



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**
Instituto de Ecología

CARACTERIZACIÓN DE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS
DE LOS SISTEMAS DE TRATAMIENTO DE AGUAS
RESIDUALES POR MEDIO DEL ANÁLISIS DEL PERFIL DE
ÁCIDOS GRASOS CELULARES

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A
M. EN C. MARIBEL QUEZADA CRUZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. GERMÁN BUITRÓN MÉNDEZ

MÉXICO, D.F.

Agosto, 2007



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.

APOYOS RECIBIDOS

Se agradece al Posgrado en Ciencias Biológicas por todo el apoyo otorgado para la realización del presente trabajo de Doctorado.

Este trabajo fue desarrollado en el Grupo de Investigación: Tratamiento Biológico de Aguas Residuales Industriales de la Coordinación de Bioprocesos Ambientales del Instituto de Ingeniería de la UNAM:

Se agradece el apoyo proporcionado por CONACyT a través del proyecto “Degradación de compuestos recalcitrantes presentes en aguas residuales por medio de un biorreactor con membranas automatizado” (proyecto 46093 Y).

Se agradece a CONACyT y DGEP la beca otorgada para la realización de los estudios de Doctorado.

Se agradece a los integrantes del Jurado por sus recomendaciones y apoyo

Dr. Germán Buitrón Méndez

Dra. Luz María López Marín

Dra. Yolanda López Vidal

Dr. Víctor Manual Luna Pabello

Dr. Alfonso Lugo Vázquez

Dr. Pedro Ramírez García

Dra. María Teresa Orta Ledesma

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Germán Buitrón Méndez: Gracias Dr. Porque el éxito que tengo ahora es gracias a sus consejos y sus regaños. Gracias por enseñarme a trabajar bien. Para usted mi respeto y mi admiración.

A ti Gloria (Glo): Gracias por compartir tantas experiencias conmigo. Si a alguien le debo parte de lo que soy, es a ti Glo. Te agradezco por que siempre estuviste pendiente de mi y me apoyaste incondicionalmente. Cuenta conmigo para lo quieras.

A Isaura Yáñez y Erika por toda su ayuda técnica, por el tiempo y la paciencia que me dedicaron.

A Lucy y Adriana porque siempre han sido buenas amigas (saben que ocupan una parte de mi corazón). A mis amigas Alma y Silvana, porque siempre me escucharon y apoyaron. Gracias por estar conmigo en una etapa difícil de mi vida.

A Rafael Machado porque su tesis ayudó a entender parte de este trabajo.

Al Biól. Rafael Serrano Velásquez: Gracias Rafa por todo tu apoyo y por convencerme para continuar con mi doctorado y mi titulación. Gracias por ser como eres.

Al M. en C. Raúl Galicia García: Gracias por compartir conmigo tu tiempo y conocimientos. Gracias por tu apoyo incondicional y por tus consejos que me inyectaron fuerzas para titularme. Espero que nuestros sueños en el ambito profesional se cumplan, por lo tanto cuenta conmigo incondicionalmente.

A la M. V. Z. Adriana Garulo Fuentes: Gracias Adry por tu apoyo y por esa calidad humana que siempre has mantenido. Gracias por ser mujer y entender que en esta vida las mujeres somos importantes y capaces de hacer cualquier cosa. Gracias por CREER EN MÍ.

DEDICATORIAS

A las personitas más importantes en mi vida:

A JESUCRISTO: Te dedico mi doctorado porque gracias a ti soy inmensamente feliz, porque estoy llena de paz y amor. Todo esto te lo debo a ti. Gracias por ser la luz de mi camino y de mi hogar. Que este trabajo sea una muestra de lo poderoso que eres.

A MI ESPOSO ANDY: Al único amor de mi vida. A la persona más importante, que hay en este mundo, para mí. Te dedico mi doctorado y todo lo bueno que puede venir con él. Gracias por dejarme crecer tanto como he querido. Gracias por tu amor incondicional y por enseñarme que debemos luchar por lo que queremos. Andy TE AMO.

A MI HIJA MARIBEL (TOTUGUITA): Porque eres la razón de mi vida, por que eres lo mejor que me ha pasado en la vida. Gracias por ser parte de mi vida. Gracias porque te veo y mi corazón siente paz, alegría y muchas ganas de seguir superandome.

A MIS PADRES Rafael Quezada Carmona y Catalina Cruz García: Les dedico mi doctorado porque gracias a ustedes soy una persona buena y humana. Todos sus desvelos y sufrimientos se los recompensaré como hasta ahora lo he hecho. Papitos los quiero muchisimo.

A mi tía Cristy: Te dedico todo mi trabajo porque tú fuiste el ejemplo que siempre quise seguir. Recuerda que tu sobrina Maribel te quiero mucho y siempre te admirará.

A mi tía Chuy y a toda su familia: Les dedico mi trabajo y les agradezco su calidad humana, gracias por apoyarme siempre y desearme todo lo bueno. Gracias tía Chuy porque tus conocimientos y tu seguridad nos ayudan a superarnos.

