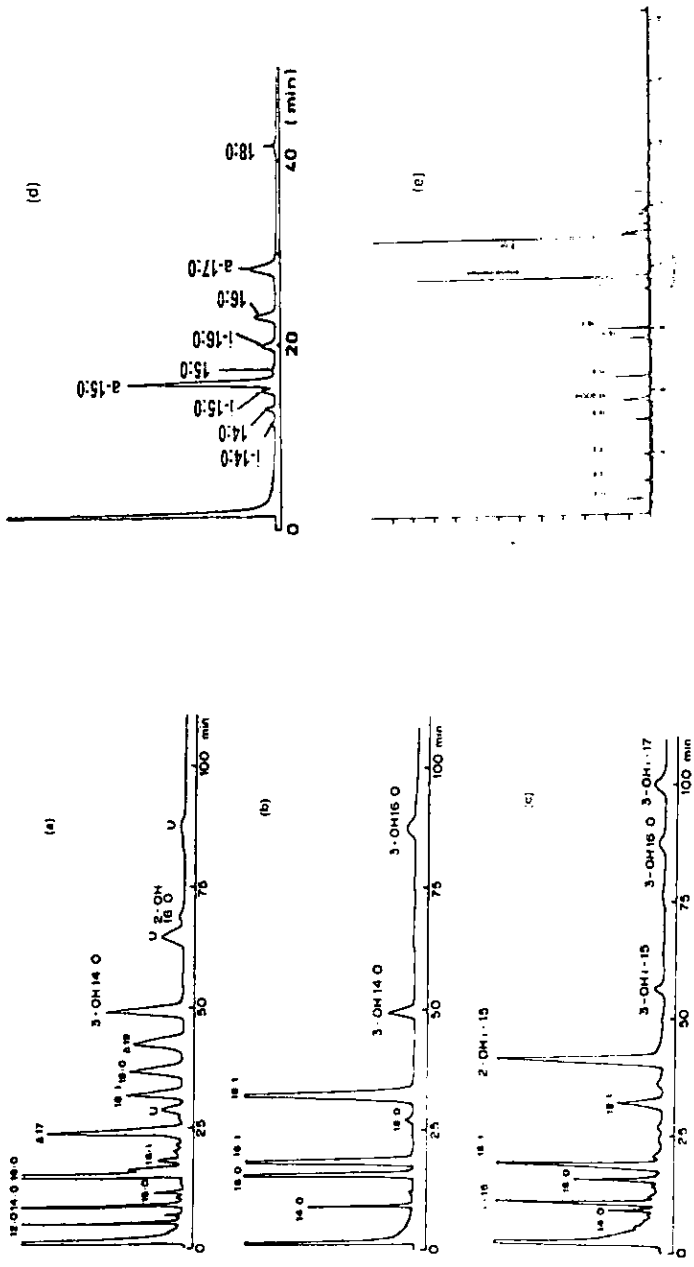


Figura 10. Perfiles cromatográficos de AGC de aerobios Gram negativos a) *E. coli* IAM 1268 b) *Pseudomonas cepacia* KS 0233 y c) *Cytophaga heparina* KS 0418; de aerobios Gram positivos d) *Arthrobacter globiformis* CNF 022 y de un anaerobio estricto *Pectinatus frisingensis* (d). Tomados de Komagata y Susuky (1987).

Del análisis anterior podemos concluir que, la presencia y abundancia de ciertos ácidos grasos celulares identifican el metabolismo respiratorio no sólo de cepas puras, sino también de las comunidades bacterianas en general, que habitan en diversos ambientes de suelos, sedimentos y lodos activados. Por lo tanto esta metodología puede ser aplicada para la biomasa de nuestros biorreactores permitiéndonos con ella identificar a las comunidades mencionadas, con base a la presencia de ácidos grasos celulares biomarcadores y tomando como base el tipo de metabolismo respiratorio, mismo que se resume en la Tabla 6.

Tabla 6. Ácidos grasos biomarcadores de comunidades bacterianas

| Comunidad bacteriana | Ácido graso biomarcador |
|----------------------------------|---|
| Anaerobios | C12:0, C13:0, C14:0, C15:0, C16:0, C17:0, C18:0, C19:0, C17:0 Δ , C19:0 Δ |
| Gram negativos: | |
| Enterobacterias (facultativas) | C12:0, C16:0, C16:1 ^o , C18:1 ^o cis, C17:0 Δ |
| <i>Pseudomonas</i> (aerobios) | C2-OH10:0, C2-OH12:0, C3-OH12:0, C3-OH14:0, C17:0 Δ , C19:0 Δ |
| Gram positivos (aerobios) | C11-15:0, C11-15:0, C11-14:0, C11-16:0, C11-17:0, C11-17:0, C11-18:0 |

3.3 Aplicación de la técnica al proceso anaerobio/aerobio

3.3.1 Biorreactor SBR alimentado con 4-nitrofenol

3.3.1.1 Distribución espacial de las bacterias a diferentes profundidades en el biorreactor

La Tabla 7 muestra el análisis de tipo cualitativo para los ácidos grasos de la biopelícula del soporte encontrados externamente, en los niveles superior, medio e inferior. En los tres niveles, comparten en su mayor parte los mismos ácidos grasos.

por lo que se asume que la comunidad es la misma a lo largo del reactor (Anexo 2 Figura A4 a y b y Figura A5 a).

Tabla 7. Distribución espacial de los ácidos grasos celulares para un reactor anaerobio/aerobio alimentado con 4-nitrofenol

| Ácido Graso | REACTOR ANAEROBIO/AEROBIO (4-NF) | | | | | |
|-------------------------|----------------------------------|---------|---------|---------|----------|---------|
| | Superior | | Medio | | Inferior | |
| | Externo | Interno | Externo | Interno | Externo | Interno |
| 11:0 | | | | | | |
| 2-OH 10:0 | | | | | | |
| 12:0 | • | • | • | • | • | • |
| 13:0 | | | | | | |
| 2-OH 12:0 | • | | | | | |
| 3-OH 12:0 | • | | • | | • | |
| 14:0 | • | | • | | • | |
| i-15:0 | • | | • | | • | |
| a-15:0 | • | | • | | • | |
| 15:0 | | | | | | |
| 2-OH 14:0 | | | | | | |
| 3-OH 14:0 | | | | | | |
| i-16:0 | • | | • | | • | |
| 16:1 ^y | • | | • | | • | |
| 16:0 | • | • | • | • | • | • |
| i-17:0 | • | | | | | |
| 17:0 ^A | | | | | | |
| 17:0 | | • | • | • | | • |
| 2-OH 16:0 | | | | | | |
| 18:2 ^{9,12} | | | | | | |
| 18:1 ⁹ cis | • | | | | | |
| 18:1 ⁹ trans | | | • | | • | |
| 18:0 | • | • | • | | | |
| 19:0 ^A | | | | | | |
| 19:0 | | | | | | |
| 20:0 | | | | | | |

a: Biorreactor con 4-nitrofenol b: Profundidades del biorreactor c: Muestra exterior e interior de la piedra

Si sumamos cada grupo de AGC de los tres niveles externos observamos que, los AGC saturados, que representan principalmente a los anaerobios, son 12, mientras que los AGC insaturados, hidroxí y ciclopropano son 11. Estos representan a las bacterias anaerobia facultativas y aerobias como *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonas*.

Los AGC ramificados suman diez, indicando con ello que las bacterias Gram positivas aerobias, tienen una presencia muy activa en esta parte exterior de la biopelícula del reactor.

Para establecer la presencia y predominancia de las comunidades bacterianas, se realizó un análisis estadístico cuantitativo de los AGC (Tabla 8, Figura 11).

Tabla 8. Correlación entre los AGC de muestras de dos reactores anaerobio/aerobio por análisis de componentes principales

| Número Componente | Porcentaje de varianza | Porcentaje acumulativo | Número Componente | Porcentaje de varianza | Porcentaje acumulativo |
|-------------------|------------------------|------------------------|-------------------|------------------------|------------------------|
| 01 | 85.17417 | 85.17417 | 20 | 0.00008 | 99.99937 |
| 02 | 6.42642 | 91.60058 | 21 | 0.00008 | 99.99945 |
| 03 | 3.64714 | 95.24773 | 22 | 0.00008 | 99.99953 |
| 04 | 2.16759 | 97.41532 | 23 | 0.00007 | 99.99960 |
| 05 | 1.09178 | 98.50710 | 24 | 0.00007 | 99.99968 |
| 06 | 0.63159 | 99.13869 | 25 | 0.00006 | 99.99974 |
| 07 | 0.31513 | 99.45382 | 26 | 0.00006 | 99.99980 |
| 08 | 0.22393 | 99.67775 | 27 | 0.00004 | 99.99984 |
| 09 | 0.13599 | 99.81374 | 28 | 0.00003 | 99.99986 |
| 10 | 0.10892 | 99.92266 | 29 | 0.00002 | 99.99989 |
| 11 | 0.04663 | 99.96929 | 30 | 0.00002 | 99.99991 |
| 12 | 0.02062 | 99.98991 | 31 | 0.00002 | 99.99993 |
| 13 | 0.00620 | 99.99611 | 32 | 0.00002 | 99.99994 |
| 14 | 0.00171 | 99.99782 | 33 | 0.00001 | 99.99995 |
| 15 | 0.00079 | 99.99862 | 34 | 0.00001 | 99.99997 |
| 16 | 0.00025 | 99.99887 | 35 | 0.00001 | 99.99998 |
| 17 | 0.00022 | 99.99909 | 36 | 0.00001 | 99.99999 |
| 18 | 0.00010 | 99.99920 | 37 | 0.00001 | 100.00000 |
| 19 | 0.00009 | 99.99929 | 38 | 0.00000 | 100.00000 |

