



00524  
98

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

---

**FACULTAD DE QUIMICA**

**INFLUENCIA DE CANTIDAD DE MUESTRA TRATADA Y  
DEL AYUNO EN LA DETERMINACION DEL PERFIL  
CROMATOGRAFICO DE ACIDOS GRASOS CELULARES**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A :  
RAFAEL JHONATAN MACHADO FERNANDEZ**

**MEXICO, D. F.**



**2003**

1



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

**Jurado asignado:**

Presidente	Prof. Aida Navas Pérez
Vocal	Prof. Eduardo Bonilla Espinosa
Secretario	Prof. Germán Buitrón Méndez
1er. Suplente	Prof. Norma Trejo Medina
2º suplente	Prof. Evangelina Camacho Frías

Sitio donde se desarrolló el tema: Coordinación de Bioprocesos Ambientales  
Edificio 5, Instituto de Ingeniería, UNAM.




---

Asesor del tema: Germán Buitrón Méndez



---

Supervisor Técnico: Maribel Quezada Cruz



---

Sustentante: Rafael Jhonatan Machado Fernández

## Contenido

	Página
<b>Índice de tablas</b>	I
<b>Índice de figuras</b>	I
<b>Abreviaturas</b>	III
<b>Resumen</b>	IV
<b>Capítulo 1. Introducción</b>	1
1.1 Objetivo	3
1.2 Objetivos particulares	
1.3 Contribución	3
<b>Capítulo 2. Antecedentes</b>	
2.1 Lípidos	4
2.1.1 Lípidos en la célula bacteriana	4
2.1.2 Ácidos grasos en la célula bacteriana	6
2.2 Nomenclatura de los ácidos grasos celulares	7
2.3 Separación y análisis de lípidos	7
2.3.1 Cromatografía de gases	8
2.4 Importancia de los microorganismos en aguas residuales	10
2.5 Características de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12
2.5 Estado del arte	
2.6.1 Ácidos grasos celulares en la identificación de microorganismos	13
2.6.2 Ácidos grasos determinados durante el ayuno	14
<b>Capítulo 3. Metodología</b>	
3.1 Preparación de cepa <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15
3.2 Influencia de la cantidad de muestra a tratar	15
3.3 Crecimiento de la cepa bacteriana para el ayuno	16

3.4 Tratamiento de las muestras	17
3.5 Calibración de la técnica	19
3.6 Determinaciones analíticas	
3.6.1 Carbono Orgánico Total (COT)	19
3.6.2 Turbiedad	20
3.6.3 Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV)	20
3.6.4 Cuenta heterótrofa en placa (CHP)	20
3.6.5 Prueba de identificación por medio del sistema API 20-E	21
3.7 Análisis Estadístico	
3.7.1 Tiempos de retención	21
3.7.2 Porcentajes de áreas	22
3.7.3 Concentración de ácidos grasos celulares	22
<b>Capítulo 4. Resultados y discusión</b>	
4.1 Preparación de la cepa <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23
4.1.1 Cinéticas iniciales de crecimiento de <i>P. aeruginosa</i>	23
4.2 Calibración de la técnica	26
4.3 Influencia de la cantidad de la muestra en el perfil cromatográfico de ácidos grasos celulares	27
4.4 Influencia del ayuno en el perfil cromatográfico de ácidos grasos celulares	
4.5.1 Cinéticas de consumo	33
4.5.2 Análisis cromatográfico de los ácidos grasos celulares	37
<b>Conclusiones</b>	40
<b>Bibliografía</b>	41
<b>Anexos</b>	45

## Índice de tablas

	Página
1. Caracterización primaria de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12
2. Comparación de ácidos grasos (ausencia-presencia) encontrados en el presente trabajo y por otros autores	28
3. Velocidad de consumo, actividad y viabilidad de <i>P. aeruginosa</i> en abundancia de sustrato y en estado de ayuno	35
1A. Datos de cinética de crecimiento de <i>P. aeruginosa</i>	47
2A. Datos de cinética de crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> con alimentación periódica	47
3A. Datos de cinética de crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> , relación entre SSV y turbiedad	47
4A. Tiempos de retención para la mezcla de ácidos grasos del estándar comercial	48
5A. Tiempos de retención, áreas bajo la curva y concentración para las diferentes cantidades de muestra	49
6A. Datos de la cinética inicial de consumo de sustrato	50
7A Datos de la cinéticas de consumo de sustrato después del ayuno	51
8A. Tiempos de retención, áreas bajo la curva, concentración para las diferentes tiempos de ayuno.	52

## Índice de figuras

	Página
1. Estructura de fosfolípido	5
2. Estructura de la membrana celular	6
3. Esquema gráfico de aeración para la cepa	16
4. Cinética de crecimiento de <i>P. aeruginosa</i>	23
5. Cinética de crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> , alimentada durante 7 días	24
6. Relación entre turbiedad y SSV	25
7. Perfil cromatográfico del estándar comercial obtenido con el equipo utilizado para la experimentación	26

8. Perfil cromatográfico de AGC para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , con una muestra de 20 mg	27
9. Gráfica de barras de concentración de AGC de <i>P. aeruginosa</i> para los diferentes ácidos encontrados	31
10. Concentración de AGC de <i>P. aeruginosa</i> con 10, 20, 30, 40 y 50 mg de muestra	32
11. Cinética 1 de consumo para fuente de carbono	33
12. Cinética de consumo de sustrato para <i>P. aeruginosa</i> a diferentes tiempos de ayuno	34
13. Cuenta heterótrofa en placa de las cinéticas de consumo en ayuno	35
14. Gráfica de actividad específica en el ayuno	36
15. Perfil cromatográfico de <i>P. aeruginosa</i> , muestra después de 24 h de ayuno	37
16. Comportamiento de los AGC de <i>P. aeruginosa</i> en el ayuno	38
17. Perfiles cromatográficos de AGC para <i>P. aeruginosa</i> a diferentes cantidades de muestra: a) muestra de 10mg, b) muestra de 30mg c) muestra de 40mg y d) muestra de 50mg	54
18. Perfiles cromatográficos de AGC para <i>P. aeruginosa</i> a diferentes tiempos de ayuno: a) muestra de 0h de ayuno, b) muestra de 36h y c) muestra de 48mg	56

## Abreviaturas

AGC  
COT  
CHP  
DNA  
NTU  
PCR  
RNA  
rpm  
SSI  
SST  
SSV  
UFC  
UV  
φ

Ácidos grasos celulares  
Carbono orgánico total  
Cuenta heterótrofa en placa  
Ácido desoxirribonucleico  
Unidades de turbiedad nefelométricas  
Reacción en cadena de la polimerasa  
Ácido ribonucleico  
Revoluciones por minuto  
Solución salina isotónica  
Sólidos suspendidos totales  
Sólidos suspendidos volátiles  
Unidades formadoras de colonias  
Ultravioleta  
Diámetro



## **Resumen**

Una de las técnicas que se puede utilizar para la identificación de microorganismos, es la determinación del perfil de ácidos grasos celulares (AGC). Sin embargo, con dicha técnica se puede perder información, debido a la falta de un tratamiento de muestra adecuada y algunos factores que influyen en la información, como en el ayuno. En este trabajo se estudió la influencia que tiene la cantidad de muestra tratada y el ayuno sobre el perfil de AGC, con la finalidad de observar como se puede afectar en los resultados para la identificación de grupos de bacterias, en especial las que se encuentran en el tratamiento de aguas residuales.

Para determinar cual es la cantidad adecuada de muestra utilizada, se trataron diferentes muestras de la cinética realizada (10, 20, 30, 40 y 50 mg), se calculó la concentración de los ácidos grasos encontrados en la muestra mediante las áreas encontradas. La muestra de 20 mg mostró, en comparación de las demás, una mayor área en los AGC de *P. aeruginosa*, siendo esta la cantidad adecuada para la técnica utilizada. Además tratar muestras con 40 y 50 mg puede llevar a una identificación errónea de los AGC ya que hay tiempos de retención recorridos y técnicamente es difícil tratar las muestras.

Para determinar la influencia del ayuno sobre el perfil de AGC, la cepa fue sometida a 0, 24, 36 y 48h de ayuno, después de estos tiempos, se siguieron realizaron cinéticas de consumo para ver cual era el efecto en la actividad y en el perfil de ácidos grasos. Se encontró que la muestra con 48 h de ayuno fue la que sufrió un mayor efecto negativo en la actividad y en viabilidad. Para el perfil cromatográfico de AGC, desde la muestra de 24h se presentaron cambios en el perfil, disminuyendo la cantidad de ácidos grasos insaturados y aumentando en los ácidos ciclopropanos, en especial el 17:0cy, además hubo una aparición de ácidos ramificados (i15:0 y a15:0). El efecto del ayuno es un factor a considerar muy importante para la identificación de microorganismos por medio del perfil de AGC, ya que éste puede cambiar drásticamente, y llevar a resultados erróneos.

# PAGINACIÓN DISCONTINUA

## **1. INTRODUCCIÓN**

Los sistemas de tratamiento biológico de aguas residuales están constituidos por comunidades de microorganismos que degradan los contaminantes. Muchos investigadores se dedican al estudio de dichas comunidades, sin embargo, se han enfrentado con algunos problemas en la identificación de grupos de bacterias, así como en el estado en el que se encuentran. Es decir, su estado nutricional, su actividad y su viabilidad.

Algunas técnicas que se utilizan para identificar microorganismos y para determinar actividad y viabilidad, se realizan con cepas puras. Es decir, es necesario un previo cultivo y aislamiento. Sin embargo, como ya se mencionó anteriormente los sistemas biológicos de tratamiento funcionan con comunidades de microorganismos y no con cepas puras.

En algunos trabajos en los que se han identificado las comunidades presentes en los diferentes sistemas de tratamiento como lodos activados y sistemas con biomasa fija (Quezada, 2000) se han aislado y cultivado los microorganismos para poder identificarlos. Sin embargo, dichas técnicas únicamente revelan la presencia de los microorganismos que pueden ser cultivados (Vestal y White, 1989) y se ha reportado que del 0.01 al 12 % de los microorganismos presentes en una muestra ambiental pueden ser cultivados en el laboratorio (Olsen y Bakken, 1987). Esto refleja un problema ya que se atribuyen las actividades degradativas únicamente a los microorganismos cultivables e identificados por la metodología clásica.

Las nuevas técnicas para la identificación de microorganismos, han tenido que superar los aspectos antes mencionados. El conocimiento del código genético (pequeñas secuencias de RNA o DNA) ofrece criterios para la identificación de microorganismos (Reiman, 1998). Por lo anterior existen técnicas que involucran el uso de PCR, utilizado para amplificar secuencias determinadas de material genético, más específicamente los genes de la porción de la subunidad 16S rRNA. Éstos llevan al planteamiento de un diseño específico del *primer* para realizar la

amplificación. Sin embargo, no puede ser usado el mismo *primer* para las unidades génicas en los diferentes microorganismos (Widmer *et al.*, 1998). Cabe la aclaración de que la técnica de PCR presenta un costo muy elevado en la investigación.

Los microorganismos también pueden ser identificados por medio de su clasificación quimiotaconómica. Mediante el análisis en las células, los lípidos pueden ser extraídos instantáneamente, además de realizar un análisis cualitativo y cuantitativo de los ácidos grasos celulares (AGC), pues se asume que, los AGC se encuentran en una proporción relativamente constante y su variación entre los diversos grupos taxonómicos, les permite emplearse como un biomarcador en su identificación (Vestal y White, 1989). Con este análisis se puede estimar la biomasa microbiana, diversidad taxonómica, estado nutricional y actividad de los microorganismos.

Empero, la cantidad de muestra para obtener el perfil cromatográfico de AGC no se encuentra establecido de una forma estandarizada. Es decir, algunos investigadores han utilizado diferentes cantidades, la cual no permite visualizar adecuadamente el perfil cromatográfico de AGC.

Además, existen algunos factores que influyen en el perfil de AGC, como el ayuno. Este factor es importante en el tratamiento de aguas residuales, ya que disminuye la actividad y viabilidad de los microorganismos, con ello la degradación. Siendo un factor que no se puede controlar, y esto no permitiría visualizar de forma adecuada el perfil de AGC

## **1.2 OBJETIVO GENERAL**

Estudiar y utilizar la técnica de determinación del perfil cromatográfico de ácidos grasos celulares y evaluar algunos de los efectos ambientales que se presentan en el procesamiento de muestras.

## **1.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

Determinar la influencia que tiene la cantidad de muestra tratada en el perfil cromatográfico de ácidos grasos celulares.

Analizar y especificar el efecto producido por el ayuno en el perfil cromatográfico de ácidos grasos celulares de *Pseudomonas aeruginosa*.

## **1.3 CONTRIBUCIÓN**

Facilitar la determinación de los perfiles cromatográficos para identificar tipos de microorganismos que participan en la degradación de compuestos durante el tratamiento de aguas residuales.

## **2. Antecedentes**

### **2.1 Lípidos**

Los lípidos comprenden muchas clases de compuestos que contienen una gran variedad de grupos funcionales. Sin embargo, los lípidos se clasifican según su solubilidad: los lípidos son sustancias que se pueden extraer de células y tejidos mediante solventes orgánicos o no polares. (Wade, 1993).