ÍNDICE GENERAL

	Págs.
ÍNDICE GENERAL.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
ÍNDICE DE TABLAS.....	VII
NOMENCLATURA.....	VIII
ABSTRACT.....	1
RESUMEN.....	3
INTRODUCCIÓN.....	5
OBJETIVOS.....	7
Objetivo general.....	7
Objetivos específicos.....	7
Hipótesis.....	7

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 Lípidos en la célula bacteriana.....	8
1.1.1 Ácidos Grasos en la célula bacteriana.....	9
1.1.2 Nomenclatura de los Ácidos Grasos Celulares (AGC).....	10
1.2 Técnicas utilizadas para la identificación de microorganismos.....	11
1.2.1 Pruebas Bioquímicas Tradicionales	11
1.2.2 Pruebas Bioquímicas comerciales.....	13
1.2.3 Perfiles de proteínas y secuenciación de aminoácidos.....	15
1.2.4 Pruebas moleculares.....	16
1.2.5 Perfil cromatográfico de Ácidos Grasos Celulares.....	21
1.3 Viabilidad de bacterias.....	22
1.3.1 Cuenta Heterótrofa en Placa (CHP).....	22
1.3.2 Citometría de flujo.....	23
1.4 Sistemas biológicos de tratamiento de aguas.....	26
1.4.1 Reactores aerobios.....	28
1.4.2 Reactores anaerobios.....	29
1.4.3 Reactor discontinuo secuencial.....	30

1.4.3.1 Etapas del sistema SBR.....	31
1.4.3.2 Ventajas del sistema SBR.....	32

CAPÍTULO II

ANTECEDENTES

2.1 Perfil cromatográfico de AGC para la identificación de microorganismos.....	34
2.1.1 Perfil de AGC para la identificación de cepas puras.....	34
2.1.2 Perfil de AGC para la identificación de comunidades de microorganismos.	34
2.1.3 AGC biomarcadores de estrés por ayuno.....	37
2.2 Estudios realizados de la microbiología del tratamiento de aguas en el Instituto de Ingeniería de la UNAM.....	39
2.2.1 Estudios relacionados con la identificación de bacterias.....	39
2.2.2 Estudios relacionados con el ayuno y viabilidad de las bacterias.....	40

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

3.1 Estrategia experimental para obtener la metodología de los AGC biomarcadores	41
3.2 Obtención de AGC biomarcadores.....	42
3.2.1 Bacterias presentes en los sistemas de tratamiento de aguas residuales (revisión bibliográfica).....	42
3.2.2 Análisis cualitativo de los datos obtenidos.....	42
3.2.3 Análisis cuantitativo (Análisis de Componentes Principales, ACP).....	42
3.3 Técnicas para determinar AGC.....	42
3.3.1 Técnica de Muñoz <i>et al.</i> (1997).....	42
3.3.2 Técnica MIDI, Sherlock (Sasser, 2001).....	44
3.4 Validación de la metodología de los AGC biomarcadores.....	46
3.4.1 Confirmación de AGC biomarcadores en cepas puras.....	46
3.4.2 Confirmación de AGC biomarcadores en mezclas de bacterias “doble ciego”.....	46

	Págs.
3.5 Factores a considerar en la metodología de los AGC biomarcadores	49
3.5.1 Sensibilidad de la metodología de los AGC biomarcadores.....	49
3.5.2 Influencia del ayuno en el perfil cromatográfico de AGC de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145.....	50
3.5.2.1 Crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145.....	50
3.5.2.2 Determinación del perfil de AGC después del ayuno.....	50
3.5.2.3 Viabilidad de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> por CHP y citometría de flujo.....	51
3.6 Aplicación de la metodología de los AGC biomarcadores	51
3.6.1 Plantas de tratamiento aerobias.....	51
3.6.2 Plantas de tratamiento anaerobias.....	52
3.6.3 Sistema SBR alimentado con paranitrofenol.....	52
3.6.4 Sistema SBR alimentado con mezcla de fenoles.....	54
3.7 Técnicas analíticas	53
3.7.1 Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV).....	53
3.7.2 Carbono Orgánico Total (COT)	53
3.7.3 Cuenta Heterótrofa en Placa (CHP).....	54
3.7.4 Citometría de flujo.....	54
3.7.5 Turbiedad.....	54
3.7.6 Identificación de bacterias.....	54
3.7.7 Espectroscopía de masas.....	55

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Obtención de Ácidos Grasos Celulares Biomarcadores	57
4.1.1 Revisión bibliográfica de las bacterias presentes en sistemas de tratamiento de aguas residuales.....	57
4.1.1.1 Análisis cualitativo.....	57
4.1.1.2 Análisis cuantitativo (ACP).....	59