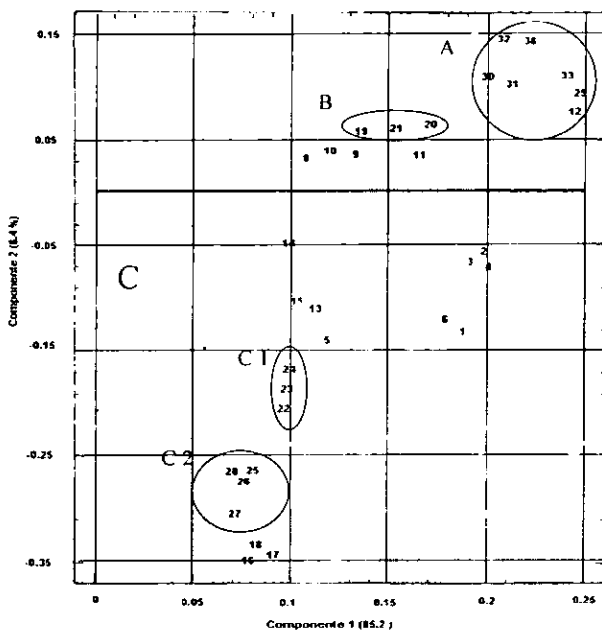


Figura11. Análisis por componentes principales de comunidades bacterianas del reactor anaerobio/aerobio alimentado con 4-nitrofenol

El nivel superior externo indicado con la letra B aparece un grupo muy definido, en donde predominan los AGC ramificados, corroborando con ello la presencia de una comunidad aerobia Gram positiva, para ese nivel.

Por otro lado para los niveles medio e inferior externo indicado con la letra C existe un consorcio bacteriano con características similares de bacterias Gram negativas, pero si lo subdividimos en sub grupos, en C₁ hay predominancia de AGC, C18:1⁹

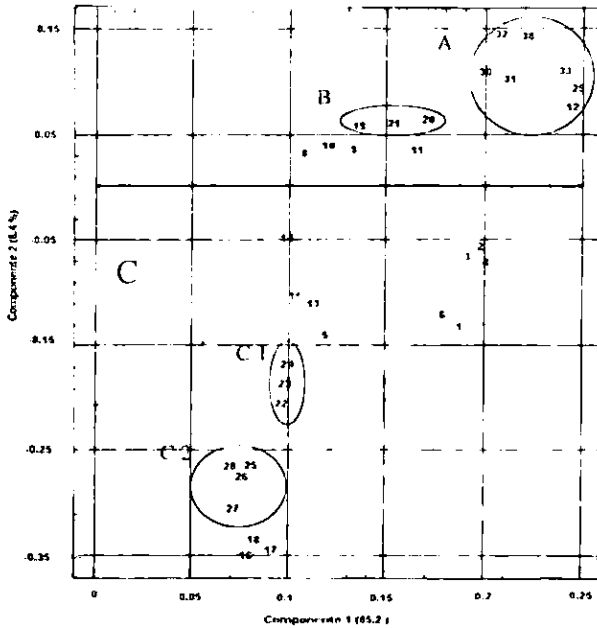


Figura 11. Análisis por componentes principales de comunidades bacterianas del reactor anaerobio/aerobio alimentado con 4-nitrofenol

El nivel superior externo indicado con la letra B aparece un grupo muy definido, en donde predominan los AGC ramificados, corroborando con ello la presencia de una comunidad aerobia Gram positiva, para ese nivel.

Por otro lado para los niveles medio e inferior externo indicado con la letra C existe un consorcio bacteriano con características similares de bacterias Gram negativas, pero si lo subdividimos en sub grupos, en C₁ hay predominancia de AGC, C18:1⁹

trans y C2-OH 10:0 característicos del género *Pseudomonas*, una aerobia estricta y en C₂ los AGC dominantes son el C16:0 y C16:1⁹ los cuales son dominantes en las anaerobias facultativas, como en las *Enterobacteriaceae*.

Por lo tanto podemos suponer que la comunidad bacteriana del nivel superior externo es diferente de las comunidades presentes en los niveles medio e inferior externo.

3.3.1.2 Distribución espacial de las bacterias dentro del empaque de tezontle

Del análisis anterior se dedujo que la parte exterior del tezontle se encuentra colonizada por comunidades bacterianas aerobias Gram positivas y Gram negativas, en la misma Tabla 8 se puede observar que cualitativamente los AGC encontrados en el interior del tezontle en sus tres niveles comparten los mismos AGC saturados y no se encontró la presencia de otros AGC.

Esto nos indica que la misma comunidad anaerobia se encuentra a diferentes profundidades del reactor y en todos los niveles internos (Anexo 2 Figura A5 b).

El análisis estadístico de los AGC de la parte interior del tezontle en todos los niveles, mostró que éstos se disponen en un solo grupo que se denota con la letra A, el cual se diferencia claramente de los otros grupos, caracterizándose por la presencia dominante de los AGC saturados, corroborando con el análisis cualitativo de que esta parte interna del tezontle se encuentra colonizada por comunidades bacterianas anaerobias (Figura 8, Tabla 9).

3.3.2 Biorreactor SBR alimentado con 2-4 dinitrofenol

3.3.2.1 Distribución espacial de las bacterias a diferentes profundidades del biorreactor

Al analizar la Tabla 9 correspondiente al análisis cualitativo de los AGC del reactor alimentado con 2-4 dinitrofenol, se observa mucha similitud de los AGC entre los niveles superior y medio externos, lo que no sucede con el nivel inferior externo, donde se aprecia un mayor número de AGC ramificados, indicadores de bacterias aerobias Gram positivas.

Tabla 9. Distribución espacial de los ácidos grasos celulares para un reactor anaerobio/aerobio alimentado con 2,4-dinitrofenol

| Ácido Graso | REACTOR ANAEROBIO/AERÓBIO (2-4 DNF) ^a | | | | | |
|-------------------------|--|---------|---------|---------|----------|---------|
| | ^b Superior | | Medio | | Inferior | |
| | ^c Externo | Interno | Externo | Interno | Externo | Interno |
| 11:0 | | | | | | |
| 2-OH 10:0 | • | | • | • | • | • |
| 12:0 | • | • | • | • | • | • |
| 13:0 | | | | | | |
| 2-OH 12:0 | | | | | | |
| 3-OH 12:0 | • | | • | | • | |
| 14:0 | • | • | • | • | • | • |
| i-15:0 | | | • | | • | |
| a-15:0 | | | | | | |
| 15:0 | | | | | | |
| 2-OH 14:0 | | | | | | |
| 3-OH 14:0 | | | | | | |
| i-16:0 | | • | | • | • | |
| 16:1 ⁹ | • | • | • | • | • | • |
| 16:0 | • | • | • | • | • | |
| i-17:0 | | | | | | |
| 17:0 ^Δ | | | | | | |
| 17:0 | | | | | | |
| 2-OH 16:0 | | | | | | |
| 18:2 ^{8,11} | | | | • | | |
| 18:1 ⁹ cis | | • | | | • | |
| 18:1 ⁹ trans | • | | • | • | | • |
| 18:0 | • | • | • | • | • | |
| 19:0 ^Δ | • | | • | | • | |
| 19:0 | | | | | | |
| 20:0 | | | | | • | |

a: 2-4 dinitrofenol b: Profundidad del reactor c: Muestra exterior e interior de la piedra

En general externamente en los tres niveles del reactor hay una predominancia de los AGC insaturados, hidroxí y ciclopropano, que son indicadores de comunidades bacterianas aerobias y anaerobias facultativas Gram negativas, seguido por los AGC saturados indicadores de comunidades anaerobias y finalmente los AGC ramificados propios de comunidades aerobias Gram positivas (Anexo 2 Figura A6 a y b y Figura A7 a)

De igual forma que al primer reactor, los AGC de este reactor fueron analizados estadísticamente con la finalidad de encontrar diferencias entre las comunidades bacterianas allí presentes.

Se encontró un grupo de características similares el cual denotamos con la letra C, dentro de este grupo existen dos sub grupos, el primero marcado con la letra C₂, que abarca a los niveles superior y medio externo, en el cual predominan los AGC insaturados, marcadores de comunidades bacterianas anaerobias facultativas Gram negativos, como la familia *Enterobacteriaceae*, Tabla 10 y Figura 12. (Boe y Gjerde, 1979).