Los lípidos complejos son aquellos que se hidrolizan con facilidad para formar constituyentes más simples. La mayor parte de los lípidos complejos son ésteres de ácidos carboxílicos de cadena larga, los llamados ácidos grasos. Los dos grupos principales de ésteres de ácidos grasos son las ceras y los glicéridos. Las ceras son ésteres de alcoholes de cadena larga, y los glicéridos son ésteres de glicerol (Wade, 1993).

Los lípidos simples son aquellos que no se hidrolizan con facilidad mediante un ácido o una base acuosa. Con frecuencia, este nombre parece inadecuado, porque muchos de los lípidos simples son moléculas bastante complejas, como los esteroides, prostaglandinas y terpenos (Wade, 1993).

#### **2.1.1 Lípidos en la célula bacteriana**

Los lípidos complejos, como los glicerofosfolípidos, son lípidos simples que contienen adicionalmente elementos como fósforo, nitrógeno o azufre, o compuestos como azúcar, etanolamina, serina o colina en el C-3 (Figura 1). Los lípidos son compuestos que se presentan en todos los microorganismos y son más abundantes en las membranas de las bacterias.

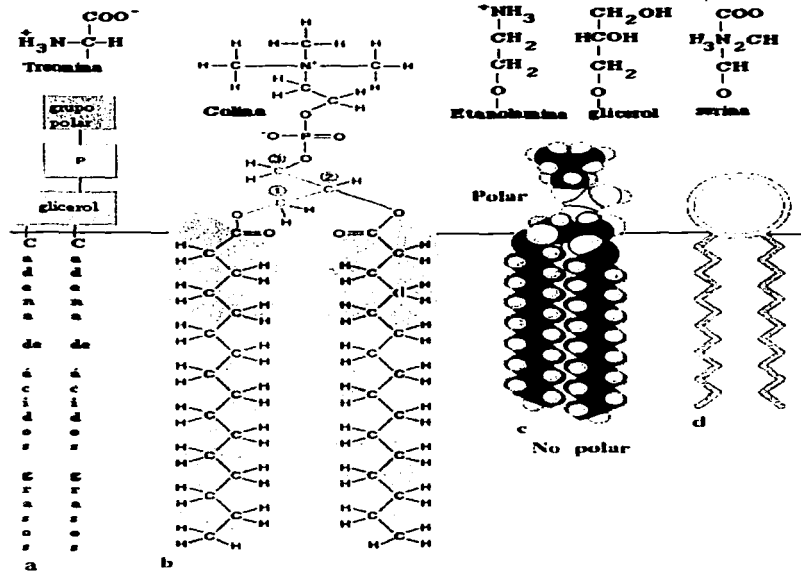


Figura 1. Estructura de fosfolípido. a) Representación esquemática funcional, b) Fórmula estructural desarrollada, c) Modelo espacial lleno, d) estructura simplificada. Modificada de ntri.tamuk.edu/cell/lipid.html del Natural Toxins Research Center at Texas A&M University - Kingsville.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 2.1.2 Ácidos grasos en la célula bacteriana

Los principales lípidos que forman las membranas son los fosfolípidos, los cuales tienen una región polar y una no polar. La región hidrofílica (polar) es el grupo fosfato y el glicerol mientras que la región hidrofóbica (no polar) es la representada por los ácidos grasos. Con lo que en la membrana celular forman un bicapa como se ve en la figura 2.

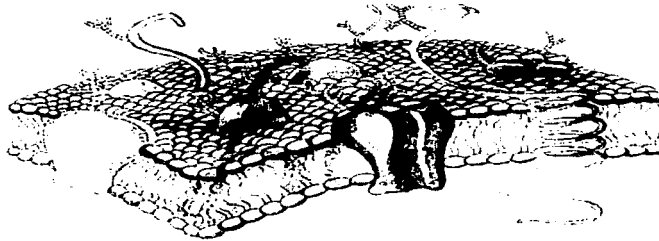


Figura 2. Estructura de membrana celular.

El contenido de ácidos grasos de la mayoría de las especies de bacterias se encuentran distribuidos en la pared celular, membrana celular e inclusiones citoplasmáticas, se sintetizan por separado y luego son esterificados para formar lípidos más complejos. Se han encontrado muchas clases de ácidos grasos en las bacterias: pueden contener un número diferente de átomos de carbono, tener cadena lineal o cadena ramificada, tener o no dobles enlaces, contener o no grupos OH, contener o no anillos de ciclopropano. Además pueden ser saturados o no saturados y el precursor de dichos ácidos grasos es la acetil coenzima A (Lehninger *et al.*, 1995).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## **2.2 Nomenclatura de los ácidos grasos celulares**

Los ácidos grasos (AG) son designados por el número de átomos de carbono, el grado de insaturación se indica por un número separado por dos puntos. El grado de insaturación es seguido por  $\Delta x$ , donde x indica la posición del doble enlace más cercano al carboxilo final ( $\Delta$ ), o en pocos casos el más cerca del alifático final ( $\omega$ ). Los prefijos a, i, cy y d se refieren ácidos grasos con ramificaciones anteiso, iso, cyclopropil y dicarboxílicos respectivamente. Las letras br indica que el tipo de ramificación es desconocida, mientras que un número seguido de ME indica la posición de un grupo metilo. Los prefijos a y p indican que el grupo OH se localiza en la posición 2 y 3 respectivamente. Una letra c indica un ácido graso en forma cis y una t indica una forma trans (Welch, 1991; Zelles, 1999).

## **2.3 Separación y análisis de lípidos**

En la investigación del papel de los lípidos en un proceso biológico es a menudo útil saber que lípidos se hallan presentes y en qué proporción. Debido a que los lípidos son insolubles en agua, su extracción de los tejidos y su posterior fraccionamiento requieren la utilización de solventes orgánicos y algunas técnicas usadas para la purificación de moléculas hidrosolubles como las proteínas y los glúcidos. Los lípidos que contienen ácidos grasos en enlace éster o amida se pueden hidrolizar (saponificar) tratándolos con un ácido o un álcali para analizar sus componentes. (Lehninger *et. al.*, 1995).

Cuando se tiene un tejido homogeneizado, se trata de extraer con un solvente no polar (orgánico) y uno polar (agua), en el solvente orgánico quedan extraídos los lípidos y las moléculas más polares quedan situadas en la fase polar.

Los lípidos pueden ser analizados cualitativa y cuantitativamente, mediante una técnica cromatográfica, siempre y cuando estos tengan una naturaleza volátil que permitan ser analizados. Pero la mayoría han de modificarse previamente para

umentar su volatilidad (esto es disminuir su punto de ebullición, una vez convertidos los ácidos grasos que esterificaban al glicerol en sus ésteres metílicos). Se cargan a continuación los ésteres metílicos en una columna cromatográfica y se calienta esta para volatilizar los compuestos. El orden de elución depende de la naturaleza del adsorbente sólido de la columna y del punto de ebullición de los componentes de la mezcla lipídica. Con la utilización de las técnicas cromatográficas, se pueden separar completamente mezclas de ácidos grasos con diferentes longitudes de cadena y diversos grados de insaturación (Lehninger *et. al.*, 1995).

### **2.3.1 Cromatografía de gases**

La separación de compuestos con el propósito de identificar, cuantificar o purificar es uno de los aspectos de la química analítica. La cromatografía es considerada como una de las más poderosas metodologías de separación. (Harris 1992).

En la cromatografía de gases, un líquido volátil o un soluto gaseoso son arrastrados por una fase móvil gaseosa que circula sobre un líquido estacionario que cubre un soporte sólido, o sobre una superficie sólida adsorbtiva. (Harris 1992).

Las columnas empacadas cortas tienen gran capacidad de soluto, pero baja resolución. Las columnas tubulares abiertas y largas y estrechas tienen baja capacidad, pero producen excelente separación. Las columnas tubulares abiertas de sílice fundida pueden ser de pared recubierta, de soporte recubierto o de capa porosa. Cada fase estacionaria líquida retiene principalmente los compuestos que pertenecen a su misma clase de polaridad. Entre las fases estacionarias sólidas comunes se incluyen alúmina y tamices moleculares. (Harris 1992).

La programación de la temperatura se utiliza para reducir los tiempos de elución de componentes que se retienen fuertemente. Sin afectar la eficiencia de la separación, el gasto lineal puede incrementarse empleando H<sub>2</sub> o He en lugar de

**N<sub>2</sub>** como gas acarreador. La inyección dividida es el procedimiento ordinario, mientras que la inyección sin división es la mejor para el análisis cuantitativo. La inyección sobre la columna es mejor para solutos térmicamente inestables. La detección de conductividad térmica tiene respuesta universal pero la ionización de flama es la más sensible. Otros medios de detección son los de captura electrónica, fotometría de flama, detección de álcalis a la flama, espectrometría de masa y espectroscopia al infrarrojo de transformada de Fourier. Un compuesto puede identificarse por su tiempo de retención en diferentes columnas y cuantificarse con base al área de bajo su pico de elución. Los factores de respuesta relacionan el área con la concentración de diferentes compuestos (Harris 1992).

#### 2.4 Importancia de microorganismos en aguas residuales

El conocimiento microbiológico involucra la estabilización de aguas residuales e intenta proveer los fundamentos de las operaciones y de las técnicas de trabajo, para establecer condiciones aceptables en el tratamiento de sistemas de aguas residuales (Gerardi, 1991).

Elementos fundamentales en la degradación de compuestos tóxicos son los lodos activados, donde las bacterias son las responsables de la estabilización. Regularmente, *Achromobacter*, *Flavobacterium* y *Pseudomonas* son encontradas en la formación del flóculo, donde es absorbida la materia orgánica soluble de las aguas residuales, donde se lleva a cabo la degradación. Además, en el mismo, están agregados *Nitrosomonas* y *Nitrobacter* que son responsables de la nitrificación, la conversión de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) y de nitrito a nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) (Gerardi, 1994).

En la mayoría de las ocasiones, los organismos remueven eficientemente la materia orgánica en los lodos activados, sin embargo, algunos son causantes de problemas en la sedimentación. Por ejemplo, bacterias filamentosas como *Shaerotilus natans* y hongos como *Geotrichum* causan abultamiento de lodo. Los filamentos de actinomicetos como *Nocardia* han mostrado problemas de espuma, lo cual, altera la sedimentación. (Gerardi, 1990).

Para estar seguros de que un agente causal de esponjamiento en los reactores es un actinomiceto, es necesario obtener al microorganismo puro. Dicho agente, tiene un lento crecimiento comparado con otras bacterias, lo que hace difícil su aislamiento e identificación. El periodo de incubación está comprendido entre 7 y 28 días para cultivo y aislamiento, debido a su baja tasa de crecimiento. (Gerardi, 1990).

En lodos anaerobios de digestión, las moléculas orgánicas grandes, como lípidos, proteínas y polisacáridos, son transformadas a moléculas más sencillas por la inserción de moléculas de agua, este proceso es conocido como hidrólisis. Aquí, las bacterias responsables de la degradación que se encuentran generalmente son: *Clostridium*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Alcaligenes* y *Pseudomonas*. La presencia de *Desulfovibrio* en ciertos lodos industriales con altas concentraciones de sulfatos, puede convertir los sulfatos en sulfuro de hidrógeno, causando problemas en la digestión anaerobia de los lodos. (Gerardi, 1994).

Muchas de las bacterias responsables de la hidrólisis también son formadoras de ácido, tales como *Aerobacter*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium* y *Alcaligenes*. Por último los productos de los ácidos que se forman, son convertidos a metano (CH<sub>4</sub>) a través de la metanogénesis. Claro ejemplo es que *Methanobacterium*, *Methanosarcina*, *Methanococcus* y *Methanospirillum* han sido identificados comúnmente en lodos de digestión anaerobia (Gerardi, 1990).

Las bacterias coliformes están altamente concentradas en las aguas residuales y generalmente esparcidas, además de ausentes en otro hábitat. La relación entre coliformes y aguas residuales, es considerada como un indicativo de contaminación. Cuando la contaminación es por materia fecal, se pueden transmitir enfermedades bacterianas como la fiebre tifoidea, disentería, gastroenteritis y cólera; enfermedades virales como hepatitis y polio; parásitos intestinales como *Giardia*, *Cryptosporidium* y *Entamoeba*. (Gerardi, 1990).