	Págs.
4.2 Técnicas para determinar AGC	64
4.2.1 Técnica de Muñoz <i>et. al.</i> (1997).....	64
4.2.2 Técnica MIDI, Sherlock (Sasser, 2001).....	67
4.3 Validación de la metodología de los AGC biomarcadores	70
4.3.1 Confirmación de AGC biomarcadores en cepas puras.....	70
4.3.2 Confirmación de AGC biomarcadores en mezclas de bacterias “doble ciego”.....	74
4.4 Factores a considerar en la metodología de los AGC biomarcadores	75
4.4.1 Sensibilidad de la metodología de los AGC biomarcadores.....	76
4.4.2 Influencia del ayuno en el perfil cromatográfico de AGC de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145.....	81
4.4.2.1 Análisis del perfil cromatográfico de <i>P. aeruginosa</i>	81
4.4.2.2. Comportamiento de los AGC durante el ayuno.....	82
4.4.2.3 Relación trans/cis en <i>P. aeruginosa</i> durante el ayuno.....	82
4.4.2.4 Viabilidad de <i>P. aeruginosa</i> después del ayuno.....	86
4.5 Aplicación de la metodología de los AGC biomarcadores	91
4.5.1 Plantas de tratamiento aerobias...-.....	91
4.5.2 Plantas de tratamiento anaerobias.....	92
4.5.3 Sistema SBR alimentado con paranitrofenol.....	94
4.5.4 Sistema SBR alimentado con una mezcla de fenoles.....	99
CONCLUSIONES.....	106
RECOMENDACIONES.....	107
BIBLIOGRAFÍA.....	109
PUBLICACIONES DERIVADAS DEL DOCTORADO.....	120
ANEXOS.....	121

ÍNDICE DE FIGURAS

Págs.

CAPÍTULO I

1-1. Lípido presente en una membrana celular.....	8
1-2. Estructura de la membrana celular.....	9
1-3. Estructura de ácidos grasos.....	10
1-4. Ejemplo de caracterización metabólicas de bacterias (Tortora <i>et al.</i> , 1998).....	12
1-5. Técnicas utilizadas en biología molecular para determinar estructura de las comunidades.....	18
1-6. Diagrama de un citómetro de flujo.....	25
1-7. Etapas que constituyen un ciclo del proceso SBR.....	33

CAPÍTULO III

3-1. Diagrama de flujo de la estrategia experimental.....	41
3-2. Diagrama de flujo de la técnica MIDI, Sherlock (Sasser, 2001).....	47
3-3. Sistema de aeración utilizado para el crecimiento de <i>P. aeruginosa</i>	50

CAPÍTULO IV

4-1. Grupos de AGC formados por el ACP	60
4-2. Eigenvalores obtenidos por el ACP al analizar los AGC.....	62
4-3. Eigenvalores obtenidos por el ACP al analizar las bacterias.....	62
4-4. AGC presentes en cada grupo formado por el ACP.....	63
4-5. Perfil cromatográfico de AGC en <i>Mycobacterium</i> (MIDI, Sherlock 2001).....	66
4-6. Perfil cromatográfico de AGC en <i>Mycobacterium</i> (Muñoz <i>et al.</i> , 1997).....	66
4-7. Perfil cromatográfico de <i>P. aeruginosa</i> (Técnica Muñoz <i>et al.</i> , 1997).....	67
4-8. Perfil cromatográfico de <i>P. aeruginosa</i> (Técnica MIDI, Sherlock).....	68
4-9. Perfil cromatográfico de AGC de <i>P. aeruginosa</i> (bacteria aerobia).....	70
4-10. Perfil cromatográfico de AGC de <i>Acinetobacter</i> (bacteria aerobia).....	71
4-11. Perfil cromatográfico de AGC de <i>E. coli</i> (bacteria facultativa).....	72
4-12. Perfil cromatográfico de AGC de <i>Klebsiella pneumoniae</i> (bacteria facultativa).....	72
4-13. Perfil cromatográfico de AGC de <i>Bacillus licheniformis</i> (bacteria anaerobia).....	73