El segundo grupo indicado con la letra C₁, que incluye al nivel inferior externo, predomina el AGC con grupo hidroxí, marcador de comunidades bacterianas aerobias Gram negativas como *Pseudomonas*, Tabla 10 y Figura 12. (Welch, 1991; Kaneda, 1991; Oyahizu y Komagata, 1983; Kawahara *et al.*, 1982).

En general la parte exterior en el reactor está colonizado por una amplia comunidad bacteriana aerobia y anaerobia facultativa Gram negativa

Tabla 10. Correlación de los AGC de muestras del reactor anaerobio/aerobio alimentado con 2-4 dinitrofenol por análisis de componentes principales

| Número Componente | porcentaje de varianza | porcentaje acumulativo |
|-------------------|------------------------|------------------------|
| 01 | 83.65695 | 83.65695 |
| 02 | 9.74111 | 93.39806 |
| 03 | 2.74041 | 96.13846 |
| 04 | 1.80752 | 97.94599 |
| 05 | 0.89748 | 98.84346 |
| 06 | 0.51461 | 99.35807 |
| 07 | 0.42254 | 99.78061 |
| 08 | 0.16172 | 99.94234 |
| 09 | 0.03707 | 99.97940 |
| 10 | 0.01583 | 99.99523 |
| 11 | 0.00277 | 99.99801 |
| 12 | 0.00124 | 99.99925 |
| 13 | 0.00053 | 99.99977 |
| 14 | 0.00017 | 99.99994 |
| 15 | 0.00003 | 99.99997 |
| 16 | 0.00002 | 99.99999 |
| 17 | 0.00001 | 100.00000 |
| 18 | 0.00000 | 100.00000 |

3.3.2.2 Distribución espacial de las bacterias dentro del empaque de tezontle

Se mencionó anteriormente que la parte externa del tezontle se encuentra colonizada por bacterias aerobias y anaerobias facultativas Gram negativas; en la Tabla 9, se observa que cualitativamente los niveles interno superior y medio presentan los mismos AGC, en cambio el nivel inferior interno presenta muy pocos AGC (Anexo 2 Figura A7 b y Figura A8 a y b).

Al sumar los AGC notaremos se observa, que hay un mayor número de AGC saturados e insaturados y muy pocos AGC ramificados e hidroxilados. Los AGC ciclopropanos no se presentan. Esto nos permitiría suponer que la comunidad bacteriana predominante en el tezontle es anaerobia y junto a ella también habita una comunidad bacteriana anaerobia facultativa.

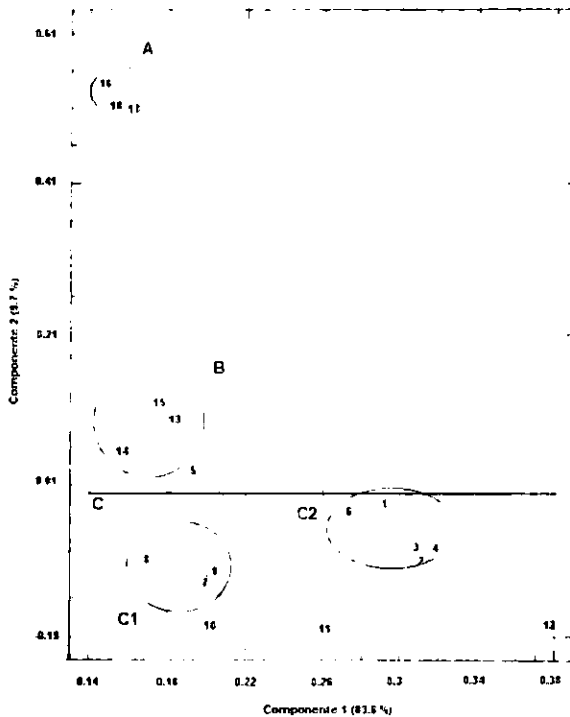


Figura 12. Análisis por componentes principales de comunidades bacterianas del reactor anaerobio/aerobio alimentado con 2,4-dinitrofenol

Analizando estadísticamente los AGC de la parte interior del tezontle se encontraron que los datos correspondientes al nivel superior interno estuvieron dentro del grupo C, pero en forma dispersa lo cual no permitió definirlo

En cambio para el grupo indicado por la letra B, que representa a la parte media, predomina un AGC saturado, lo que indica que esta comunidad es de tipo anaerobia (Figura 12, Tabla 10)

El grupo indicado por la letra A representa a la parte inferior interna donde predomina un AGC hidroxi, marcador de aerobios Gram negativos como *Pseudomonas* (Figura 12)

CONCLUSIONES

- Se implementó satisfactoriamente una técnica basada en el perfil de los ácidos grasos celulares para distinguir cualitativamente, con base en el modo respiratorio, la presencia de comunidades bacterianas aerobias, anaerobias y facultativas. Esta técnica fue aplicada para conocer el tipo de comunidades presentes en reactores anaerobio/aerobio.
- Se encontró que existen AGC que son biomarcadores de las comunidades bacterianas. Estos fueron: para comunidades anaerobias los AGC saturados C12:0, C13:0, C14:0, C15:0, C16:0, C17:0, C18:0, C19:0; para comunidades anaerobias facultativas Gram negativas los AGC C12:0, C14:0, C16:0, C16:1⁹, C18:1⁹ cis); para comunidades aerobias Gram negativas los AGC C2-OH10:0, C2-OH12:0, C3-OH12:0, C3-OH14:0, C18:1⁹ trans, C17:0¹, C19:0¹, y para comunidades aerobias Gram positivas los AGC C i-15:0, C a-15:0, C i-14:0, C i-16:0, C i-17:0, C a-17:0 y C i-18:0.
- En el reactor anaerobio/aerobio alimentado con 4-nitrofenol, con base en el perfil de los AGC, se encontró la existencia de dos comunidades bacterianas a diferente profundidad del reactor. En el nivel superior, en la parte externa del tezontle, predominan los AGC ramificados característicos de comunidades aerobias Gram positivas.

En los niveles medio e inferior de la parte externa del tezontle predominan los AGC insaturados característicos de las comunidades anaerobias facultativas Gram negativas como las Enterobacterias.

En la parte interna del tezontle en los tres niveles del reactor, predominan los AGC saturados, los cuales caracterizan a comunidades bacterianas anaerobias, como son las del género *Clostridium*, *Desulfovibrio* y *Desulfobacter*

- En el reactor anaerobio/aerobio alimentado con 2,4-dinitrofenol, con base en el perfil de los AGC, se encontró que, en la parte externa del tezontle, para los niveles superior y medio, predominan los AGC insaturados característicos de comunidades anaerobias facultativas Gram negativas como son las Enterobacterias.

En la parte interna del tezontle, el nivel superior no fue definido por encontrarse los datos en forma dispersa. En el nivel medio predominan los AGC saturados, los cuales son indicadores de comunidades anaerobias como las del género *Clostridium*, *Desulfovibrio* y *Desulfobacter*. El nivel inferior, predomina el AGC hidroxilado C2-OH10:0, el cual caracteriza a una comunidad aerobia Gram negativa como *Pseudomonas*.

RECOMENDACIONES

Aplicación de la técnica

Es necesario que la técnica sea paralelamente acompañada por técnicas o pruebas moleculares, con la finalidad de corroborar lo ya encontrado y así incrementar el nivel de confianza, para tener menos probabilidades de error al aplicarse a los biorreactores experimentales usados en el Instituto de Ingeniería de la UNAM.

Utilización de bacterias

Se recomienda que, para obtener el perfil cromatográfico de bacterias anaerobias estrictas, utilizar a las bacterias sulfato reductoras como *Desulfovibrio* o *Desulfobacter*, porque son especies que habitan comúnmente en los lodos.

Continuación del estudio

Debido a que es el primer estudio que analiza la distribución de comunidades bacterianas en un soporte de tezontle, utilizado en biorreactores experimentales, sería conveniente continuar con el estudio a fin de obtener un consorcio bacteriano clave, para ser usado en la biodegradación de los compuestos químicos tóxicos vertidos en un ambiente natural.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abo, E.; I. Sohair; El Gohary; Fatma A.; Ali Hamdy I.; A. Wahaad (1988) Treatability Studies of Textile Washwater. *Environmental Technology Letters* 9: 101-108.
- Anlinker R. (1979) Ecotoxicology of Dyestuffs-Ajoin Effort by Industry 3. pag. 59-74.
- API 20 E. (1990). Systeme d'identification des bacilles gram négatif non enterobactéries. 20 EN. Notice, Bio Mércurieux, S A.
- Atlas, R.M. (1984) Diversity of microbial communities. *Adv. Microbiol. Ecol* 7: 1-48
- Basile, F., Voorhees, K., and Hadfield (1995) Microorganism gram-type differentiation based on pyrolysis-mass spectrometry of bacterial fatty acid methyl ester extracts. *App. Environ. Microbiol.* 61: 1534-1539.
- Berent, S.L., Mahmoudi, M., Torczynski, R.M., Bragg, P.V. and Bollon, A.P. (1985). Comparision of oligonucleotide and long DNA fragments as probes in DNA and RNA dot. Southern, northern, colony and plaque hybridizations *Bio Techiques* 3: 208-220
- Bergey's, Manual of Systematic Bacteriology. (1984). Vol. I. Edit Willians and Wilkins Baltimore.
- Bishop, P.L., and Jiang, H. (1994). Aerobic biodegradation of azo dyes in biofilms. *Wat. Sci. Technol.* 29 (10-11): 525-530.
- Boe, B., and J. Gjerde. (1980) Fatty acid patterns in the classification of some representatives of the families Enterobacteriaceae and Vibrionaceae *Journal of General Microbiology.* 116: 41-49
- Bonn, J.J., Leew, J.W., Hoek, G.J., and Vasjan, J.H. (1977). Significance and taxonomic value of iso and anteiso monoenoic fatty acids and branched a-hydroxy acids in *Desulfovibrio desulfuncans*. *J. Bacteriol.* 129(3): 1183-1191.
- Bossio, D.A., K.M. Scow, N. Gunapala, and K.J. Graham. (1998). Determinants of soil microbial communities: Efeccts of agricultural management, season, and soil, type on phospholipid fatty acids profiles. *Microb. Ecol.* 36(1)