Se considera adecuado el uso de indicadores microbiológicos como referencia de la contaminación de aguas y no como indicador de especies. Generalmente, una alta concentración de especies indicadoras, sugiere un alta concentración de patógenos. Se consideran excepciones cuando los patógenos son abundantes y no los indicadores y viceversa. Dichas excepciones, resultan en ocasiones de efectos naturales como contaminación del agua, interferencias en el muestreo y

pueden llevar a resultados erróneos. El riesgo que esta asociado a la presencia de organismos patógenos y agua contaminada por materia fecal pone en serio peligro la salud de la población. (Gerardi, 1990)

### 2.5 Características de *Pseudomonas aeruginosa*

El genero *Pseudomonas* pertenece a la familia *Pseudomonadacea*, se caracterizan por ser bacilos rectos o curvos, Gram negativos, motilidad por flajelos polares. Aerobios estrictos, teniendo el oxígeno como el aceptor terminal de electrones, en algunos casos puede usar el nitrato como aceptor final de electrones. Quimiorganotróficos, son capaces de usar más de un compuesto de carbono orgánico como fuente de carbono y energía. Reacción de catalasa y oxidasa positivo (Holt, 1984)

Tabla 1. Caracterización primaria de *Pseudomonas aeruginosa*\*

Color (pigmento de piocianina)	Presente
Fluorescencia en UV	Presente
Actividad de la citocromooxidasa	Presente
Morfología y tinción Gram	Bacilos cortos, Gram negativos
Olor	Característico, similar a tortilla mojada

*P. aeruginosa* tiene un crecimiento óptimo a 37°C, también puede crecer a 42°C. Puede ser aislado de la tierra y agua, inclusive se puede encontrar en agua destilada. Comúnmente es aislado de muestras clínicas, debido a se considera como un agente infeccioso patógeno oportunista. Agente causal de la "pus azul" origen del sinónimo de *pyocyaneus* (Holt, 1984; Tortora *et al.*, 1998).

---

\* Konneman *et al.*, 1992.

## **2.6 Estado del arte**

### **2.6.1 Ácidos grasos celulares en la identificación de microorganismos**

Los perfiles de ácidos grasos celulares se han utilizado para la identificación de gran número de microorganismos (con previo cultivo y aislamiento). En algunos casos la identificación se realiza con fines taxonómicos y en otros casos se trata de bacterias que tienen importancia médica, esto se puede llevar a cabo gracias a que se puede contar con biomarcadores (AGC) que permitan la identificación de familias inclusive de especies de microorganismos aparentemente similares (Vestal y White, 1989).

Sin embargo, durante el estudio de los microorganismos se han encontrado con problemas al utilizar la técnica para determinar el perfil de AGC. Es la falta de patrones de AGC únicos por tipo o porcentaje molar de las comunidades que se encuentran en los sistemas de tratamiento de aguas residuales o incluso en suelos. Esto provoca que exista confusión en la interpretación de los perfiles de AGC, ya que muchos AGC son comunes para diferentes microorganismos (Zelles *et al.*, 1999). Con la cantidad de muestra adecuada, se evitan los problemas de no encontrar AGC, que llegarían a ser determinantes en la identificación de los microorganismos.

La cantidad de muestra para obtener los perfiles celulares varía entre experimento y muestra, ya que investigadores han utilizado diferentes cantidades de muestra. Ramírez (2000) utilizó 20 mg de liofilizado de cepas aisladas de cinco especies de *Klebsiella*, King *et al.*(1977) utilizó muestras de mar con 25 a 43 mg, 50 mg Welch (1991), 50mg Daffé *et al.*(1983), Muñoz *et al.*(1997) utilizó 10 mg de dos tipos de micobacterias directamente raspadas de las placas de agar.

### 2.6.2 Ácidos grasos determinados durante el ayuno

Con el estudio de los AGC se puede conocer el estado en el que se encuentran los microorganismos (Vestal y White, 1989). Algunos autores describieron que se producen cambios en los AGC dependiendo del estado metabólico en el que se encuentren los microorganismos y que tales cambios pueden utilizarse como biomarcadores (Guckert *et al.*, 1986).

También, durante el ayuno se observó que los porcentajes molares de los AG saturados disminuyen y de los AG insaturados aumentan (Hood *et al.*, 1986 y Guckert *et al.*, 1986). La relación Trans/Cis aumenta, especialmente en los ácidos 16:1w7t/16:1w7c y 18:1w7t/18:1w7c (Guckert *et al.*, 1986 y Webster *et al.*, 1997). De hecho, se ha reportado que para indicadores de estrés en bacterias Gram negativas hay un incremento en la tasa de ácidos grasos insaturados y un incremento en la tasa de ácidos grasos de ciclopropano sobre sus precursores monoenoicos (Guckert *et al.*, 1986).

Guckert *et al.* (1986) mencionan que en *Vibrio cholerae* se obtuvo una relación de 0-2 para una condición de cero días de ayuno, de 0.70 para un ayuno de 7 días y de 1.56 para un ayuno de 30 días. Vestal y White (1989) encontraron valores más pequeños, de tal modo que una comunidad sana tuvo una relación cercana a 0.1 y una comunidad en estrés tuvo una relación entre 0.3 y 0.6.

Las determinaciones de la variación de AG y de la relación de estrés se han obtenido durante el ayuno de nutrientes, en cepas puras o en ambientes naturales como suelos y aire. Sin embargo, no se han realizado estudios sobre el ayuno de nutrientes o de una fuente de carbono en ambientes como aguas residuales. Lo anterior es muy importante ya que se ha reportado que durante el tratamiento de aguas residuales, disminuye la viabilidad y la capacidad de los microorganismos para degradar los compuestos tóxicos, si se someten a un factor estresante como el ayuno (fuente de carbono).



### **3. METODOLOGÍA**

#### **3.1 Preparación de cepa *Pseudomonas aeruginosa***

La cepa de *Pseudomonas aeruginosa* 095081, se recibió del cepario de la Facultad de Química de la UNAM. Esta cepa se escogió por tener en cuenta algunos aspectos, el primero por que es un microorganismo representante de los sistemas de aguas residuales de tratamiento.

La cepa fue caracterizada, para verificar la pureza de la misma, se identificó por técnicas microbiológicas convencionales, en las que se incluyeron morfología colonial, tinción Gram y pruebas bioquímicas por el sistema de identificación comercial API20E.

#### **3.2 Influencia de la cantidad de muestra a tratar**

Se siguieron cinéticas iniciales de crecimiento de *P. aeruginosa*, estas se realizaron con el fin de conocer las fases de crecimiento del microorganismo, tiempo que transcurre durante el crecimiento con restricción de fuente de carbono, temperatura controlada y producción de biomasa.

La cepa de *Pseudomonas aeruginosa* se sembró en agar nutritivo y se incubó a 37°C durante 24 horas, con el fin de promover su crecimiento. Tomando el tapete de colonias de dos cajas se inoculó a un matraz en el cual se realizó la cinética. La cinética se llevó en un matraz de 2 L con un volumen de operación de 1.5 L, el cual contenía caldo nutritivo con 500 mg/L como carbono orgánico total (COT) inicial, a 25°C, aerado (Figura 3). La cepa se dejó crecer durante 7 días, alimentando con la misma cantidad de fuente de carbono cada 12 h.

Para mantener el sistema aerado se dispuso del siguiente sistema (figura 3): el primer matraz contenía hipoclorito de sodio al 7%, en el segundo matraz agua, en

el tercero carbón activado seguido de un filtro de aire (poro nominal 0.2  $\mu\text{m}$ ). Posteriormente, se determinó la biomasa presente por medio de los SSV (según APHA, 1992), y en su caso por turbiedad, del matraz de la cinética se tomó todo el volumen y se llevó a centrifugar a 3500 rpm, por 20 min. Una vez centrifugado, el sobrenadante se desechó y de la pastilla se tomó la biomasa. Se pesó en balanza analítica la cantidad de 10, 20, 30, 40 y 50 mg de muestra y se trató, como se indica en la sección 3.4, para ser analizada en el cromatógrafo.

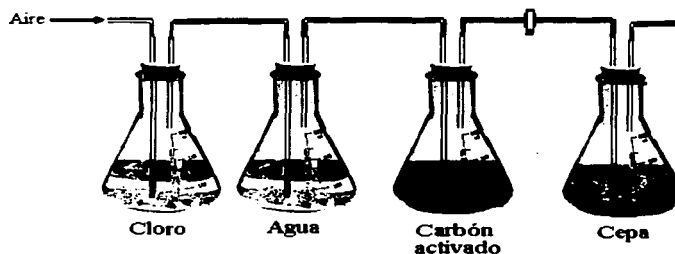


Figura 3. Esquema gráfico de aeración para la cepa.

### 3.3 Crecimiento de la cepa bacteriana en ayuno

La cepa de *Pseudomonas aeruginosa* fue sembrada en agar nutritivo y se incubó a 37°C durante 24 horas, con el fin de promover su crecimiento. Posteriormente, se tomó el tapete de colonias que crecieron en la placa y se procedió a realizar una cinética de crecimiento, en caldo nutritivo con una concentración de 500 mg/L como COT inicial, a 25°C y aereado (ver en Figura 3). Una vez que tuvo la cantidad de SSV mayor a 300 mg/l la biomasa se centrifugó, a la pastilla se le agregó una solución salina isotónica (SSI, 0.85 % de NaCl) para resuspender a la biomasa, se centrifugó en las mismas condiciones como para el primer lavado y se desecha el sobrenadante; la operación se repitió una vez más.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

La pastilla se resuspendió en un volumen de 1 L con SSI y se adicionó medio de caldo nutritivo para tener una concentración de 125 mg/L de COT. En ese momento se inició la cinética de consumo, se tomaron muestras en las primeras dos horas en intervalo de 20 minutos, después de dos horas, se tomaron cada 4 horas. Las muestras se filtraron y se procesaron en un analizador, TOC analyzer Shimadzu 5050. Después de seguir la cinética se dividió en 3 matraces de 1L con volumen de reacción de 550 mL, y se dejó pasar 24, 36 y 48 horas, sin alimentar. Posteriormente se volvió a alimentar con la concentración de 125 mg/L de COT y se siguieron las cinéticas posteriores, para las cuales, la operación de muestreo se repite. Al final del tiempo del ayuno se tomó muestra y se trató, como se indica en la sección 3.4, para ser analizada en el cromatógrafo.

### **3.4 Tratamiento de las muestras**

Las muestras que fueron tomadas de las cinéticas, se colectaron en tubos de vidrio, previamente enjuagados en cloroformo. Posteriormente se realizó el siguiente tratamiento (Daffé *et al.*, 1983; Muñoz *et al.*, 1997):

#### **a) Saponificación**

- 1) Se puso la muestra bajo reflujo con una solución de KOH al 5 %, preparada con una mezcla de metanol/benceno 8:2 (v/v). El reflujo se realizó a 60-79 °C durante 16 horas
- 2) Se evaporó el solvente en una campana de extracción con una corriente de aire y a 60°C

#### **b) Extracción:**

- 1) A cada muestra se le agregó 2 mL de HCl al 10 % más 2 mL de éter etílico. Se agitó con vortex durante 1 min.
- 2) La fase orgánica (éter etílico) conteniendo los lípidos disueltos se recuperaron con una pipeta Pasteur y se colocó en un tubo nuevo

- 3) Se adicionaron 2 mL de éter etílico a la fase acuosa. Se agitó con vortex y se recuperó la fase etérea para disponerla en un tubo nuevo.
- 4) Se repitió el paso anterior una vez más
- 5) Se adicionaron 2 mL de agua destilada a la fase orgánica. Se agitó y la fase acuosa se retiró del tubo
- 6) Se repitió el paso anterior dos veces más
- 7) Las muestras se sometieron a una corriente de aire a 30°C para evaporar el solvente

c) Esterificación

- 1) Los ácidos obtenidos en el paso anterior, se resuspendieron en 2.5 mL de diazometano (ver preparación en el anexo 1)
- 2) Se dejó reaccionar durante 15 minutos
- 3) Se evaporó el diazometano en un baño de agua a 60°C

d) Análisis de los ésteres metílicos

Cada muestra conteniendo los ácidos grasos esterificados, antes de ser inyectados en el cromatógrafo se resuspendieron con 30  $\mu$ L de éter de petróleo y de ésta suspensión se tomó con una jeringa Hamilton un volumen de 1  $\mu$ L, el cual se inyectó en un cromatógrafo VARIAN STAR 3600 CXGC (Varian Associates, Inc USA), equipado con una columna capilar de sílice HP-1, de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno,  $\phi$  25 mm de grosor y un detector de ionización de flama. La elución se efectuó con nitrógeno como gas acarreador a un flujo de 1mL/min con un gradiente de temperatura de 50 a 280°C, a razón de 10°C/min, manteniendo la temperatura inicial y por quince minutos la temperatura final. El tiempo de análisis fue de 39 min.

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

porcentajes de área, 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.

### **3.5 Calibración de la técnica**

Se inyectó un estándar comercial, el cual consistió de una mezcla de 26 ácidos grasos que se encontraban en forma de ésteres disueltos en metil caproato (10mg/mL concentración total) Catálogo No. 47080-U de Supelco/Sigma-Aldrich Co, USA. Adicionalmente, se adicionaron 2 ácidos grasos (ac. Behénico, 22:0 y ac. Lignocérico, 24:0), se resuspendieron en éter de petróleo y se mantuvieron en congelación (-20°C) para cada inyección.

### **3.6 Determinaciones analíticas**

#### **3.6.1 Carbono orgánico total (COT)**

La determinación es una expresión directa del contenido de carbono orgánico del agua. El método se basa en la combustión de la materia orgánica transformada a CO<sub>2</sub> y transportado a un analizador de gas infrarrojo.