	Págs.
4-14. Perfil cromatográfico de AGC de <i>Clostridium</i> (bacteria anaerobia).....	73
4-15. Perfil cromatográfico de AGC de la mezcla 1.....	74
4-16. Perfil cromatográfico de AGC de la mezcla 2.....	75
4-17. Perfil cromatográfico de AGC de <i>Proteus mirabilis</i> (50 mg de muestra).....	76
4-18. Perfil cromatográfico de AGC de <i>Salmonella enteritidis</i> (50 mg de muestra).....	77
4-19. Perfil cromatográfico de AGC de <i>Acinetobacter</i> (50 mg de muestra).....	77
4-20. Perfil cromatográfico de AGC de <i>Clostridium</i> (50 mg de muestra).....	78
4-21. Perfil cromatográfico de AGC de <i>Micrococcus luteus</i> (50 mg de muestra).....	78
4-22. Perfil cromatográfico de AGC de <i>Proteus mirabilis</i> (30 mg de muestra).....	80
4-23. Perfil cromatográfico de AGC de <i>Clostridium</i> (20 mg de muestra).....	80
4-24. Perfil cromatográfico de AGC de <i>P. aeruginosa</i> (Cero días de ayuno).....	81
4-25. AGC saturados después de los ayunos en <i>P. aeruginosa</i>	83
4-26. AGC con grupos hidroxilo y ciclopropanos de <i>P. aeruginosa</i> en ayuno.....	83
4-27. Relación trans/cis de los ácidos de 16 y 18 carbonos de <i>P. aeruginosa</i> en ayuno.	85
4-28. Cinética de consumo de sustrato de <i>P. aeruginosa</i> . 300 mg/l de biomasa y 0.8 ml/min de flujo de aire.....	87
4-29. Comportamiento de la viabilidad obtenida a partir de la CHP.....	89
4-30. UFC y velocidad de degradación en <i>P. aeruginosa</i> en ayuno.....	90
4-31. Porcentaje de células vivas, muertas y con la membrana permeable.....	90
4-32. Perfil cromatográfico de la planta de tratamiento "Cerro de la estrella".....	91
4-33. Perfil cromatográfico de la planta de tratamiento de una industria cervecera.....	92
4-34. Perfil cromatográfico de AGC del reactor alimentado con paranitrofenol (tiempo cero).....	94
4-35. Comportamiento de los AGC de 16 y 18 carbonos durante la aclimatación al paranitrofenol.....	95
4-36. Comportamiento de los AGC hidroxilo y ramificados durante la aclimatación al Paranitrofenol.....	96
4-37. Comportamiento de la relación trans/cis de los AGC de 16 y 18 carbonos durante la aclimatación al paranitrofenol.....	97
4-38. Comportamiento de los AGC biomarcadores en el sistema alimentado con paranitrofenol.....	98
4-39. Perfil cromatográfico de AGC (reactor alimentado con mezcla de fenoles).....	100

	Págs.
4-40. Perfil cromatográfico de la biomasa suspendida del reactor alimentado con mezcla de fenoles (20 días de operación).....	101
4-41 . Perfil cromatográfico de la biomasa fija al empaque del sistema alimentado con mezcla de fenoles (145 días de operación).....	102
4-42. Distribución de las comunidades bacterianas en el sistema alimentado con la mezcla de fenoles.....	103

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO II

2-1. Ácidos Grasos encontrados con frecuencia en distintos grupos de microorganismos	35
--	----

CAPÍTULO III

3-1. Cepas puras utilizadas en el presente estudio.....	48
3-2. Mezcla de bacterias (doble ciego).....	49
3-3. Características de las plantas de tratamiento aerobias.....	51
3-4. Características de las plantas de tratamiento anaerobias.....	52

CAPÍTULO IV

4-1. AG biomarcadores obtenidos del análisis de la literatura.....	58
4-2. AGC biomarcadores encontrados en cepas puras.....	69
4-3. Porcentaje de AGC biomarcadores con respecto a la cantidad de muestra utilizada.	79
4-4. Velocidad de consumo de sustrato después del ayuno en <i>P. aeruginosa</i>	87
4-5. Porcentaje de AGC biomarcadores en sistemas de tratamiento de aguas residuales	93
4-6. Cantidad (mg/ml) de AGC biomarcadores del reactor alimentado con una mezcla de fenoles.....	102

ABSTRACT

In this work a methodology was proposed to identify bacterium groups present in wastewater treatment system. This methodology is about the study of Cellular Fatty Acid (CFA) profiles. A bibliographic research of bacteria in wastewater treatment systems was performed. Afterwards, the CFA chromatographic profiles of each bacterium were researched and statistical analyzed, (Principal Component Analysis PCA) was carried out to construct a database with CFA biomarkers for aerobic, facultative aerobic and anaerobic bacteria. Also this CFA biomarker methodology was validated, to which biomarker presence in 16 different bacteria was confirmed and two unknown bacterium mixtures were identified. This study allowed to obtain CFA biomarkers of aerobic (2OH12:0 and 2OH12:0), facultative aerobic (2OH14:0 and 3OH14:0) and anaerobic bacteria (i17:0).

Two factors were studied that could have influence on the CFA biomarker methodology, the sample amount and starvation (without food) to be studied. Because these factors could have influence on the quantity and CFA type, and consequently in the bacterium group identification. With respect to the sample amount, the results showed the appropriate sample amount that must be obtained from the extract to inject to the chromatograph profile of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 1014 to 0, 1, 2, 3 and 5 starvation days were determined. The results showed the CFA biomarkers decreased their quantity but they did not disappear. The trans/cis ratio of the 16-carbon and 18-carbon acids was affected by the starvation. So, the trans/cis ratio increased 0.23 to 1.47 for the acid 16:1w9 and 0.14 to 0.71 for the acid 18:1w9 from zero to five starvation days respectively. In order to conclude, starvation did not have influence during the identification of bacterium groups by means of the CFA biomarkers methodology.