- Bossio, D.A., Scow, K.M. (1998) Impacts of carbon and flooding on soil microbial communities: Phospholipid fatty acid profiles and substrate utilization patterns *Microb. Ecol.* **35** (265).
- Brock, T.D. (ed.) (1997). *Biology of Microorganisms*. 8va ed. Ed Prentice Hall. USA. pp. 725-727.
- Buitrón, G., y Ortiz, J. (1998) Biodegradation of phenolic compounds with a sequencing batch reactor. Proc 52 th Industrial waste conference. Purdue University, Seccion 7 Chapter 27. pp. 262-269 Ann Arbor Press Chelsea Michigan, ISBN 1-57504-098-0 issn 0073-7682
- Coughlin, M.F., Kinkler, B.K., Tepper, A. and Bishop, P.L. (1997). Characterization of aerobic azo dye-degrading bacteria and their activity in biofilms (revista) Pp 215-220.
- Cruz, A., and G. Buitrón. (1999). Biotransformation of disperse Blue 79 by an anaerobic sequencing batch biofilter. In : Waste minimisation and end of pipe treatment in chemical and petrochemical industries. Mérida, Yucatán 14-18 nov. pp. 553-556
- Characklis and Wilderer. (1989). Structure and function of biofilms. Edit. John Wiley y Sons Ltd. Pp. 73-89.
- Chihib, N.E., Crepin, T., Delattre, G., Tholozan, J.L. (1999). Involvement of cell envelope in nisin resistance of *Pectinatus frisingensis*, a gram-negative, strictly anaerobic beer-spoilage bacterium naturally sensitive to nisin. *FEMS Microbiol. Lett.* **177**: 167-175.
- Evans, R.I., McClure, P.J., Gould, G.W., and Russell, N.J. (1998) The effect of growth temperature on the phospholipid and fatty acyl compositions of non-proteolytic *Clostridium botulinum* *International J. Food Microbiol.* **40** 159-167.
- Findlay, R.H., Trexler, M.B., Guckert, J.B. and White, D.C. (1990). Laboratory study of disturbance in marine sediments: response of a microbial community. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **62**. 121-133.

- Flahaut, S., Tierny, Y., Watier, D., Hornez, J.P., and Jeanfils, J. (2000). Impact of thermal variations on biochemical and physiological traits in *Pectinatus* sp. *International J. Food Microbiol.* **55**: 53-61
- Ghanem, F.M., Ridpath, A.C., Moore, W.E.C., and Moore, L.V.H. (1991). Identification of *Clostridium botulinum*, *Clostridium argentinense*, and related organisms by cellular fatty acids analysis. *J. Clin. Microbiol.* **29** (6): 1114-1124
- Gootschalk, G. (1979). Bacterial metabolism. Springer Verlag, Ed. New York. 80 pp.
- Gonzales, D. (1998). Marcadores moleculares para los estudios comparativos de la variación en ecología sistemática. *Revista Mexicana de Micología.* **14**: 1 – 21
- Ghoropade, A.J. and Spencer, H.T. (1993). Azo dyes metabolism by *Pseudomonas putida*. 48th Purdue Ind. Conf. Proc., Lewis Pub. Chelsea Mich. Pp. 699-714.
- Groff, K. A. and B. R. Kim (1989) "Textil Wastes", *Journal W. P. C. F.* **61**(6): 872-876.
- Guckert, J.B., C.P., Antworth, P.D. Nichols, and D.C. White. (1985). Phospholipid ester-linked fatty acid profiles as reproducible assays for changes in prokaryotic community structure of estuarine sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.* **31**:147-158.
- Guckert, J.B., M.A. Hood, and D.C. White. (1986). Phospholipid ester-linked fatty acid profile changes during nutrient deprivation of *Vibrio cholerae*: increase in the trans/cis ratio and proportions of cyclopropyl fatty acid. *App. Environ. Microbiol.* **52**:794-801.
- Guerrero, D.M.E. (1998) Biodegradación del colorante tipo azo marino terasil disperso utilizando un reactor anaerobio tipo UASB. Tesis para obtener el grado de Biólogo. Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F
- Haack, S.K., Garchow, H., Odelson, D., Forney, L.J., and Klug, M. (1994). Accuracy, reproducibility, and interpretation of fatty acid methyl ester profiles of model bacterial communities. *App. Environ. Microbiol.* **60**(7): 2483-2493.
- Harwood, J.L. and Russel, N.J., (1984) Lipids in Plants and Microbes, George Allen & Unwin.

- Haug, W., Notrtemann, B., Hempel, D.C., Stolz, A., and Knackmuss, H.L. (1991). Mineralization of the sulfonated azo dye Mordant Yellow 3 by a 6-aminonaphthalene-2 sulfonate-degrading bacterial consortium. *App. Environ. Microbiol.* **57**(11): 3144-3149
- Helander I.M., y Haikara A (1995). Cellular fatty acyl and alkenyl residues in *Megasphaera* and *Pectinatus* species. Contrasting profiles and detection of beer spoilage. *Microbiology*. **141**: 1131-1137.
- Ibañez, E., Borrós, S., Comellas, L., Gassiot, M. (1997). Determination of β hidroxy fatty acids in sewage sludge by using selected ion monitoring. *J. Chromatography A*. **775**: 287-293.
- Innis, M.A., and Gelfand, D.H. (1990). PCR protocols: A guide to methods and application. New York, *Academic Press, Inc* pp. 3-12
- Ingham, S.C., Hassler, J.R., Tsai, YW., and Ingham, B.H. (1998). Differentiation of lactate-fermenting, gas-producing *Clostridium spp.* Isolated from milk. *International. J. Food Microbiol.* **43**: 173-183
- Ingram, L.O. (1977). Changes in lipid composition of *Escherichia coli* resulting from growth with organic solvents and with food additives. *App. and Environmental Microbiology* **33**. 1233-1236.
- Jian, H. and Bishop, P.L. (1994). Aerobic biodegradation of azo dyes in biofilms. *Water Science and Technology*. **29**(10-11): 525-530
- Juárez, L., M. Chew y G. Buitrón. (1999). Arranque de un reactor por lotes en fase anaerobia-aerobia para la mineralización del p-nitrofenol. En : Memorias del VII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Vol. 2. Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería A.C. Huatulco, Oaxaca, México. 12-17 septiembre pp. 391.
- Kaneda, T. (1977). Fatty acids of the genus *Bacillus*: an example of branched chain preference. *Bacteriol. Rev.* **41**:391-418.
- Kaneda, T. (1991). Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria: Biosynthesis, function, and taxonomic significance. *Microbiological Reviews*. **55**(2): 288-302.

- Kirk Othmer. (1991). Encyclopedia of chemical technology. 2^a Ed. John Wiley y Son Inc. New York. Vol 1.
- Komagata, K., and Susuki K.É. (1987). Lipid and cell-wall analysis in bacterial systematics. *Method. Microbiol.* **19**: 161-207.
- Kudlich, M., Bishop, P.L., Knackmuss, H.J., and Stolz, A. (1996) Simultaneous anaerobic and aerobic degradation of the sulfonates azo dye Mordant Yellow 3 by immobilized cells from a naphthalenesulfonate degrading mixed culture. *App. Microbiol. Biothechn.* **46**: 597-603.
- Kulla, H.G. (1981). Aerobic bacterial degradation of azo dyes. Microbial degradation of xenobiotics and recalcitrant compounds. FEMS Symp No 12. De Academic Press, London. Pp. 387-399.
- Leningher, A.L. (1979). Bioquímica. 2da ed. ENUSA. Barcelona
- Lindahl, V., Frostegard, A., Bakken, L., and Baath, E. (1997). Phospholipid fatty acid composition of size fractionated indigenous soil bacteria. *Soil. Biochem.* **29**(9-10): 1565-1569.
- Los, D.A., and Murata, N. (1998). Structure and expression of fatty acid desaturases. *Biochim. Biophys. Acta.* 3-15.
- McNabb, A., Shuttleworth, R., Behme, R. And Colby, W.D. (1997). Fatty acid cahracterization of rapidly growing pathogenic aerobic actinomycetes as a means of identification. *J. Clin. Microbiol.* **35**(6): 1361-1368.
- Macarie, H. (1999). Overview on the application of anaerobic digestion to the treatment of chemical and petrochemical waswaters. Proc. of de waste minimisation and end of pipe treatment in chemical and petrochemical industries Mérida, México. 14-18 november pp 405-412.
- Melgosa, R.M., M. Chew and G. Buitrón. (1999). Star-up of a sequential anaerobic/aerobic batch reactor for the mineralization of p-nitrofenol. In Waste minimisation and end of pipe treatment in chemical and petrochemical industries Mérida, Yucatán 14-18 nov. pp. 593-596