Las muestras que se trataron, fueron filtradas y se procesaron en un analizador, TOC analyzer Shimadzu 5050, según APHA, 1992. Esta determinación se realizó al caldo nutritivo (Bioxon, CAT-103-1) que se utilizó, con la finalidad de restringir a la cepa una fuente de carbono.

### **3.6.2 Turbiedad**

Esta determinación se realizó junto con el crecimiento de la bacteria, se determinó la turbiedad mediante un Nefelómetro Turner TD40, y se graficó la turbiedad en unidades nefelométricas (NTU) contra tiempo. Con la finalidad de conocer la fase logarítmica de crecimiento de la bacteria en las condiciones presentadas.

### **3.6.3 Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV)**

Es una prueba que cuantifica la materia volátil suspendida en el agua para analizar. Se basa en las diferencias de peso de la materia orgánica e inorgánica no soluble en el agua, después de ser evaporada el agua.

Se determinaron SSV (mg/l) según APHA, 1992 para determinar la concentración de biomasa presente.

### **3.6.4 Cuenta heterótrofa en placa (CHP)**

Es un método utilizado para estimar el número de colonias de bacterias que se han desarrollado en cajas petri conteniendo en un medio de cultivo. Con este método se calcula el número de bacterias viables en un volumen conocido por medio de diluciones.

Se realizó esta determinación con el fin de obtener la cantidad de unidades formadoras de colonias por mililitro de muestra (UFC/ml). Se utilizó el método por extensión, en agar nutritivo (Bioxon, CAT-104) según APHA, 1992

### **3.6.5 Prueba de identificación por medio del sistema API 20-E**

Esta sistema API 20-E es utilizado para la identificación para *Enterobacteriaceae* y otros bacilos Gram negativos. El sistema consta de 21 pruebas sobre los siguientes sustratos (incluidos en los microtubos del sistema API): ONPG (o-nitrofenol-b-D-galactósido), ADH (arginina), LDC (lisina), ODC (ornitina), CIT (citrato sódico), H<sub>2</sub>S (tiosulfato sódico), URE (urea), TDA (triptofano), IND (indol), VP (piruvato sódico), GEL (gelatina de Kohn), GLU (glucosa), MAN (manitol), INO (inositol), SOR (sorbitol), RHA (ramnosa), SAC (sacarosa), MEL (melobiosa), AMY (amigdalina), ARA (arabinosa) y la prueba de la oxidasa (OX). Según las instrucciones que acompañan al producto, con las 21 pruebas se forman siete grupos ordenados de tres. A cada integrante del trío se le asignan los valores: 1, 2 y 4 (en ese mismo orden y en el caso de que las reacciones resulten positivas). Según si cada reacción resulta positiva o negativa, el dígito correspondiente a cada grupo puede ser como mínimo cero, como máximo siete; y todos los números intermedios posibles, según la suma resultante.

En los resultados que se tabularon en las tarjetas, se obtiene obtener un código o perfil numérico de 7 dígitos. Con ese perfil se consultó la base de datos del programa de Bio Mérieux (Francia), cuya consulta permite la identificación de las especies y de los fenotipos bioquímicos, en forma simultánea.

### **3.7 Análisis Estadístico**

#### **3.7.1 Tiempos de retención**

Se realizaron tres inyecciones del estándar y dos en las muestras. Se calculó la media aritmética y la desviación estándar a los tiempos de retención.

### **3.7.2 Porcentajes de áreas**

Se sumaron todas las áreas bajo la curva lo que corresponde al 100 % y se calculó el porcentaje para cada pico sobre la base de éste total. Una vez obtenidos los porcentajes de las áreas, se calculó la media aritmética y la desviación estándar y coeficiente de variación de las inyecciones.

### **3.7.3 Concentración de los ácidos grasos celulares**

La concentración de los ácidos grasos obtenidos en las muestras fue determinado mediante la concentración del estándar interno (24:0). Se utilizaron los porcentajes de área de los ácidos grasos encontrados en las muestras, para relacionarlas con las áreas del estándar, obteniéndose las concentraciones para cada ácido en las muestras.



## 4. Resultados y discusión

### 4.1 Preparación de la cepa *Pseudomonas aeruginosa*

Además de realizar caracterización primaria se efectuó la prueba API para la cepa de *P. aeruginosa*, mediante el código de números encontramos que las pruebas correspondían a lo reportado para la cepa, solo la prueba de hidrólisis de urea, no correspondió con el código. Para la prueba de la utilización de la urea está reportada como una prueba verdadera (Konemman *et al.*, 1992). Tomando esto en cuenta, se tuvo un 78% de confianza en la identificación para la cepa de *P. aeruginosa*.

#### 4.1.2 Cinéticas iniciales de crecimiento de *P. aeruginosa*

Para tomar muestras y analizarlas, se obtuvieron datos de la cinética de crecimiento de *P. aeruginosa*. Como podemos ver en la figura 4 (Anexo, tabla 1A), a partir de 3 h termina la fase de latencia de crecimiento, para iniciar su fase logarítmica y a 10 h tiene inicio su fase estacionaria.

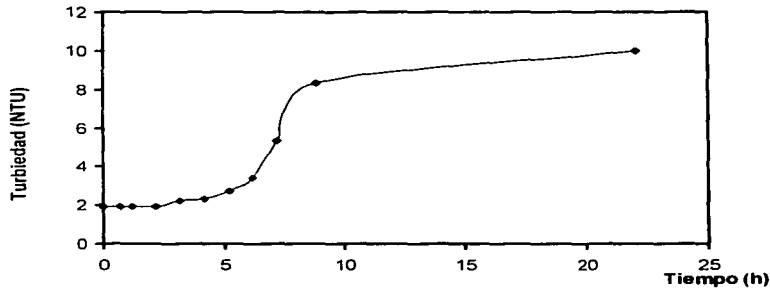


Figura 4. Cinética de crecimiento de *P. aeruginosa*

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Nuevamente se realizó otra cinética, pero ahora alimentando a la cepa, cada 12 h, con el fin de contar con evidencia de cómo se comporta la cepa con alimentación periódica. Obtenido de la figura 5 (Anexo, tabla 2A), tendremos cual será el tiempo para el muestreo y procesamiento de muestras.

Para el crecimiento de *P. aeruginosa* en las condiciones utilizadas, se necesitaron de 2 a 3 días para una producción de biomasa aproximada de 300 mg/L. Cantidad que fue utilizada en los experimentos posteriores (sección 4.3 y 4.4)

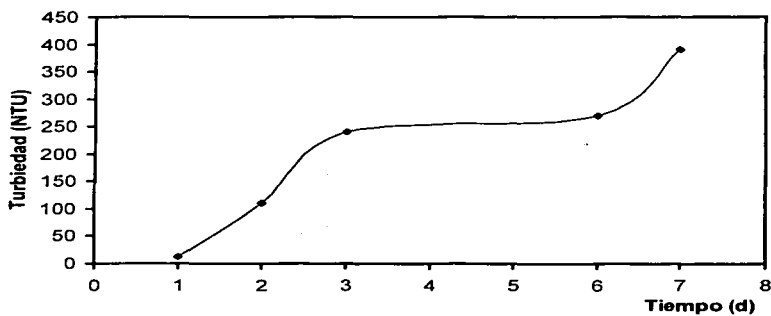


Figura 5 Cinética de crecimiento de *P. aeruginosa*, alimentada durante 7 días.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Con los datos de las cinéticas de crecimiento de *P. aeruginosa*, se tiene una relación entre SSV y turbiedad (figura 6 y Anexo, tabla 3A). Esto con el fin de relacionar posteriormente datos en las determinaciones para el procesamiento de muestras futuras.

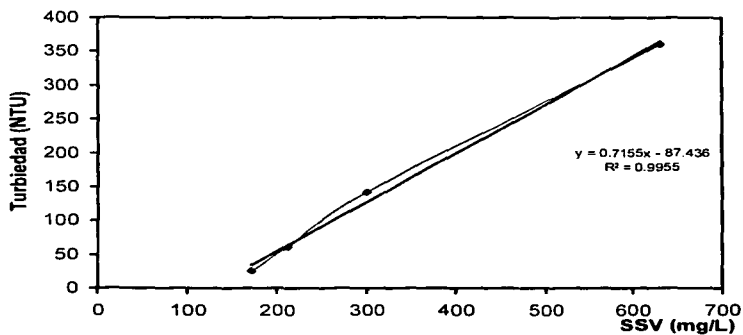


Figura 6. Relación entre turbiedad y SSV

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

## 4.2 Calibración de la técnica

Para calibrar la técnica se inyectaron 26 ácidos grasos provenientes del estándar comercial. En la tabla 4A del anexo se muestran los tiempos de retención para cada ácido que fue reconocido del perfil cromatográfico con el del diagrama señalado del fabricante se compararon los picos y lo identificamos como se muestra en la figura 7.

Acido graso	Nombre del ácido	15	16:0	Me. Hexadecanoato
1 11:0	Me. Undecanoato	16	117:0	Me. 15 metilhexadecanoato
2 2OH10:0	Me. 2 hidroxidodecanoato	17	17:0cy	Me. Cis9,10 metilhexadecanoato
3 12:0	Me. dodecanoato	18	17:0	Me. Heptadecanoato
4 13:0	Me. Tridecanoato	19	2OH16:0	Me. 2 hidroxihexadecanoato
5 2OH12:0	Me. 2 hidroxidodecanoato	20	18,2 <sup>12</sup>	Me. Cis 9,12 octadecadienoato
6 3OH12:0	Me. 3 hidroxidodecanoato	21	18:1*	Me. cis 9 octadecenoato
7 14:0	Me. Tetradecanoato	22	18:1*	Me. Trans 9 octadecenoato
8 115:0	Me. 13 metiltetradecanoato	23	18:0	Me. Octadecanoato
9 a15:0	Me. 12 metiltetradecanoato	24	19:0cy	Me. Cis 9,10 metilenoctadecanoato
10 15:0	Me. Pentadecanoato	25	19:0	Me. Nonadecanoato
11 2OH14:0	Me. 2 hidroxitetradecanoato	26	20:0	Me. Eicosanoato
12 3OH14:0	Me. 2 hidroxitetradecanoato	27	22:0	Me. Eicododacainato (Behénico)
13 116:0	Me. 14 metilpentadecanoato	28	24:0	Me. Eicotertainato (Lignocérico)
14 16:1*	Me. Cis -9-hexadecanoato			

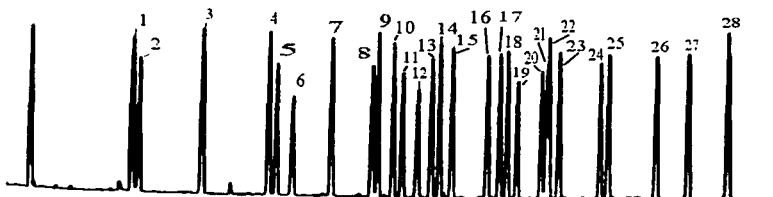


Figura 7. Perfil cromatográfico del estándar comercial obtenido con el equipo utilizado para la experimentación

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

#### 4.3 Influencia de la cantidad de la muestra en el perfil cromatográfico de ácidos grasos celulares

El análisis cromatográfico de los ácidos grasos celulares para *P. aeruginosa*, se realizó por duplicado para las diferentes cantidades de muestra (10, 20, 30, 40 y 50 mg). Mediante los tiempos de retención del estándar fueron identificados los ácidos grasos de la muestra. En la figura 8 se muestra el perfil cromatográfico de *P. aeruginosa* con una muestra analizada de 20 mg. Los demás cromatogramas se encuentran en el anexo (figuras 17).

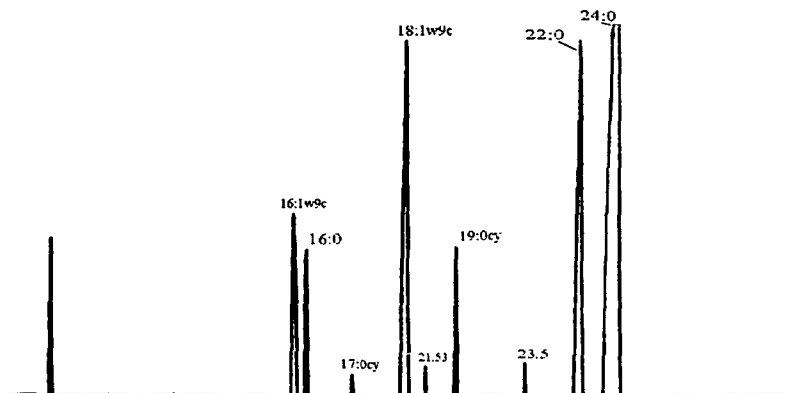


Figura 8 Perfil cromatográfico de *Pseudomonas aeruginosa*, con una muestra de 20 mg

Se realizó una búsqueda bibliográfica para encontrar cuales son los AGC de *P. aeruginosa*. En la tabla 2, se encuentran marcados los ácidos grasos que se han reportado por otros autores (Kropinski *et al.*, 1987; Rodríguez, 2000) y encontrados en el presente estudio.