The methodology application proposed for CFA biomarkers was determined the identification of bacterium groups in samples from wastewater treatment plants (aerobic and anaerobic) and SBR systems fed with synthetic effluents were identified. The acclimation in SBR systems fed with p-nitrophenol and in a SBR system fed with phenol mixture with attached and suspended biomass, were researched. The results showed the CFA-biomarker methodology allowed to observe the bacterium community structure in different wastewater treatment plants, since the CFA bacterial are relation with their electron acceptors. Also, it permitted to observe the variation in the bacterium

community by the acclimation of the SBR system fed with p-nitrophenol, thus it was possible to observe the amount of aerobic and aerobic facultative bacteria decreased while the amount of anaerobic bacteria increased. With respect to the SBR system fed with phenols mixture. This methodology allowed to relate the bacterial CFA with the colonization of the support. The methodology permitted to observe the way that aerobic, aerobic facultative and anaerobic bacteria can adhere in the support by acclimation to the toxicant (phenol mixture).

RESUMEN

En el presente trabajo se propone una metodología para la identificación de grupos de bacterias presentes en los sistemas de tratamiento de aguas residuales. La metodología se basa en el estudio del perfil cromatográfico de Ácidos Grasos Celulares (AGC). Para lo anterior, se realizó una búsqueda bibliográfica de las bacterias presentes en los sistemas de tratamiento de aguas residuales. Posteriormente, se buscaron los perfiles cromatográficos de AGC de cada bacteria y se realizó un análisis estadístico (ACP, Análisis de Componentes Principales) para construir una base de datos con AGC biomarcadores de bacterias aerobias, aerobias facultativas y anaerobias. También, se validó la metodología propuesta de los AGC biomarcadores, para lo cual se confirmó en el laboratorio la presencia de los biomarcadores en 16 bacterias y se identificaron 2 mezclas desconocidas de bacterias (doble ciego). El estudio anterior permitió reconocer los AGC biomarcadores de bacterias aerobias (2OH12:0 y 3OH12:0) y facultativas (2OH14:0 y 3OH14:0) y anaerobias (i17:0). Sin embargo, en el caso de bacterias anaerobias, se tienen AGC que comparten con bacterias facultativas y con el género *Streptomyces*, al cual se le considera bacteria aerobia.

Se estudiaron dos factores que podrían influir en la metodología de los AGC biomarcadores, la cantidad de muestra a tratar y el ayuno (falta de alimento). Esto debido a que son factores que podrían influir en la cantidad y tipo de AGC y por consiguiente en la identificación de los grupos de bacterias. Con respecto a la cantidad de muestra, los resultados mostraron que la cantidad adecuada de muestra que se debe obtener el extracto a inyectar al cromatógrafo se encuentra en un intervalo de 50 a 60 mg. Con respecto a la influencia del ayuno, se determinó el perfil cromatográfico de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 a 0, 1, 2, 3 y 5 días de ayuno. Los resultados mostraron que la cantidad de AGC biomarcadores disminuye pero que no desaparecen los AGC. La relación trans/cis de los ácidos de 16 y 18 carbonos se ve afectada por el ayuno de modo que la relación aumentó de 0.23 a 1.47 para el ácido 16:1 ω 9 y de 0.14 a 0.71 para el ácido 18:1 ω 9 de cero a cinco días de ayuno respectivamente. Con los resultados obtenidos se pudo concluir que el ayuno no influye durante la identificación de grupos de bacterias por medio de la metodología de los AGC biomarcadores.

Se determinó la aplicación de la metodología propuesta de los AGC biomarcadores, para lo cual se identificaron los grupos de bacterias en muestras de plantas de tratamiento de aguas residuales (planta aerobia, anaerobia) y sistemas SBR alimentados con efluentes sintéticos. Se investigó la aclimatación en un sistema SBR alimentado con paranitrofenol y en la biomasa fija y suspendida en los empaques de un sistema SBR alimentado con una mezcla de fenoles. Los resultados mostraron que la metodología de los AGC biomarcadores permitió observar la composición de las comunidades de bacterias en las diferentes plantas de tratamiento. También permitió observar la variación en las comunidades de bacterias durante la aclimatación del sistema SBR alimentado con paranitrofenol, de tal modo que fue posible observar que la cantidad de bacterias aerobias y aerobias facultativas disminuyó durante el periodo de aclimatación del reactor, mientras que la cantidad de bacterias anaerobias aumentó. Con respecto al sistema alimentado con mezcla de fenoles, la metodología de los AGC biomarcadores permitió relacionar los AGC de las bacterias con la colonización del empaque del sistema. La metodología permitió observar la forma en que las bacterias aerobias, aerobias facultativas y anaerobias se adhieren al empaque durante la aclimatación a un tóxico (mezcla de fenoles).

INTRODUCCIÓN

Los sistemas de tratamiento biológico de aguas residuales están constituidas por comunidades de microorganismos. Dichos microorganismos degradan los contaminantes del agua residual para incorporarlos en su metabolismo y generar energía. Muchos investigadores se dedican al estudio de esos microorganismos. Sin embargo, una de sus inquietudes más grandes es la identificación de las bacterias presentes en dichos sistemas de tratamiento, ya que esto permitiría el arranque más rápido y fácil de las plantas de tratamiento, además serviría como una herramienta para conocer las rutas metabólicas que realizan las bacterias para eliminar muchos compuestos tóxicos.