- Meyer, U. (1981). Biodegradation of Synthetic Organic Colorants. Microbial Degradation of Xenobiotics and Recalcitrant Compounds FEMS Symp. No. 12. Ed. By T. Leisenger, R. Hutter, A. M. Cool and J. Nuesch Academic Press London, 317-385.
- Milcic-Terzic, J., Saval, S. (2000) Aplicación de técnicas de biología molecular para la detección y monitoreo de bacterias degradadoras de contaminantes orgánicos. *Ingeniería y Ciencias Ambientales Femisca*. 12 (46) 24-30.
- Moss, C. W. and Dess, S.B. (1976). Cellular fatty acids and metabolic products of pseudomonas species obtained from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 4(6), 492-502.
- Muñoz, M.; E Julián, M. Garcia-Barceló ; V. Ausina ; M. Luquin. (1997). Easy differentiation of *Mycobacterium mucogenicum* from other species of the *Mycobacterium fortuitum* complex by thin-layer and gas chromatography of fatty esters and alcohols *Journal of Chromatography B*. 689: 341-347.
- Nichols, P.D., Guckert, J.B., and White, D.C. (1986). Determination of monounsaturated fatty acid double bond position and geometry for microbial monocultures and complex consortia by capillary GC-MS of their dimethyl disulphide adducts. *J. Microbiol. Methods*. 5: 49-55.
- Olson, S., Alstrom, S., and Persson, P. (1999). Barley rhizobacterial population characterized by fatty acid profiling *App. Soil Ecol.* 12: 197-204.
- Osipov, G.A., and Turova, E. (1997). Studying species composition of microbial communities with the use of gas chromatography-mass spectrometry: microbial community of kaolin. *FEMS Microbiol. Rev* 20: 437-446.
- Parkes, R.J., and J. Taylor. 1983. The relationship between fatty acid distributions and bacterial respiratory types in contemporary marine sediments. *Estuarine Coastal Shelf Sci* 16: 173-189.
- Prakash, S.; T. Kumar; N. Atith; D. Tiwari, M. Prakash, and G. Shyam (1994). Assessment of the Effect of the Toxicity of a Textile Dye on *Nostoc muscorum* Isu, A Diazotrophic Cyanobacterium. *Environmental Pollution*. 84: 23-25.

- Rajendran, N., Matsuda, O., Imamura, N., and Urushigawa, Y. (1992) Variation in microbial biomass and community structure in sediments of eutrophic bays as determined by phospholipid ester-linked fatty acids. *App. Environ. Microbiol.* **58**(2): 562-571.
- Razo, F.E. (1997). Biotransformation and biodegradation of N-substituted aromatics in methanogenic granular sludge. Tesis para obtener el grado de doctor Landbouwniversiteit Wageningen.
- Ringelberg, D.B., Sutton, S., and White, D.C. (1997). Biomass, bioactivity and biodiversity: microbial ecology of the deep subsurface: analysis of ester-linked phospholipid fatty acids. *FEMS Microbiol. Rev.* **20**: 371-377
- Saiki, R.M., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354.
- Saiki, R.K. (1992). PCR technology: Principles and applications for DNA amplification. New York. W.H. Freeman and company. pp. 7-16.
- Schmid, C.F. (1983). Statistical graphics: Design principles and practices. A Wiley and interscience publication. USA. pp. 211.
- Seshandri, S. and R. P. Bishop. (1994) Anaerobic/Aerobic Treatment of Selected Azo Dyes in Wastewater. *Waste Management.* **14** (29): 1163-1170.
- Stainer, R. (1986). Microbiología. 4^a ed. Ed. REPLA. Barcelona.
- Spadaro, J.T., Renganathan, V. (1994). Peroxidase-catalyzed oxidation of azo dyes: Mechanism of disperse yellow 3 degradation. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* **312**(1): 301-307.
- Sundh, I., Nilsson, M., and Borga, P. (1997). Variation in microbial community structure in two boreal peatlands as determined by analysis of phospholipid fatty acid profiles. *App. Environ. Microbiol.* **63**(4): 1476-1482.
- Tepper, A., Coughlin, M., Bishop, P.L. and Kinkle, B. (1997). Aerobic azo dye degradation by *Sphingomonas* isolates in wastewater laboratory biofilms. En

- Memorias de 2nd international conference on microorganisms in activated sludge and biofilm processes. Julio 21-23. pp. 441-444.
- Tunlid, A., Hoitink, H.A.J., Low, C., and White, D.C. (1989). Characterization of bacteria that suppress *Rhizoctonia* damping-off in bark compost media by analysis of fatty acid biomarkers. *App. Environ. Microbiol.* **55**: 1368-1374.
- Tunlid, A., and White, D.C. (1990). Use of lipid biomarkers in environmental samples, p. 259-274. In A. Fox, S.L. Morgan, L. Larsson, and G. Odham (ed), *Analysis microbiology methods. Plenum Press, New York, N.Y.*
- Velásquez, M. y Colmenares, O. (1999). Análisis morfológico de dos especies de *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) utilizando la metodología de componentes principales. *Bol. Entomol. Venezolana* **14**(2): 191-200.
- Vestal, J.R., White, D.C. (1989). Lipid analysis in microbial ecology: Quantitative approaches to the study of microbial communities. *BioScience* **39**: 535-541.
- Veys, A., Callewaert, W., Waelkens, E., and Van Den Abbeele, K. (1989). Application of gas-liquid chromatography to the routine identification of nonfermenting gram-negative bacteria in clinical specimens. *App. Environ. Microbiol.* **27**(7): 1538-1542.
- White, D.C., Davis, W.M., Nickels, J.S., King, J.D., and Bobbie, R.J. (1979). Determination of the sedimentary microbial biomass by extractible lipid phosphate. *Oecologia* **40**: 51-62.
- White, D.C. (1983). Analysis of microorganisms in terms of quantity and activity in natural environments. Pages 37-66 in J.H. Slater, R. Whittenbury, and J.W.T. Wimpenny, eds. *Microbes in their Natural Environments*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Weber, J. E. and R. L. Adams (1995). Chemical and Sediment Mediated Reduction of Azo Dye Disperse Blue 79. *Environmental Science Technology*. **29**: 1163-1170.
- Werker, A.G., and Hall, E.R. (1998). Using microbial fatty acids to quantify, characterize and compare biofilm and suspended microbial populations in

- wastewater treatments systems. 19th Biental Conference of IAWQ, Vancouver, Canadá.
- Werman, S.D., M.S. Springer and R.J. Britten (1990). Nucleic acids I: DNA-DNA hybridization. In: D.D. Hillis and C. Moritz (eds), *Molecular Systematics*. Sinauer, Sunderland, pp 204-249.
- Wuhrmann, K., Mechsner, K., and Kappeler, T. (1980). Investigation on rate-determining factors in the microbial reduction of azo dyes. *Eur. J. App. Microbiol Biotechnol.* **9**: 325-338
- Wilderer, P.A., Characklis, W.G (1989) Structure and functions of biofilms. structure y funtion of biofilms. eds characklis and Wilderer, J. Wiley and Soons, Bernhard Dahlem Konferenzen. Pp. 5-17.
- Wilderer, P.A (1991) Sequencing Batch Reactor Technology for biological treatment of industrial wastewaters. New developments in industrial wastewater treatment. Eds Turkman, A., and Uslu, O. Pp. 111-125.
- Welch, D. 1991. Applications of cellular fatty acid analysis. *Clinical Microbiology Reviews.* **4**:422-438.
- Yamamoto, K., Murakami, R., and Takamura, Y. (1998). Isoprenoide quinone, cellular fatty acid composition and diaminopimelic acid isomers of newly classified thermophilic anaerobic gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **161**:351-358.
- Yanagibayashi, M., Nogi, Y., Li, L., and Kato, Ch. (1999). Changes in the microbial community in Japan trench sediment from a depth of 6292 m during cultivation without decompression. *FEMS Microbiol. Lett.* **170**: 271-279.
- Yañez, I. (1992). Análisis por cromatografía gas-líquido de los ácidos grasos celulares totales de *Enterobacter agglomerans*. Tesis
- Zelles, L., Palojarvi, A., Kandeler, E., Von Lutzow, M., Winter, K., and Bai, Q.Y (1997). Changes in soil microbial properties and phospholipid fatty acid fractions after chloroform fumigation. *Soil Bio. Biochem.* **29** (9-10): 1325-1336