**Tabla 2. Comparación de ácidos grasos (ausencia-presencia) encontrados en el presente trabajo y por otros autores**

Ácido	Referencias (Kropinski <i>et al.</i> , 1987; Rodríguez, 2000)	Muestras, presente trabajo
12:0	✓	-
2OH12:0	✓	-
3OH12:0	✓	-
14:00	✓	-
18:0	✓	-
16:1w9c	✓	✓
16:0	✓	✓
17:0cy	✓	✓
18:1w9c	✓	✓
19:0cy	✓	✓
21:53*	-	✓
23:5*	-	✓
22:0	-	✓
24:0	-	Estándar interno

\* Tiempo de retención o picos no identificados con estándar.

Para los ácidos grasos que se han reportado, en comparación de los encontrados, se ve que no aparecen los ácidos 12:0, 14:0, 18:0, 2OH12:0, 3OH12:0, reportados los tres primeros en bajas concentraciones (0.01, 1 y 0.01%, respectivamente). Para el caso los ácidos conteniendo grupos hidroxilo (2OH12:0 y 3OH12:0), la técnica que se utilizó en este trabajo, no permite la recuperación de ácidos con grupos hidroxilo, mientras que tiene una alta recuperación para de ácidos grasos con grupos ciclopropanos. Esto se debe a que en el momento en que la mezcla después de la saponificación (estando en condiciones alcalinas) se preservan los componentes de ácidos-sensitivos tales como ácidos grasos ciclopropano y con esto son a menudo insuficientes las condiciones para lanzar componentes amido-unidos, tales como ácidos grasos hidroxilados. De la mezcla obtenida después de la saponificación es acidulada, esto es suficiente como para llevar a cabo hidrólisis ácida de los grupos hidroxilo, llevando a una inapropiada extracción con un solvente orgánico (Mayberry y Lane, 1993).

De los resultados obtenidos en los cromatogramas, porcentaje de área y de la concentración inyectada del estándar interno (24:0), se calculó la concentración que tiene cada pico (Anexo, tabla 5A). En las figuras 9 y 10 se observan, ya determinadas, las concentraciones de cada ácido encontrados en los cromatogramas de las diferentes cantidades de muestra.

Se observó el comportamiento de las áreas en las diferentes cantidades de muestra. Estas cantidades para los ácidos grasos varían, para la muestra de 20 mg de muestra tratada, en general, aparecen áreas con mayor área de los picos, lo que corresponde a la concentración más alta en los ácidos grasos. Para la cantidad de 10 mg de muestra tratada, también se encuentra una de las mayores concentraciones de AGC.

Para las muestras de 30, 40 y 50mg, era de esperar que con una mayor cantidad de muestra, obtener una mayor concentración en los ácidos grasos. Sin embargo, debido a la técnica utilizada, hubo problemas los cuales no permitieron la adecuada extracción de los ácidos, debido a que en el momento de la extracción de la parte acuosa a la parte orgánica, la fase orgánica se saturaba. Formando así interfase entre las dos fases conservando retenidos a los ácidos grasos en ésta, teniendo la necesidad de utilizar una mayor parte de solvente(Mayberry y Lane, 1993).

En las muestras de 40 y 50 mg los tiempos de retención fueron recorridos. La identificación de los ácidos grasos definidos por el cromatograma fueron identificados mediante el patrón cromatográfico de las muestras de 10-30 mg. Además en las series de muestras de 30 a 50 mg, los porcentajes de área y lo tiempos de retención no se observa reproducibilidad en los datos, ya que se tienen coeficientes de variación mayores al 30% (Anexo, tabla 5A).

Este fenómeno cromatográfico se debe a los efectos de la adsorción en la columna cromatográfica, y es que no se comporta de manera ideal a la partición gas-sólido cuando hay una mayor cantidad de muestra. Ya que la adsorción se encuentra principalmente en la superficie sólida y en menor extensión en la interfase gas-sólido. Esto afecta considerablemente en la resolución, la fracción molar y la retardación de la traza inerte, afectando a el tiempo constante del detector (Huber y Gerritse, 1973).



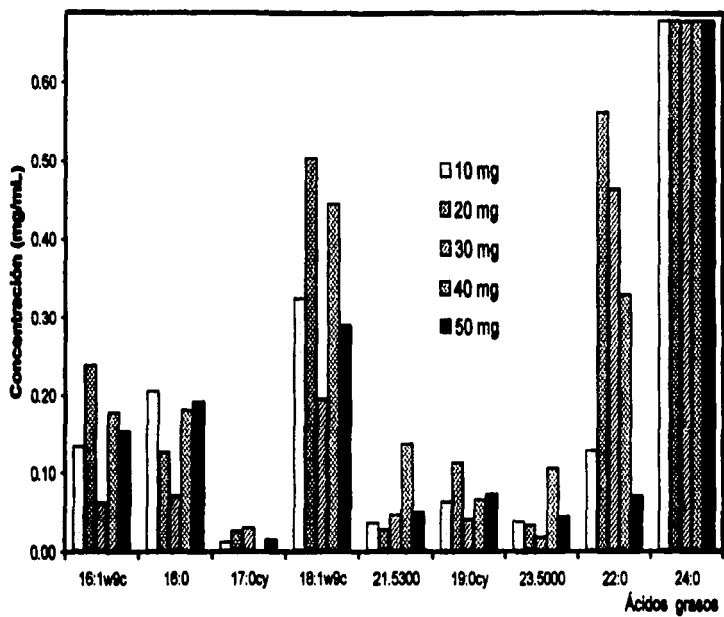


Figura 9. Gráfica de barras de concentración de AGC de *P. aeruginosa* para los diferentes ácidos grasos encontrados

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

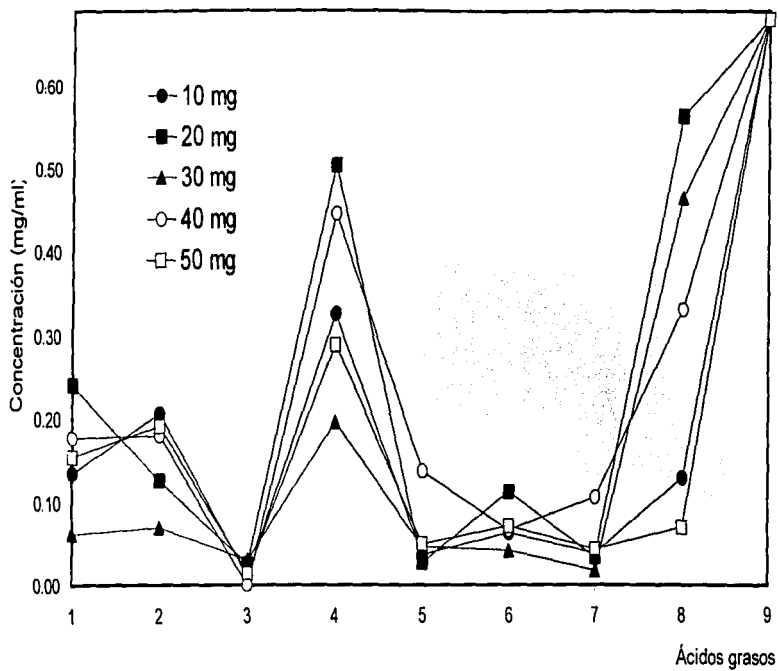


Figura 10. Concentración de AGC de *P. aeruginosa* con 10, 20, 30, 40 y 50 mg de muestra (Los ácidos del 1 al 9, corresponden a 16:1w9c, 16:0, 17:0cy, 18:1w9t, 21.53, 19:0cy, 23.5, 22:0 y 24:0 respectivamente)

#### 4.4 Influencia del ayuno en el perfil cromatográfico

##### 4.4.1 Cinéticas de consumo

Antes de proceder con los experimentos para determinar la influencia del periodo de ayuno, se efectuó una cinética para comprobar la actividad inicial que tiene el inóculo con el sustrato fácilmente degradable, en la figura 11 (Anexo, tabla 5A) se puede ver el comportamiento que tuvo la cinética.

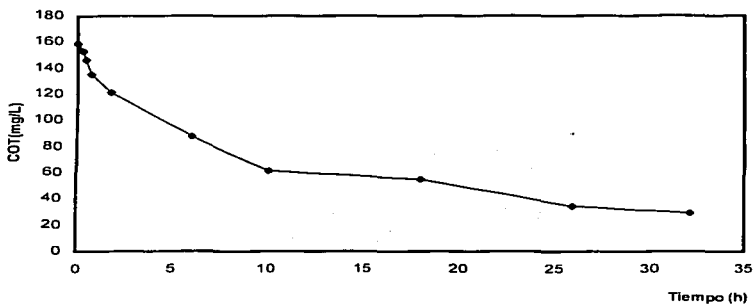


Figura 11. Cinética 1 de consumo para fuente de carbono

La cinética del inóculo que fue seguida mediante COT, se observa que en 10 h consume el 60% de 160 mg/L como COT. En 32 h se tiene consumido el sustrato en un 80%. La máxima actividad que se presenta es antes de las 10 h, después de este tiempo, el consumo disminuye por aparición de compuestos refractarios.

Teniendo la cinética de degradación y la actividad inicial del inóculo de *P. aeruginosa*, se procedió a dividir los matraces y tomar el tiempo de ayuno estipulado. Una vez cumplido el periodo de ayuno se volvió a alimentar y a

monitorear para ver como se comportaba nuevamente ante el consumo de la fuente de carbono.

En la figura 12 (Anexo, tabla 7A) se pueden observar las cinéticas de consumo de sustrato por *P. aeruginosa*, en las diferentes condiciones de ayuno. Como se puede observar para la cinética en condiciones de abundancia de sustrato (inicial), al igual que para las cinéticas de 24 y 36 horas de ayuno de sustrato, el tiempo que tardan para consumir fue muy similar (En 6.5h consumieron el 76%). Sin embargo, al comparar la cinética de abundancia de sustrato con la de 48 horas de ayuno, se puede observar que después de dichas horas de ayuno, *P. aeruginosa* tarda más tiempo en consumir el sustrato (en 7 h consumió 68%).

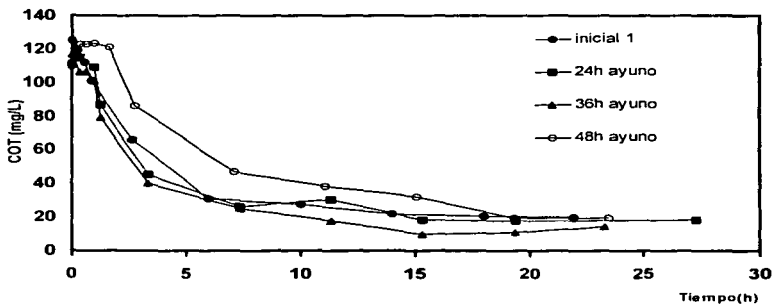


Figura 12. Cinética de consumo de sustrato por *P. aeruginosa*, a diferentes tiempos de ayuno

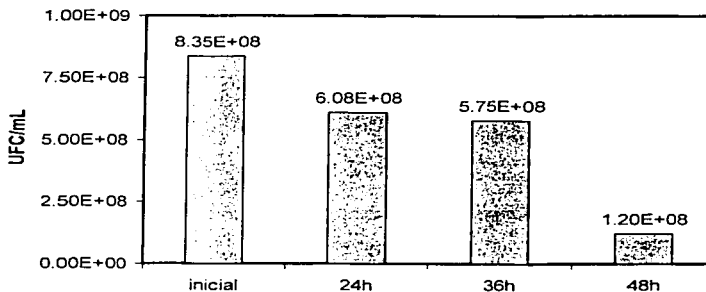
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

En la tabla 3, se muestra la velocidad de consumo y la actividad específica en las condiciones que se trabajaron.

**Tabla 3. Velocidad de consumo, actividad y viabilidad de *P. aeruginosa* en abundancia de sustrato y en estado de ayuno**

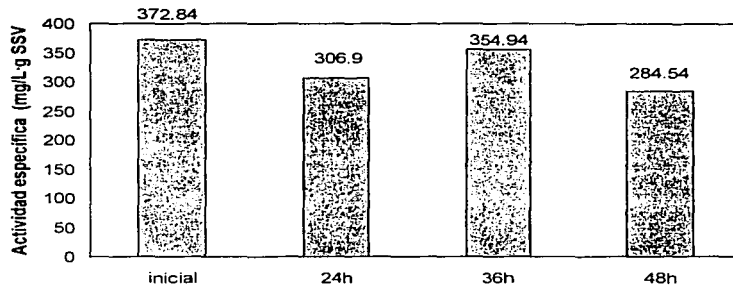
Condición	Velocidad de consumo (mg/h)	Actividad específica (mg/L·g SSV)	CHP (UFC/mL)
Abundancia de sustrato	15.69	372.84	$8.35 \times 10^8$
24 h ayuno	11.53	306.90	$6.08 \times 10^8$
36 h ayuno	12.44	354.94	$5.75 \times 10^8$
48 h ayuno	8.86	284.54	$1.20 \times 10^8$

Se realizó también CHP para ver como afectaba el periodo de ayuno a la viabilidad y con este a la degradación de la fuente de carbono. En la figura 13 y 14 se muestran como están representadas la viabilidad y actividad específica en el consumo del sustrato.