En el Instituto de Ingeniería de la UNAM se han realizado algunos estudios de degradación de compuestos tóxicos como el 4 clorofenol (Soto, 1999), paranitrofenol (Melgoza *et al.*, 2000), 2, 4 dinitrofenol (Juárez, 2000) y colorantes azo (Cruz y Buitrón, 2000; Quezada *et al.*, 2000). Las eficiencias de degradación son buenas (75-100%). Sin embargo, se desconocen muchas de las bacterias que realizan los procesos de degradación.

Para la identificación de bacterias se utilizan técnicas convencionales que incluyen métodos morfológicos microscópicos, tinción Gram y pruebas bioquímicas, entre otras. Dichas técnicas convencionales para identificar microorganismos y algunas que se utilizan para determinar actividad y viabilidad, se realizan con cepas puras. Es decir, es necesario un previo cultivo y aislamiento de los microorganismos. Sin embargo, dichas técnicas únicamente revelan la presencia de los microorganismos que pueden ser cultivados (Vestal y White, 1989) y se ha reportado que únicamente del 0.01 al 12 % de los microorganismos presentes en una muestra ambiental pueden ser cultivados en el laboratorio (Madigan, 1997).

Como resultado de los avances tecnológicos y científicos, se han propuesto otras técnicas para la identificación de microorganismos; tal es el caso del estudio de algunas moléculas como los carbohidratos, lipopolisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos. Algunos autores como Böttger (1996) consideran que el estudio de las secuencias de los ácidos nucleicos y el análisis de los ácidos grasos son dos de los métodos más prometedores y versátiles.

El estudio del perfil de AGC (estructura básica de los lípidos) se ha utilizado para cuantificar biomasa microbiana (Zelles *et al.*, 1994; Bååth *et al.*, 1992 y Werker y Hall, 1998) y determinar la estructura (distribución) de las comunidades de microorganismos en muestras ambientales como suelos contaminados con cloroformo, sedimentos marinos y biofiltros para aire (White *et al.*, 1997; Sundh *et al.*, 1997 y Werker y Hall, 1998). Sin embargo, en los sistemas de tratamiento biológico de aguas residuales son escasos los estudios.

Un ejemplo de los estudios realizados en sistemas para tratamiento de aguas residuales es el de Werker y Hall (1998), quienes realizaron un estudio en dos sistemas empacados para tratar un efluente de una industria de papel. Analizaron el perfil de Ácidos Grasos Fosfolipídicos (AGF) de la biomasa en suspensión y de la que se encontraba formando una biopelícula en el empaque. Los resultados mostraron que ambas comunidades fueron diferentes con un 85 % de variabilidad entre los dos grupos de microorganismos. Sin embargo, esta técnica del estudio del perfil de AGF únicamente permitió observar la presencia de bacterias Gram positivas y negativas.

La identificación de las bacterias se ha efectuado con la ayuda de las técnicas convencionales, por ejemplo Buitrón *et al.*, (1998), al estudiar la degradación de una mezcla de fenoles, pudieron aislar e identificar bacterias del género *Mycobacterium* y algunas bacterias que son aerobias pero que no son actinomicetos. En este caso, el crecimiento de algunos actinomicetos (como las micobacterias), es muy lento por lo que las técnicas convencionales implican mucho tiempo. Quezada *et al.*, 2000 estudiaron la degradación de colorantes azo en un biofiltro empacado con tezontle. Ellos lograron identificar bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Alcaligenes* y *Flavobacterium*, entre otras. Sin embargo, como se dijo anteriormente las técnicas convencionales no permiten la identificación de la totalidad de bacterias presentes.

Debido a las desventajas que presentan las técnicas convencionales y a las ventajas de las técnicas modernas, como la de los AGC, se proponen los siguientes objetivos para el presente trabajo.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evidenciar la aplicabilidad del perfil cromatográfico de ácidos grasos celulares para caracterizar el tipo de comunidad bacteriana presente en sistemas de tratamiento de aguas residuales.

Objetivos específicos:

- 1) Identificar los ácidos grasos celulares biomarcadores de bacterias (aerobias, aerobias facultativas y anaerobias) presentes en sistemas de tratamiento de aguas residuales
- 2) Evaluar el efecto del ayuno en *P. aeruginosa* sobre el perfil cromatográfico de ácidos grasos celulares
- 3) Evaluar la aplicación de la metodología propuesta, basada en los biomarcadores, para la identificación de comunidades en sistemas de tratamiento de aguas residuales