ANEXO 1

Datos normalizados en porcentajes de los ácidos grasos celulares obtenidos de dos reactores anaerobio/aerobio

Tabla A1. Porcentajes normalizados de los AGC del reactor anaerobio/aerobio alimentado con 2,4-dinitrofenol, usados para el análisis por componentes principales.

| Ácido graso | TR (min) | % Ácidos grasos celulares de la parte externa del tezontle y por niveles | | | | | | | | |
|----------------------|----------|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | DNSE1 | DNSE2 | DNSE3 | DNME1 | DNME2 | DNME3 | DNIE1 | DNIE2 | DNIE3 |
| 2-OH 10:0 | 13 63 | 1 66 | 2 06 | 2 10 | 1 86 | 5 08 | 2 84 | 5 67 | 7 93 | 6 84 |
| 12:0 | 16 25 | 60 93 | 66 58 | 64 63 | 67 03 | 40 26 | 57 40 | 44 89 | 37 03 | 45 25 |
| 2-OH 12:0 | 19 56 | | | | | | | | | |
| 3-OH 12:0 | 20 29 | 1 49 | 1 66 | 1 37 | 1 98 | 0 87 | 1 39 | 0 96 | 1 20 | 1 12 |
| 14:0 | 22 09 | 0 82 | 1 07 | 1 04 | 0 87 | 1 05 | 1 24 | 1 17 | 1 83 | 1 47 |
| i-15:0 | 23 94 | | | | 0 84 | 13 29 | 1 31 | 14 82 | 1 40 | 2 57 |
| a-15:0 | 24 18 | | | | | | | | | |
| i-16:0 | 26 71 | | | | | | | 4 20 | 5 64 | 4 80 |
| 16:1 ^s | 27 11 | 2 12 | 5 33 | 4 70 | 6 11 | 3 77 | 6 26 | 0 77 | 1 36 | 1 11 |
| 16:0 | 27 67 | 8 52 | 9 33 | 7 56 | 7 63 | 7 09 | 8 36 | 7 91 | 12 68 | 10 61 |
| i-17:0 | 29 37 | | | | | | | | | |
| 17:0 | 30 56 | | | | | | | | | |
| 18:2 ^{s,12} | 31 67 | | | | | | | | | |
| 18:1 ^s c | 32 38 | | | | | | | 11 80 | 18 93 | 15 92 |
| 18:1 ^s t | 32 63 | 18 60 | 9 80 | 11 19 | 10 39 | 16 95 | 15 69 | | | |
| 18:0 | 33 46 | 4 06 | 2 31 | 6 58 | 2 18 | 10 58 | 4 26 | 2 04 | 3 63 | 3 16 |
| 19:0 ^t | 36 62 | 1 80 | 1 87 | 0 82 | 1 09 | 1 07 | 1 24 | 1 19 | 2 06 | 1 61 |
| 20:0 | 41 82 | | | | | | | 4 58 | 6 31 | 5 54 |

| Ácido graso | TR (min) | % Ácidos grasos celulares de la parte interna del tezontle y por niveles | | | | | | | | |
|----------------------|----------|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | DNSI1 | DNSI2 | DNSI3 | DNMI1 | DNMI2 | DNMI3 | DNII1 | DNII2 | DNII3 |
| 2-OH 10:0 | 13 63 | | | | 16 41 | 13 65 | 17 34 | 37 48 | 33 42 | 34 17 |
| 12:0 | 16 25 | 40 93 | 55 40 | 80 77 | 36 47 | 32 72 | 35 80 | 27 46 | 30 06 | 29 74 |
| 2-OH 12:0 | 19 56 | | | | | | | | | |
| 3-OH 12:0 | 20 29 | | | | | | | | | |
| 14:0 | 22 09 | 6 71 | 5 86 | 8 18 | 8 99 | 7 18 | 9 11 | 10 20 | 10 45 | 10 43 |
| i-15:0 | 23 94 | | | | | | | | | |
| a-15:0 | 24 18 | | | | | | | | | |
| i-16:0 | 26 71 | 3 16 | 2 33 | 0 38 | 1 45 | 1 71 | 1 46 | | | |
| 16:1 ^s | 27 11 | 3 83 | 3 10 | 5 31 | 1 66 | 1 47 | 1 95 | 1 25 | 1 28 | 1 32 |
| 16:0 | 27 67 | 12 75 | 13 95 | 2 14 | 14 37 | 11 77 | 13 40 | | | |
| i-17:0 | 29 37 | | | | | | | | | |
| 17:0 | 30 56 | | | | | | | | | |
| 18:2 ^{s,12} | 31 67 | | | | 1 28 | 16 97 | 1 86 | | | |
| 18:1 ^s c | 32 38 | 8 03 | 6 01 | 0 96 | | | | | | |
| 18:1 ^s t | 32 63 | | | | 5 98 | 2 74 | 5 75 | 23 60 | 24 79 | 24 34 |
| 18:0 | 33 46 | 24 94 | 13 35 | 2 26 | 13 38 | 11 79 | 13 34 | | | |
| 19:0 ^t | 36 62 | | | | | | | | | |
| 20:0 | 41 82 | | | | | | | | | |

Tabla A1. Porcentajes normalizados de los AGC del reactor anaerobio/aerobio alimentado con 4-nitrofenol, usados para el análisis por componentes principales.

| Ácido graso | TR (min) | % Ácidos grasos celulares de la parte externa del tezontle y por niveles | | | | | | | | | |
|-----------------------|----------|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | 4NSE1 | 4NSE2 | 4NSE3 | 4NME1 | 4NME2 | 4NME3 | 4NIE1 | 4NIE2 | 4NIE3 | 4NIE4 |
| 2-OH 10:0 | 13.63 | | | | | | | | | | |
| 12:0 | 16.25 | 44.84 | 56.59 | 51.67 | 79.83 | 30.37 | 31.49 | 25.12 | 24.68 | 21.57 | 23.54 |
| 2-OH 12:0 | 19.56 | 3.45 | 2.93 | 3.18 | | | | | | | |
| 3-OH 12:0 | 20.29 | 1.97 | 2.04 | 1.80 | 1.75 | 2.00 | 1.89 | 2.03 | 1.48 | 1.36 | 1.62 |
| 14:0 | 22.09 | 0.75 | 0.99 | 0.75 | 1.10 | 1.00 | 1.27 | 1.89 | 1.58 | 1.36 | 1.44 |
| i-15:0 | 23.94 | 2.08 | 1.75 | 2.07 | 3.40 | 3.45 | 2.88 | 3.78 | 3.64 | 3.93 | 4.01 |
| a-15:0 | 24.18 | 1.42 | 0.85 | 1.14 | 2.69 | 2.80 | 2.46 | 4.60 | 4.78 | 4.73 | 4.90 |
| i-16:0 | 26.71 | 1.53 | 1.32 | 1.60 | 2.65 | 2.65 | 2.42 | 4.78 | 4.75 | 5.02 | 4.90 |
| 16:1 ⁹ | 27.11 | 11.01 | 6.57 | 9.47 | 14.61 | 13.61 | 13.52 | 12.54 | 13.30 | 13.33 | 13.93 |
| 16:0 | 27.67 | 5.94 | 8.15 | 8.49 | 18.25 | 16.89 | 16.60 | 18.52 | 19.00 | 18.83 | 19.38 |
| i-17:0 | 29.37 | 2.55 | 0.74 | 1.10 | | | | | | | |
| 17:0 | 30.56 | | | | 1.70 | 3.51 | 5.16 | | | | |
| 18:2 ^{11,12} | 31.67 | | | | | | | | | | |
| 18:1 ⁹ c | 32.38 | 19.60 | 15.73 | 15.67 | | | | | | | |
| 18:1 ⁹ t | 32.63 | | | | 21.16 | 20.59 | 19.60 | 26.74 | 26.79 | 29.88 | 26.28 |
| 18:0 | 33.46 | 3.47 | 2.34 | 1.25 | 3.75 | 3.12 | 2.72 | | | | |
| 19:0 ⁷ | 36.62 | | | | | | | | | | |
| 20:0 | 41.82 | | | | | | | | | | |

| Ácido graso | TR (min) | % Ácidos grasos celulares de la parte interna del tezontle y por niveles | | | | | | | | | |
|-----------------------|----------|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | 4NSI1 | 4NSI2 | 4NSI3 | 4NMI1 | 4NMI2 | 4NMI3 | 4NMI1 | 4NMI2 | 4NMI3 | 4NMI4 |
| 2-OH 10:0 | 13.63 | | | | | | | | | | |
| 12:0 | 16.25 | 79.83 | 65.75 | 68.82 | 68.09 | 76.70 | 74.00 | 73.53 | 72.32 | 74.39 | 69.47 |
| 2-OH 12:0 | 19.56 | | | | | | | | | | |
| 3-OH 12:0 | 20.29 | | | | | | | | | | |
| 14:0 | 22.09 | | | | | | | | | | |
| i-15:0 | 23.94 | | | | | | | | | | |
| a-15:0 | 24.18 | | | | | | | | | | |
| i-16:0 | 26.71 | | | | | | | | | | |
| 16:1 ⁹ | 27.11 | | | | | | | | | | |
| 16:0 | 27.67 | 8.08 | 12.31 | 12.38 | 8.04 | 9.44 | 8.14 | 7.86 | 8.04 | 7.53 | 8.04 |
| i-17:0 | 29.37 | | | | | | | | | | |
| 17:0 | 30.56 | 8.64 | 16.72 | 15.64 | 23.87 | 13.85 | 17.86 | 18.61 | 19.15 | 18.08 | 22.47 |
| 18:2 ^{11,12} | 31.67 | | | | | | | | | | |
| 18:1 ⁹ c | 32.38 | | | | | | | | | | |
| 18:1 ⁹ t | 32.63 | | | | | | | | | | |
| 18:0 | 33.46 | 3.48 | 5.22 | 5.36 | | | | | | | |
| 19:0 | 36.62 | | | | | | | | | | |
| 20:0 | 41.82 | | | | | | | | | | |

ANEXO 2

Ácidos grasos celulares identificados en cada cromatograma de las muestras analizadas



Figura A1. Identificación de los ácidos grasos del estándar comercial, ambos cromatogramas muestran a los mismos ácidos, bajo una ligera variante en el tiempo de retención (TR) para el segundo cromatograma producto de la reparación del cromatógrafo.