**Figura 13. Cuenta heterótrofa en placa de cinéticas de consumo con ayuno**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



**Figura 14. Gráfica de actividad específica en el ayuno sobre el consumo de sustrato**

Como se puede observar en las gráficas (figura 13), la viabilidad disminuye con respecto a la inicial conforme el periodo de ayuno aumenta, llegándose a perder hasta un 85% de viabilidad después e 48 h de un ayuno.

Sin embargo, aún cuando la viabilidad disminuyó para 24 y 36 h de ayuno, la velocidad de consumo y la actividad específica, se mantuvo de manera similar respecto a la cinética inicial (figura 14). Esto se debe a que los microorganismos viables conservan activas las enzimas que degradan los compuestos del medio.

La viabilidad es una variable muy importante en los procesos de tratamiento de aguas residuales, en donde se ven envueltos los microorganismos para la degradación de tóxicos, ya que si los microorganismos no están viables ni activos durante un periodo de ayuno, esto resulta en una baja en la degradación de compuestos tóxicos y como resultados descargar agua aún contaminada. (Torres, 1998)

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

#### 4.4.2 Análisis cromatográfico de los ácidos grasos celulares

El análisis cromatográfico de los ácidos grasos celulares para *P. aeruginosa*, se realizó por duplicado para los diferentes tiempos de ayuno (0, 24, 36 y 48h).

Mediante los tiempos de retención del estándar fueron identificados los ácidos grasos de la muestra. En la figura 15 se muestra el perfil cromatográfico de *P. aeruginosa* después de un ayuno de 24h. (ver en Anexo, figuras 18, los cromatogramas para 0, 36 y 48h de ayuno)

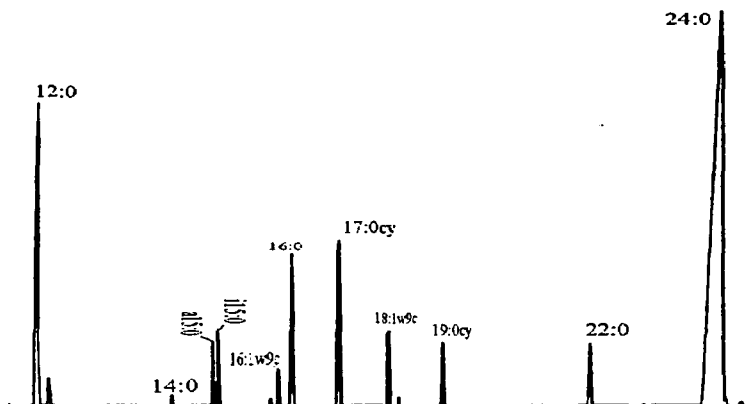


Figura 15. Perfil cromatográfico de *P. aeruginosa*, muestra con 24h de ayuno

A partir de los porcentajes de área y de la concentración del estándar interno (24:0) se calculó la concentración que tuvo cada pico (Anexo, tabla 8A). En la figura 16, se observan, ya determinadas, las concentraciones de los picos encontrados en los cromatogramas de las diferentes tiempos de ayuno.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

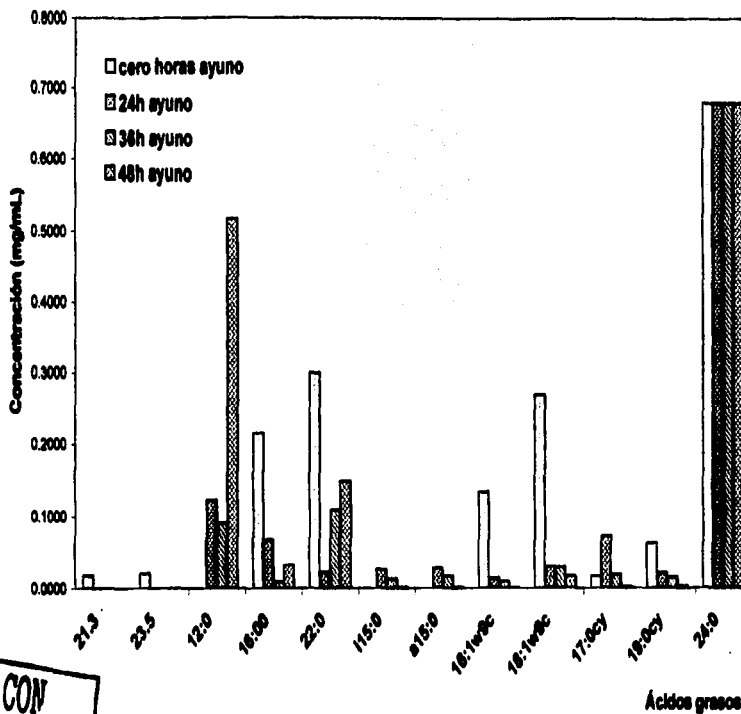


Figura 18. Comportamiento de los AGC de *P. aeruginosa* en ayuno

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Se observó el patrón que tienen las áreas en los diferentes tiempos de ayuno. En general todos los ácidos grasos tienden a disminuir cuando la cepa se encuentra bajo el efecto del ayuno. La concentración de los ácidos en forma Cis, como el de 16 y 18 carbonos tiende a disminuir hasta en un 89%, lo cual es reportado por la bibliografía para una cepa de *Vibrio cholerae* en ayuno de nutrientes (fuente de carbono), debido a que la bacteria tiene que mantener la integridad de la membrana (Guckert *et. al.*, 1986).

En lo que respecta a los ácidos grasos saturados, 12:0, 16:0, 22:0, se puede ver como hay una disminución de ellos en 24 y 36h, teniendo un aumento a las 48h. Lo que se ha reportado, en periodos de ayuno, es que hay un incremento en los ácidos grasos saturados. Ya sea por mecanismos de sobrevivencia para mantener la fluidez de membrana, para producción de energía endógena y para la síntesis de otros ácidos grasos (Hood *et al.*, 1986 y Guckert *et al.*, 1986).

También, se ha reportado que los ácidos ciclopropanos aumentan cuando una cepa se encuentra en ayuno. A partir de sus precursores *cis*-monoenoicos se sintetizan los ácidos con grupos ciclopropanos. La ventaja que tienen las células al sintetizar ácidos grasos con grupos ciclopropanos, es tener mayor estabilidad en membrana y una fácil degradación de ellos para obtención de energía (Guckert *et. al.*, 1986).

En el estado de ayuno aparecen 2 ácidos grasos que son los a15:0 y i15:0, ambos ácidos ramificados. Estos ácidos no se encuentran reportados para la cepa de *P. aeruginosa* en condiciones normales de crecimiento ni para condiciones de estrés por ayuno de nutrientes. Sin embargo, este comportamiento podría deberse a que se trató con un ayuno con restricción de la fuente de carbono y no por un ayuno dado en condiciones basales.

## **Conclusiones**

Se encontró que la cantidad de 20 mg de muestra presenta los mejores resultados para la técnica utilizada.

Tratar muestras con 40 y 50 mg puede llevar a una identificación errónea de los AGC ya que hay tiempos de retención recorridos y técnicamente es difícil tratar las muestras. Además se tiene una baja reproducibilidad en los datos.

El perfil cromatográfico de AGC se ve influenciado por el ayuno. De tal modo que la concentración de la mayoría de los ácidos grasos disminuye para 24, 36 y 48 horas de ayuno, especialmente para los insaturados. El ácido 17:0cy aumenta para 24 y 36 horas de ayuno. Además se observa la aparición de dos ácidos ramificados, i15:0 y a15:0.

El ayuno disminuyó la actividad específica de *P. aeruginosa*, de forma que, para 0 y 48 horas de ayuno se obtuvo una actividad de 14.54 y 9.48 mgTOC/L-h respectivamente. Además de disminuir también la viabilidad, que para 0 y 48 horas de ayuno se obtuvo una CHP de  $8.35 \times 10^8$  y  $1.2 \times 10^8$  UFC/mL respectivamente.

## **Bibliografía**

APHA (1992). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 18<sup>th</sup> Edition. Washington D.C.

API 20 E (1990). *Système d'identification des bacilles gram négatif non enterobactéries*. 20 EN. Notice technique, Bio Mérieux, S. A., France.

Daffé M., Lanéelle M., Asselineau C., Levy-Frébault V. and David H. (1983). Intéret taxonomique des acides gras des mycobactéries: proposition d'une méthode d'analyse. *Ann. Microorganismol.* **134B**. 241-256.

Gerardi M. H. (1990). *Wastewater biology: the microlife: a special publication*. Water Pollution Control Federation, Alexandria, Virginia. 21-38, 121-124.

Gerardi M. H. (1994). *Wastewater biology: the life process: a special publication*. Water Environment Federation, Alexandria, Virginia. 1-9.

Guckert J. B., Hood M. A. and White D. C. (1986). Phospholipid ester-linked fatty acid profile changes during nutrient deprivation of *Vibrio Cholerae*: Increases in the trans/cis ratio and proportions of cyclopropyl fatty acid. *Appl. Environ.* **52**. 794-801.

Harris D. C. (1992). *Análisis químico cuantitativo*. Ed. Iberoamérica México. 240-262.

Holt, J. G. (1984). N.R. Krieg y J. G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. I, **FAMILY I. PSEUDOMONADACEAE**. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md. 141-167

Hood M. A., Guckert J. B., White D. C. and Deck F. (1986). Effect of nutrient deprivation on lipid, carbohydrate, DNA, RNA and protein levels in *Vibrio cholerae*. *Appl. Environ. Microorganismol.* **52**. 788-793.

Huber J. F. K and Gerritse R. G. (1973). Influence of static and dynamic effects on the reproducibility of retention data in gas-liquid chromatography. *J. Chrom. A.* **18**. 25-42.

King J. D., White D. C. and Taylor C. W. (1977). Use of lipid composition and metabolism to examine structure and activity of stuarine detrital microflora. *Appl. Environ. Microorganismol.* **33**. 1177-1183.

Koneman E. W., Allen S. D., V. R. Dowell y Sommers H. M. (1992). Diagnostico microbiologico : Texto y atlas color, Tercera edición, Ed. Médica panamericana, México D.F. 276-288.

Kropinski A., Lewis V. and Berrey D. (1987). Effect of grow temperature on the lipids, outer membrane proteins, and lipopolysaccharides of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *J. Bacteriol.* **169**. 1960-1966.

Lehninger A., Nelson D., Cox M. (1995). Principios de Bioquímica, 2ª edición, Ed. Omega. España. 240-242, 262-264.

Mayberry W. and Lane J. (1993). Sequential alkaline saponification/acided hydrolysis/esterification: a one tube method with enhanced recovery of both cyclopropane and hydroxilated fatty acids. *J. Microbiol. Meth.* **18**. 21-32.

Muñoz M., Julian E., García-Barceló M., Auxina V. and Luqin M. (1997). Easy differentiation of *Mycobacterium mucogenicum* from other species of the *Mycobacterium fortuitum* complex by thin-layer and gas chromatographic of fatty esters and alcohols. *J. Chrom.* 431-437.

Olsen R. A. and Bakken L. R. (1987). Viability of soil bacteria: optimization of plate-counting technique and comparison between total counts and plate counts within different size groups. *Microb. Ecol.* **13**. 59-74.

Quezada M (2000). Biodegradación aerobia de colorants tipo azo. Tesis para obtener el grado en Maestría en Ciencias (Biología). Facultad de ciencias, UNAM. México D.F.

Ramírez G. P. (2000). Análisis de la variación inespecífica bacteriana de los ésteres metílicos de los ácidos grasos en cinco especies de *Klebsiella*. Tesis para obtener el grado de Doctor en ciencias (Biología). Facultad de ciencias, UNAM. México D.F.

Relman D. A. (1998). Detection and identification of previously unrecognized microbial pathogens. *Emerging Infection Diseases.* **4**. 382-390.

Rodríguez A. W. (2000). Variación poblacional de los microorganismos que degradan compuestos tóxicos a través de un proceso anaerobio/aerobio integrado con biopelícula. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias (Biología). Facultad de Ciencias, UNAM. México D.F.

Tortora G. J., Funke B. R., y Case C. L. (1998). Introducción a la microbiología. 2ª edición. Ed. Acrobía, España. 264, 271.

Torres C. A. (1998). Influencia del periodo de ayuno en la biodegradación de compuestos fenólicos. Tesis para obtener el grado de Química Farmacéutica Biología. Facultad de Química, UNAM. México D.F.

Vestal R. and White D. C. (1989). Lipid analysis in microbial ecology: Quantitative approaches to the study of microbial communities. *BioScience.* **39**. 535-541

Wade, Jr. L.G. (1993). Química orgánica. Prentice Hall. México. 1219.1228.

Weich D. F. (1991). Applications of cellular fatty acid analysis. *Clin. Microorganismol. Rew.* **4**. 422-438.

Webster T., Deviny J., Torres E. M. and Basrai S. (1997). Microbial Ecosystems in compost and granular activated carbon biofilters. *Biotechnol. Bioeng.* **53**. 296-303.