HIPÓTESIS

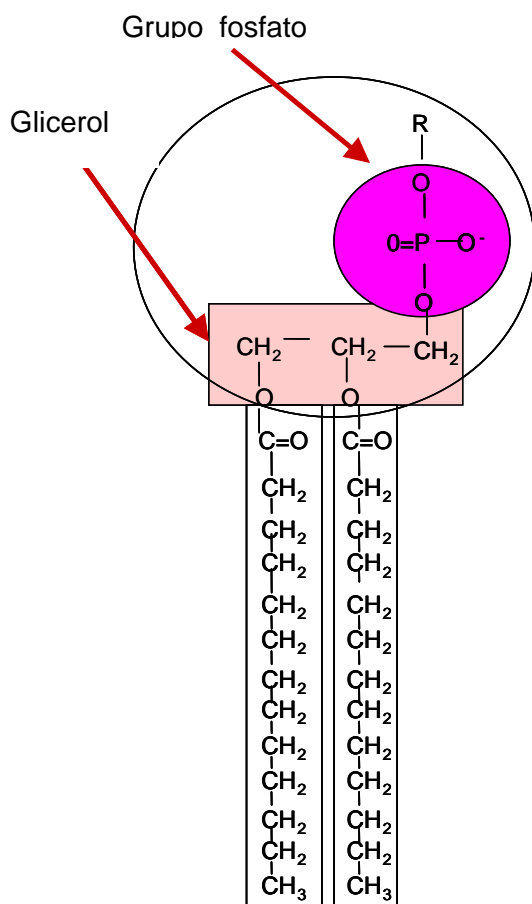
Existe un grupo de ácidos grasos celulares obtenidos a partir de un perfil cromatográfico que pueden utilizarse como biomarcadores para la identificación de bacterias aerobias, aerobias facultativas y anaerobias presentes en sistemas para tratamiento de aguas residuales

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 Lípidos en la célula bacteriana

Los lípidos simples consisten de ácidos grasos unidos al alcohol glicerol. También son llamados triglicéridos porque 3 moléculas de ácidos grasos están unidos a una molécula de glicerol (Madigan *et al.*, 1997; Lehninger, 1985).



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

Figura 1-1. Lípido presente en una membrana celular

1.1.1 Ácidos Grasos en la célula bacteriana

Los principales lípidos que forman las membranas son los fosfolípidos, los cuales tienen una región hidrofóbica y una hidrofílica (Figura 1-2). La región hidrofílica es el grupo fosfato y el glicerol mientras que la región hidrofóbica es la representada por los ácidos grasos (Caldwell, 1995).

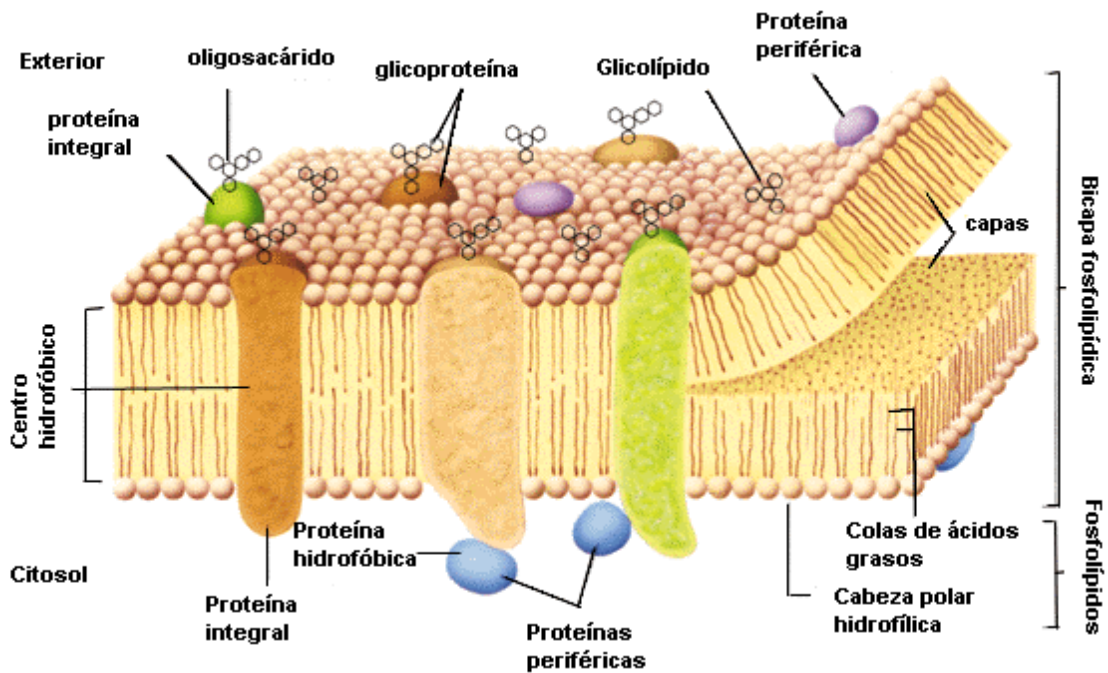


Figura 1-2. Estructura de la membrana celular

El contenido de ácidos grasos de la mayoría de las especies de bacterias se encuentra distribuido 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 (Stainer *et al.*, 1986). Pueden ser saturados o no saturados y el precursor de dichos ácidos grasos es la acetil coenzima A (Gottschalk, 1986).