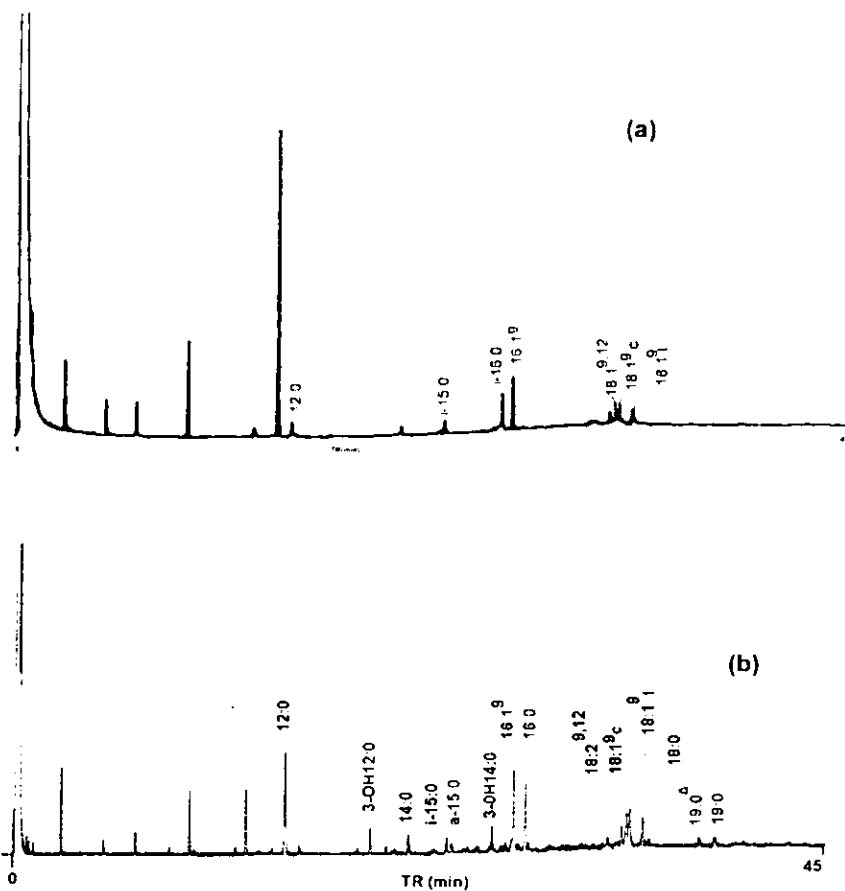


Figura A2. Ácidos grasos celulares de todos aerobios provenientes de plantas de tratamiento de la UNAM (a) y de Cerro de la Estrella (b) en México D.F.

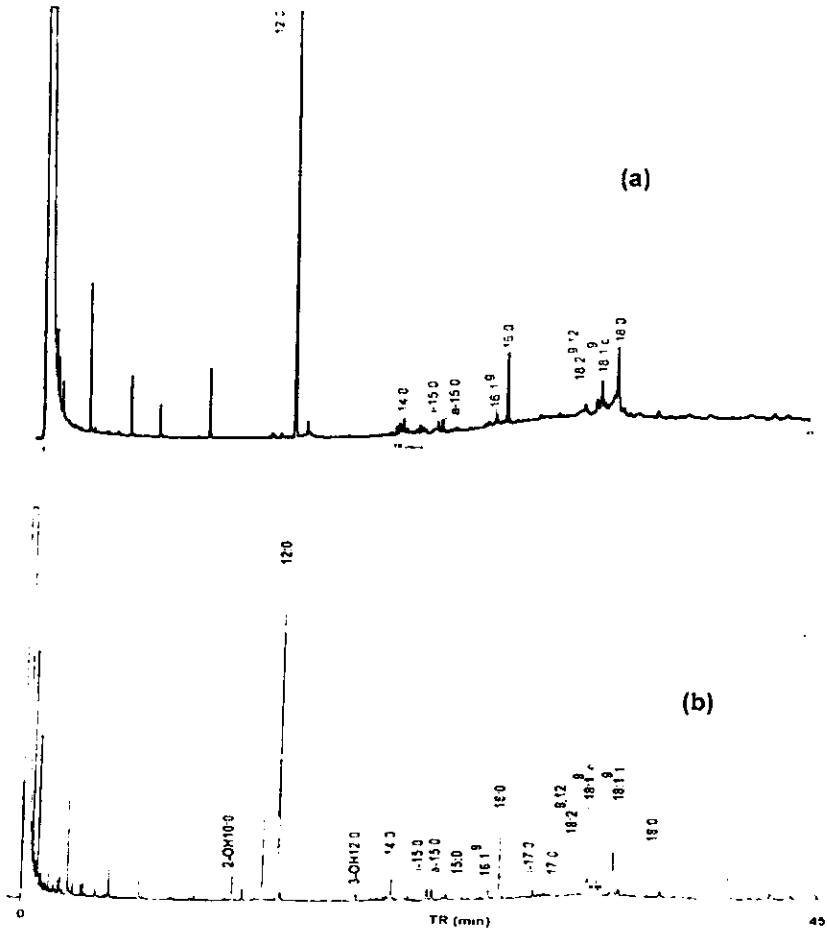


Figura A3. Ácidos grasos celulares de un lodo anaerobio (a) y de un reactor anaerobio (b).

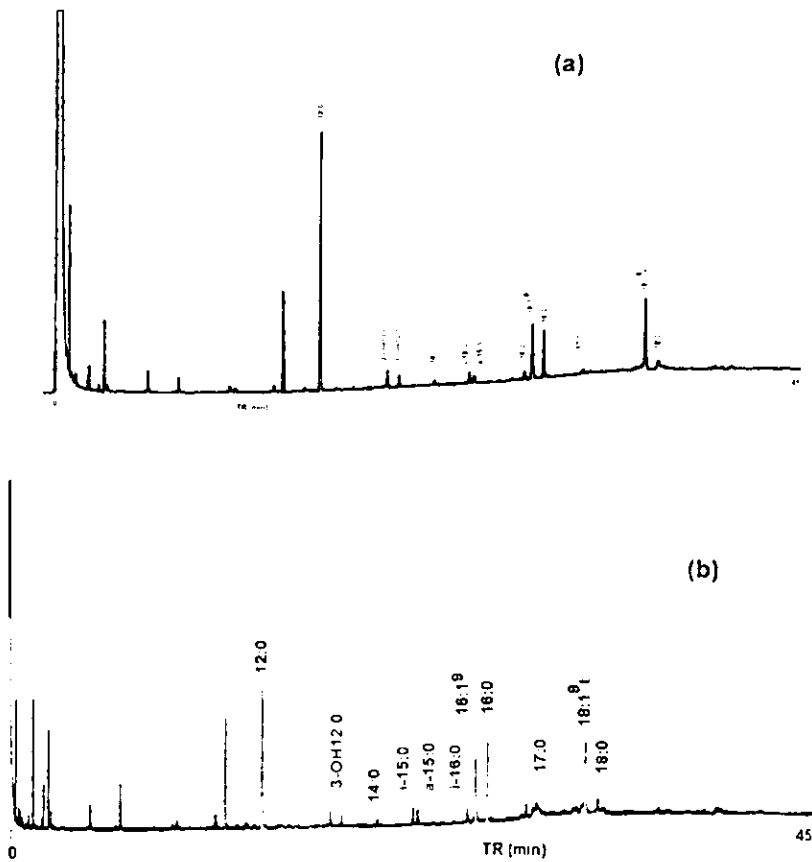


Figura A4. Ácidos grasos celulares de la parte externa del tezontle, nivel superior (a) y nivel medio (b) del reactor alimentado con 4-nitrofenol.