Widmer F., Seidler R. J., Gillevet P.M., Watrud L. S. y Di Giovanni G.D. (1998). A highly selective PCR Protocol for detecting 16S rRNA genes of the Genus *Pseudomonas* (Sensu Stricto) in environmental samples. *App. Environ. Microbiol.* **64**. 2545-2553.

Zelles L. (1999). Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterization of microbial communities in soil: a review. *Biol. Fertil Soils.* **219**. 111-129.

# Anexo

## Preparación de soluciones

### Solución etérea de diazometano

Prepararó dentro de la campana de extracción entre 0-4°C, sin utilizar material de vidrio esmerilado.

1. Se midió en un matraz Erlenmeyer (de 500 mL) 3 mL de una solución acuosa de KOH al 40 % (w/v) y 15 mL de éter etílico. Se dejó el matraz en hielo durante unos minutos.
2. Se adicionó con precaución a la fase acuosa 1 gramo de nitrosometilurea (utilizó cubrebocas y guantes). El diazometano se solubilizó en el éter. El recipiente conteniendo la nitrosometilurea se enjuagó con un poco de éter etílico a 4°C.
3. Se decantó la fase etérea sobre otro matraz Erlenmeyer previamente enfriado, el cual contuvo algunas lentejas de KOH para eliminar la humedad. Esta solución puede utilizarse quince minutos después de su preparación. Para conservar la solución, se tapó muy bien el matraz con un tapón de hule con papel aluminio.



Tabla 1A. Datos de cinética de crecimiento de *P. aeruginosa*

Tiempo (h)	Turbiedad (NTU)
0	1.9
0.67	1.9
1.17	1.9
2.17	1.9
3.17	2.2
4.17	2.31
5.17	2.7
6.17	3.43
7.17	5.33
8.17	8.4
22	10

Tabla 2A. Datos de Cinética de crecimiento de *P. aeruginosa* con alimentación periódica

Día	Turbiedad (NTU)
1	11
2	111
3	220
6	279
7	336

Tabla 3A. Datos de cinética de crecimiento de *P. aeruginosa*, relación entre SSV y turbiedad

SSV (mg/L)	Turbiedad (NTU)
170	26
211	61
300	141.86
631	360.15

Tabla 4A. Tiempos de retención para la mezcla de ácidos grasos del estándar comercial

	Ácido graso	Nombre del ácido	Tiempo de retención	Tiempo de retención	Tiempo de retención	Media aritmética	Desviación estándar	Porcentaje de variación
1	11.0	Me. Undecanoato	13	13.07	13.03	<b>13.03</b>	0.035	0.269
2	20H10.0	Me. 2 hidroxidecanoato	13.24	13.3	13.27	<b>13.27</b>	0.042	0.320
3	12.0	Me. dodecanoato	14.59	14.66	14.62	<b>14.62</b>	0.035	0.240
4	13.0	Me. Tridecanoato	15.67	15.94	15.9	<b>15.90</b>	0.035	0.221
5	20H12.0	Me. 2 hidroxidodecanoato	16.01	16.09	16.04	<b>16.05</b>	0.040	0.252
6	30H12.0	Me. 3 hidroxidodecanoato	16.32	16.39	16.35	<b>16.35</b>	0.035	0.215
7	14.0	Me. Tetradecanoato	17.08	17.16	17.12	<b>17.12</b>	0.040	0.234
8	i15.0	Me. 13 metil tetradecanoato	17.84	17.91	17.87	<b>17.87</b>	0.035	0.196
9	a15.0	Me. 12 metil tetradecanoato	17.94	18.01	17.96	<b>17.97</b>	0.036	0.201
10	15.0	Me. Pentadecanoato	18.24	18.32	18.27	<b>18.28</b>	0.040	0.221
11	20H14.0	Me. 2 hidroxitetradecanoato	18.41	18.49	18.44	<b>18.45</b>	0.040	0.219
12	30H14.0	Me. 2 hidroxitetradecanoato	18.69	18.76	18.72	<b>18.72</b>	0.035	0.188
13	i16.0	Me. 14 metil pentadecanoato	18.96	19.04	18.99	<b>19.00</b>	0.040	0.213
14	16.1 <sup>9</sup>	Me. Cis-9-hexadecanoato	19.11	19.19	19.14	<b>19.15</b>	0.040	0.211
15	16.0	Me. Hexadecanoato	19.35	19.42	19.37	<b>19.38</b>	0.036	0.186
16	i17.0	Me. 15 metil hexadecanoato	20.03	20.1	20.05	<b>20.06</b>	0.036	0.180
17	17.0cy	Me. Cis9,10 metil hexadecanoato	20.25	20.33	20.28	<b>20.29</b>	0.040	0.199
18	17.0	Me. Heptadecanoato	20.4	20.48	20.43	<b>20.44</b>	0.040	0.198
19	20H16.0	Me. 2 hidroxihexadecanoato	20.58	20.66	20.61	<b>20.62</b>	0.040	0.196
20	18.2 <sup>9,12</sup>	Me. Cis 9,12 octadecadienoato	21.06	21.13	21.08	<b>21.09</b>	0.036	0.171
21	18.1 <sup>9</sup>	Me. cis 9 octadecenoato	21.15	21.22	21.17	<b>21.18</b>	0.036	0.170
22	18.1 <sup>9</sup>	Me. Trans 9 octadecenoato	21.21	21.28	21.23	<b>21.24</b>	0.036	0.170
23	18.0	Me. Octadecanoato	21.41	21.49	21.43	<b>21.44</b>	0.042	0.194
24	19.0cy	Me. Cis 9,10 metileno octadecanoato	22.2	22.29	22.24	<b>22.24</b>	0.045	0.203
25	19.0	Me. Nonadecanoato	22.36	22.45	22.4	<b>22.40</b>	0.045	0.201
26	20.0	Me. Eicosanoato	23.3	23.37	23.32	<b>23.33</b>	0.036	0.155
27	22.0	Me. Eicododacainato (Behénico)	25.38	25.39	25.38	<b>25.38</b>	0.006	0.023
28	24.0	Me. Eicotertainato (Lignocérico)	27.72	27.71	27.72	<b>27.72</b>	0.006	0.021

Tabla 5A. Tiempos de retención, áreas bajo la curva y concentración para las diferentes cantidades de muestra.

10 mg

Ácido	TR	bajo curva	% área	conc.	bajo curva	% área	conc.	conc. prom	DS	% variación
16:1w9c	19.1	35809	5.34	0.1050	22463	6.30	0.1346	0.1198	0.02	17.47
16:00	19.37	55309	8.25	0.1622	34344	9.63	0.2059	0.1840	0.03	16.76
17:0cy	20.21	3245	0.48	0.0095	2000	0.56	0.0120	0.0108	0.00	16.24
18:1w9t	21.23	89531	13.35	0.2626	54332	15.24	0.3257	0.2941	0.04	15.16
21.62	21.62	9406	1.40	0.0276	6152	1.73	0.0369	0.0322	0.01	20.37
19:0cy	22.23	15109	2.25	0.0443	10664	2.99	0.0639	0.0541	0.01	25.61
23.5	23.5	8650	1.29	0.0254	6451	1.81	0.0387	0.0320	0.01	29.36
22:0	23.53	47978	7.15	0.1407	21563	6.05	0.1292	0.1350	0.01	6.01
24:0	25.19	405690	60.49	1.1899	198536	55.69	1.1900	1.1899	0.00	0.01
		670727	100.00		356505	100.00				

20 mg

Ácido	TR	bajo curva	% área	conc.	bajo curva	% área	conc.	conc. prom	DS	% variación
16:1w9c	19.02	63971	8.77	0.2479	79645	8.17	0.2310	0.2395	0.01	4.98
16:00	19.26	33619	4.61	0.1303	42281	4.34	0.1226	0.1265	0.01	4.27
17:0cy	20.12	6739	0.92	0.0261	8906	0.91	0.0258	0.0260	0.00	0.77
18:1w9t	21.16	127734	17.51	0.4950	177772	18.24	0.5157	0.5053	0.01	2.89
21.53	21.53	7600	1.04	0.0295	9331	0.96	0.0271	0.0283	0.00	5.97
19:0cy	22.15	27306	3.74	0.1058	41549	4.26	0.1205	0.1132	0.01	9.19
23.5	23.5	8785	1.20	0.0340	11944	1.23	0.0346	0.0343	0.00	1.24
22:0	23.44	146582	20.10	0.5680	192792	19.78	0.5592	0.5636	0.01	1.10
24:0	25.3	307086	42.10	1.1900	410253	42.10	1.1900	1.1900	0.00	0.00
		729422	100.00		974473	100.00				

30 mg

Ácido	TR	bajo curva	% área	conc.	bajo curva	% área	conc.	conc. prom	DS	% variación
16:1w9c	19.02	8696	5.90	0.0967	12254	1.73	0.0274	0.0621	0.05	78.89
16:00	19.26	7579	5.15	0.0843	25680	3.62	0.0575	0.0709	0.02	26.69
17:0cy	20.12	2000	1.36	0.0222	17218	2.43	0.0386	0.0304	0.01	37.96
18:1w9t	21.16	20058	13.62	0.2231	75518	10.65	0.1691	0.1961	0.04	19.44
21.53	21.53	2000	1.36	0.0222	32859	4.63	0.0736	0.0479	0.04	75.78
19:0cy	22.15	4098	2.78	0.0456	17249	2.43	0.0386	0.0421	0.00	11.65
23.5	23.5	2000	1.36	0.0222	6138	0.87	0.0137	0.0180	0.01	33.38
22:0	25.2	39735	26.97	0.4419	218477	30.81	0.4894	0.4656	0.03	7.21
24:0	25.3	61139	41.51	0.6799	303605	42.82	0.6800	0.6800	0.00	0.01
		147305	100.00		708998	100.00				

40 mg

Ácido	TR	bajo curva	% área	conc.	bajo curva	% área	conc.	conc. prom	DS	% variación
16:1w9c	19.02	6590	5.66	0.0792	6472	9.68	0.2762	0.1777	0.14	78.40
16:00	19.26	6491	5.58	0.0780	6649	9.94	0.2838	0.1809	0.15	80.44
17:0cy	20.12	0	0.00	0.0000	0	0.00	0.0000	0.0000	0.00	0.00
18:1w9t	21.16	17464	15.01	0.2099	15999	23.92	0.6828	0.4463	0.33	74.92
21.53	21.53	5584	4.80	0.0671	4903	7.33	0.2093	0.1382	0.10	72.74
19:0cy	22.15	2782	2.39	0.0334	2329	3.48	0.0994	0.0664	0.05	70.23
23.5	23.5	4874	4.19	0.0586	3615	5.40	0.1543	0.1064	0.07	63.59
22:0	25.2	15967	13.73	0.1919	10991	16.43	0.4691	0.3305	0.20	59.31
24:0	25.3	56580	48.64	0.6800	15931	23.82	0.6799	0.6799	0.00	0.00
		116332	100.00		66889	100.00				

50 mg

Ácido	TR	bajo curva	% área	conc.	bajo curva	% área	conc.	conc. prom	DS	% variación
16:1w9c	19.02	27907	9.84	0.1546	22749	6.20	0.1139	0.1342	0.03	21.47
16:00	19.26	34716	12.24	0.1923	39116	10.66	0.1958	0.1940	0.00	1.25
17:0cy	20.12	2706	0.95	0.0150	4992	1.36	0.0250	0.0200	0.01	35.35
18:1w9t	21.16	52428	18.49	0.2904	53714	14.64	0.2688	0.2796	0.02	5.47
21.53	21.53	9150	3.23	0.0507	11343	3.09	0.0568	0.0537	0.00	8.00
19:0cy	22.15	13113	4.62	0.0726	75516	20.58	0.3779	0.2253	0.22	95.82
23.5	23.5	8109	2.86	0.0449	11090	3.02	0.0555	0.0502	0.01	14.90
22:0	25.2	12666	4.47	0.0702	12638	3.44	0.0632	0.0667	0.00	7.33
24:0	25.3	122746	43.29	0.6800	135866	37.02	0.6800	0.6800	0.00	0.00
		283541	100.00		367024	100.00				

TR: Tiempo de retención (min); % área: porcentaje de área; bajo curva: área bajo la curva; Conc.: concentración (mg/mL); conc. prom: Concentración promedio (mg/mL); DS: Desviación estándar; % variación: porcentaje de variación.

Tabla 6A. Datos de la cinética inicial de consumo de sustrato

Tiempo	COT(mg/L)
0	159.11
0.25	153.11
0.41	146.11
0.74	135.11
1.75	121.11
6.05	88.11
10.05	61.11
18.05	54.97
25.96	34.19
32.11	29.52

Tabla 7A Datos de la cinéticas de consumo de sustrato después del ayuno

Tiempo	Inicial 1	24h ayuno	36h ayuno	48h ayuno
0.00	125.00	110.94	116.43	109.80
0.25	119.40			
0.33		114.84	106.33	122.70
0.58	112.00			
0.66			106.33	122.70
0.91	101.00			
0.99		108.74	101.03	123.60
1.32		86.64	79.03	
1.65				121.20
2.66	65.89			
2.80				86.20
3.32		45.54	40.31	
5.99	31.00			
7.06				47.20
7.32		26.54	25.33	
9.99	27.80			
11.06				38.60
11.32		30.36	18.00	
13.99	21.69			
15.06				31.88
15.32		18.61	10.03	
17.99	20.86			
19.29				19.70
19.32		17.54	10.98	
21.99	20.00			
23.32			14.14	
23.52				19.70
27.32		18.16		

Tiempo de cinética en minutos, COT en mg/L.