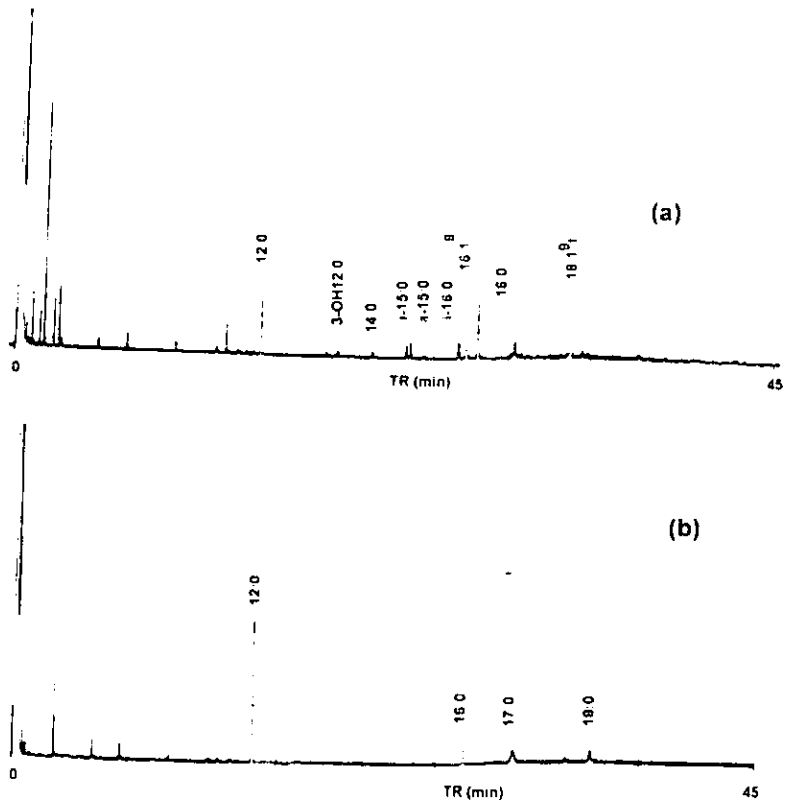


Figura A5. Ácidos grasos celulares de la parte externa del tezontle nivel inferior(a) y de la parte interna del tezontle (b), del reactor alimentado con 4-nitrofenol.

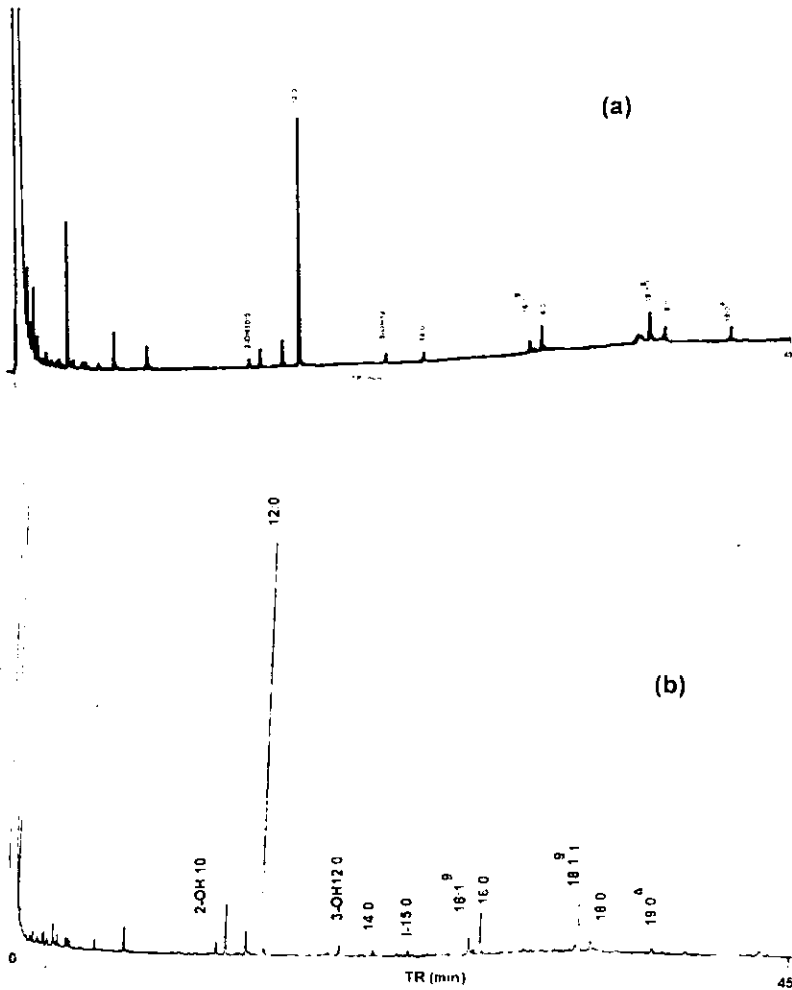


Figura A6. Ácidos grasos celulares de la parte externa del tezontle, nivel superior (a) y medio (b) del reactor alimentado con 2,4-dinitrofenol.

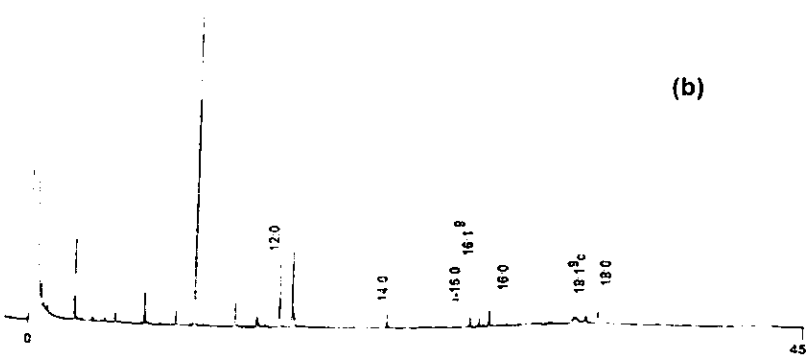
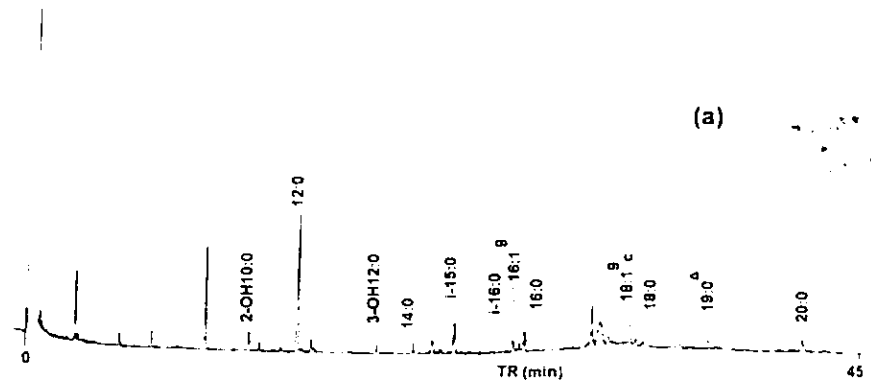


Figura A7. Ácidos grasos celulares de la parte externa del tezontle, nivel inferior (a) y de la parte interna, nivel superior (b) del reactor alimentado con 2,4-dinitrofenol.

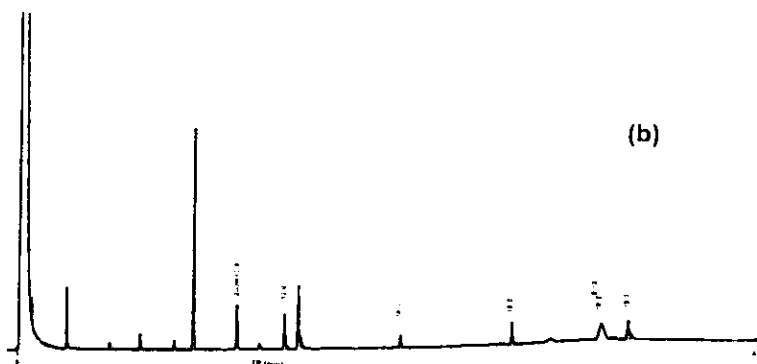
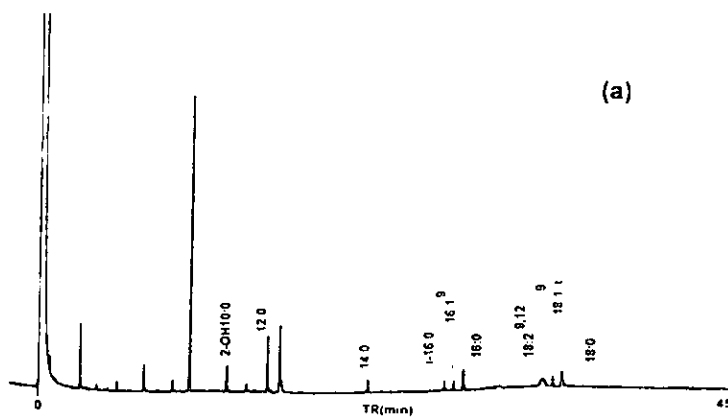


Figura A8. Ácidos grasos celulares de la parte interna del tezontle, nivel medio (a) y nivel inferior (b) del reactor alimentado con 2,4-dinitrofenol.