Tabla 8A. Tiempos de retención, áreas bajo la curva, concentración para las diferentes tiempos de ayuno.

cero horas ayuno										
Acido	TR	bajo curva	% área	conc.	bajo curva	% área	conc.	conc. prom	DS	% variación
16:1w9c	19.02	62359	7.98	0.1387	149845	7.57	0.1286	0.1336	0.01	5.36
16:00	19.26	99365	12.72	0.2210	248975	12.58	0.2136	0.2173	0.01	2.40
17:0cy	20.12	7985	1.02	0.0178	16895	0.85	0.0145	0.0161	0.00	14.31
18:1w9t	21.16	123568	15.82	0.2748	310000	15.66	0.2660	0.2704	0.01	2.31
21.53	21.53	7985	1.02	0.0178	20356	1.03	0.0175	0.0176	0.00	1.18
19:0cy	22.15	29306	3.75	0.0652	68956	3.48	0.0592	0.0622	0.00	6.84
23.5	23.5	8956	1.15	0.0199	23569	1.19	0.0202	0.0201	0.00	1.07
22:0	23.44	135895	17.40	0.3023	348563	17.61	0.2991	0.3007	0.00	0.75
24:0	25.3	305689	39.14	0.6799	792568	40.03	0.6801	0.6800	0.00	0.02
		781108	100.00		1979727	100.00				

24h ayuno

Acido	TR	bajo curva	% área	conc.	bajo curva	% área	conc.	conc. prom	DS	% variación
12:0	14.46	69576	11.76	0.1269	33746	10.93	0.1200	0.1234	0.00	3.95
14:0	17.04	3013	0.51	0.0055	2000	0.65	0.0071	0.0063	0.00	18.14
i15:0	17.8	13277	2.24	0.0242	7890	2.56	0.0281	0.0261	0.00	10.40
a15:0	17.9	13811	2.33	0.0252	8279	2.68	0.0294	0.0273	0.00	11.01
16:1w9c	19.06	7030	1.19	0.0128	4168	1.35	0.0148	0.0138	0.00	10.23
16:00	19.33	33830	5.72	0.0617	20793	6.74	0.0739	0.0678	0.01	12.76
17:0cy	20.24	36684	6.20	0.0669	21373	6.92	0.0760	0.0715	0.01	9.00
18:1w9c	21.16	15925	2.69	0.0290	8302	2.69	0.0295	0.0293	0.00	1.16
19:0cy	22.21	12060	2.04	0.0220	5544	1.80	0.0197	0.0209	0.00	7.73
22:0	25.12	13767	2.33	0.0251	5350	1.73	0.0190	0.0221	0.00	19.49
24:0	27.66	372848	63.00	0.6800	191228	61.95	0.6800	0.6800	0.00	0.00
		591821	100.00		308673	100.00				

36h ayuno

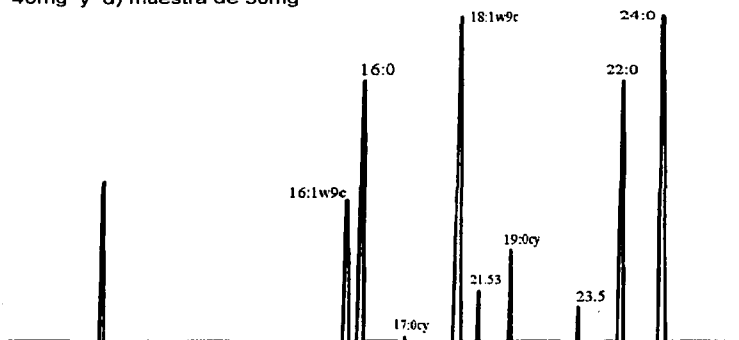
Acido	TR	bajo curva	% área	conc.	bajo curva	% área	conc.	conc. prom	DS	% variación
12:0	14.46	19731	8.74	0.0913	19731	8.74	0.0913	0.0913	0.00	0.00
14:0	17.04	11404	5.05	0.0527	11404	5.05	0.0527	0.0527	0.00	0.00
i15:0	17.8	2774	1.23	0.0128	2774	1.23	0.0128	0.0128	0.00	0.00
a15:0	17.9	3597	1.59	0.0166	3597	1.59	0.0166	0.0166	0.00	0.00
16:1w9c	19.06	2000	0.89	0.0093	2000	0.89	0.0093	0.0093	0.00	0.00
16:00	19.33	2000	0.89	0.0093	2000	0.89	0.0093	0.0093	0.00	0.00
17:0cy	20.24	3929	1.74	0.0182	3929	1.74	0.0182	0.0182	0.00	0.00
18:1w9c	21.16	6225	2.76	0.0288	6225	2.76	0.0288	0.0288	0.00	0.00
19:0cy	22.21	3191	1.41	0.0148	3191	1.41	0.0148	0.0148	0.00	0.00
22:0	25.12	23858	10.57	0.1103	23858	10.57	0.1103	0.1103	0.00	0.00
24:0	27.66	147026	65.13	0.6800	147026	65.13	0.6800	0.6800	0.00	0.00
		225735	100.00		225735					

48h ayuno

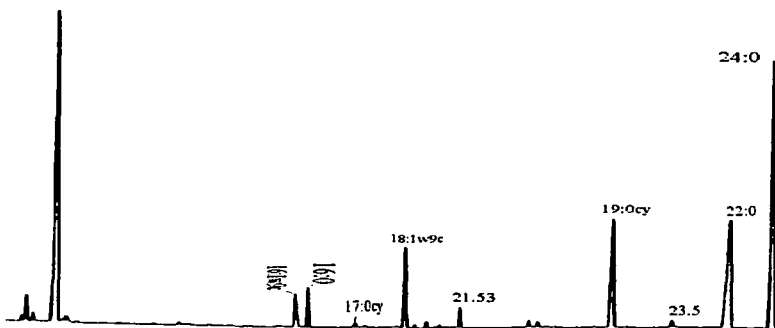
Acido	TR	bajo curva	% área	conc.	bajo curva	% área	conc.	conc. prom	DS	% variación
12:0	14.46	559695	35.34	0.4824	621759	38.24	0.5527	0.5176	0.05	9.60
14:0	17.04	2000	0.13	0.0017	2000	0.12	0.0018	0.0018	0.00	2.18
i15:0	17.8	2000	0.13	0.0017	2000	0.12	0.0018	0.0018	0.00	2.18
a15:0	17.9	2000	0.13	0.0017	2000	0.12	0.0018	0.0018	0.00	2.18
16:1w9c	19.06	2000	0.13	0.0017	2000	0.12	0.0018	0.0018	0.00	2.18
16:00	19.33	34653	2.19	0.0299	37112	2.28	0.0330	0.0314	0.00	7.02
17:0cy	20.24	2000	0.13	0.0017	2000	0.12	0.0018	0.0018	0.00	2.18
18:1w9c	21.16	19126	1.21	0.0165	17784	1.09	0.0158	0.0161	0.00	2.96
19:0cy	22.21	2873	0.18	0.0025	2749	0.17	0.0024	0.0025	0.00	0.94
22:0	25.12	168493	10.64	0.1452	171471	10.55	0.1524	0.1488	0.01	3.42
24:0	27.66	788956	49.81	0.6801	764912	47.05	0.6800	0.6800	0.00	0.01
		1583796	100.00		1625787	100.00				

TR: Tiempo de retención (min); % área: porcentaje de área; bajo curva: área bajo la curva; Conc.: concentración (mg/mL); conc. prom: Concentración promedio (mg/mL); DS: Desviación estándar; % variación: porcentaje de variación.

Figuras 17. Perfiles cromatográficos de AGC para *P. aeruginosa* a diferentes cantidades de muestra: a) muestra de 10mg, b) muestra de 30mg c) muestra de 40mg y d) muestra de 50mg



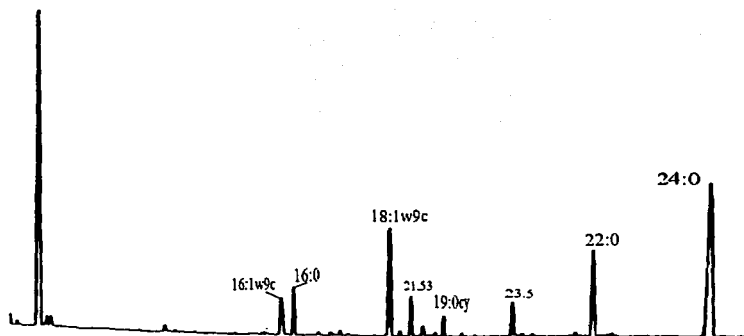
a) muestra de 10mg



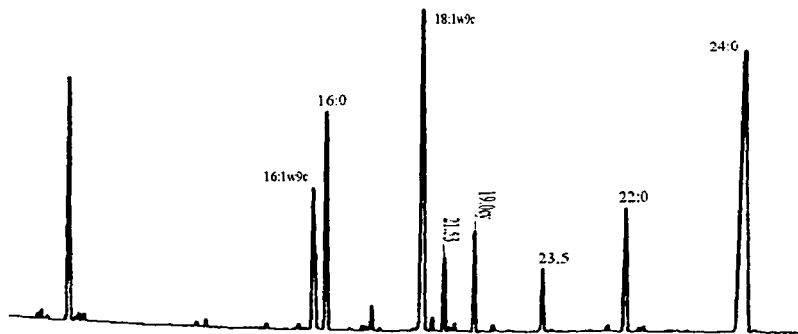
b) muestra de 30 mg

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN





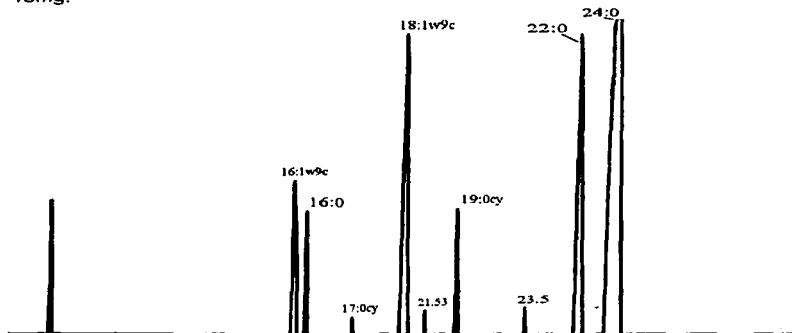
c) muestra de 40 mg



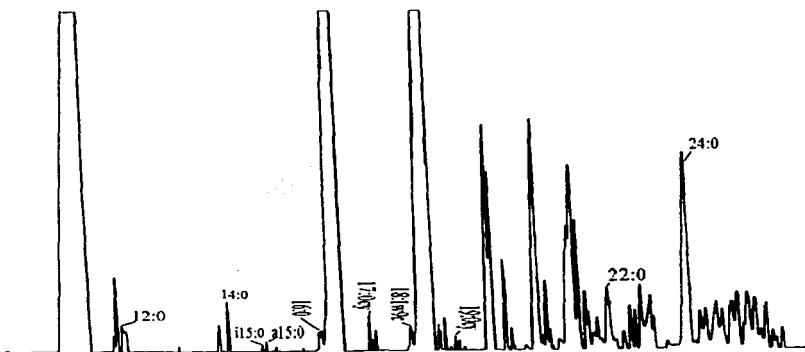
d) muestra de 50 mg

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

Figuras 18. Perfiles cromatográficos de AGC para *P. aeruginosa* a diferentes tiempos de ayuno: a) muestra de 0h de ayuno, b) muestra de 36h y c) muestra de 48mg.

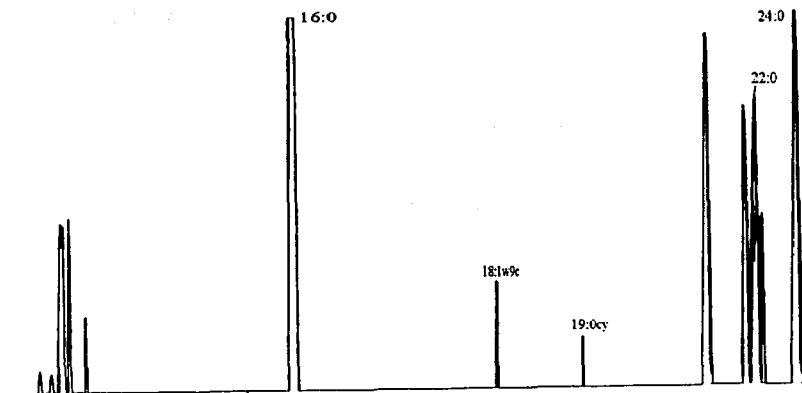


a) muestra de 0h de ayuno



b) muestra de 36h de ayuno

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



c) muestra de 48h de ayuno

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**