1.1.2 Nomenclatura de los Ácidos Grasos Celulares (AGC)

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 (Figura 1-3).

Ácido graso	Estructura	Tipo de ácido graso
12:0	$\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_{10} \text{CO.OH}$	Saturado
16:1 ω 7	$\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_5 \text{CH}=\text{CH} (\text{CH}_2)_7 \text{CO.OH}$	Insaturado
i15:0	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \text{ CH}_2 (\text{CH}_2)_{10} \text{CO.OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	Ramificado (con grupo Iso)
3OH10:0	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \text{ CH}_2 \text{ CH} (\text{CH})_6 \text{CO.OH} \\ \\ \text{OH} \end{array}$	Hidroxi
10ME16:0 metilo)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 (\text{CH}_2)_8 \text{ CH} (\text{CH})_5 \text{CO.OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	Ramificado (con grupo metilo)
15:0cy	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \text{ CH} \text{ CH} (\text{CH}_2)_{10} \text{CO.OH} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{H} \quad \text{H} \end{array}$	Ciclopropano
16:1 ω 7c	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 (\text{CH}_2) \text{C}=\text{C} (\text{CH}_2)_7 \text{CO.OH} \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{H} \end{array}$	Forma cis
16:1 ω 7t	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 (\text{CH}_2) \text{C}=\text{C} (\text{CH}_2)_7 \text{CO.OH} \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{H} \end{array}$	Forma trans

Figura 1-3 Estructuras de ácidos grasos

El grado de insaturación es seguido por un número que indica la posición del doble enlace más cercano al carboxilo final (Δ), o en pocos casos el más cerca del alifático final (ω). Los prefijos a, i, cy y d se refieren a ácidos grasos con ramificaciones anteiso, iso, ciclopropil y dicarboxílicos respectivamente. Las letras br indican que el tipo de

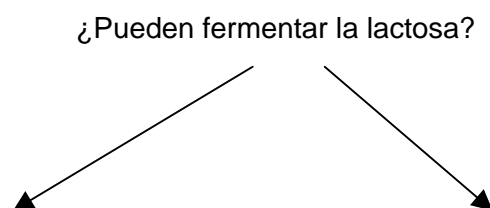
ramificación es desconocida, mientras que un número seguido de ME indica la posición de un grupo metilo. Los prefijos α y β indican que el grupo OH se localiza en la posición 2 y 3 respectivamente. Una letra "c" indica un ácido graso en forma cis y una "t" indica una forma trans (Welch, 1991; Zelles, 1999).

1.2 Técnicas utilizadas para la identificación de microorganismos

1.2.1 Pruebas Bioquímicas Tradicionales

Estas pruebas utilizan las características metabólicas de las bacterias para su identificación. En las pruebas bioquímicas se determina la capacidad de los microorganismos para utilizar diferentes sustratos, sus características oxidativas y/o fermentativas, así como su capacidad para producir metabolitos específicos. Para ello se emplean diferentes sustratos y se determina cualitativamente la desaparición del sustrato o la aparición de productos. Esta determinación se hace por observación directa o mediante la adición de algún compuesto químico o revelador.

La entrada y salida de las sustancias químicas, son procesos comunes a todas las células, pero los distintos tipos de células y microorganismos difieren en los tipos de metabolitos que generan y los productos de desecho que liberan. Estas diferencias son el resultado de los distintos sistemas enzimáticos que posee cada microorganismo. Algunas de las pruebas utilizadas para la identificación de microorganismos son: la prueba de la oxidasa, catalasa, coagulasa, motilidad indol ornitina, triple azúcar hierro, citrato, indol, urea, rojo de metilo y voges-proskawer, entre otras (Ramírez-Gama *et al.*, 1996). En la Figura 1-4 se pueden observar algunos ejemplos de estas pruebas



La técnica de NMP también se utiliza para identificar grupos de bacterias fermentativas, hidrogenofílicas, acetoclásticas, OHPA butirótrofas, OHPA propionótrofas y sulfatorreductoras.

Para su determinación se inocula la muestra en medio reducido especial para bacterias anaerobias (en una cámara anaerobia) y se preparan múltiples series de diluciones decrecientes. Las bacterias OHPAb, OHPAp, acetoclásticas e hidrogenofílicas se incuban a 35-37°C durante 45 días y las fermentativas y sulfatorreductoras durante 7 días. Se procede a determinar si cada tubo es positivo (crecimiento bacteriano) o negativo (no presentan crecimiento bacteriano). La lectura positiva significa que al menos un microorganismo estaba presente en la alícuota utilizada para la inoculación. Considerando la teoría de la probabilidad y resolviendo una ecuación matemática, el número más probable de bacterias se localiza en una tabla llamada de McGrady (Hungate, 1969). La técnica es muy laboriosa y necesita periodos de incubación de 24 a 48 horas. Además, en ocasiones no es muy exacta. Sin embargo, se pueden identificar grupos de bacterias que con otras técnicas no se puede.

En suelos también se utiliza la técnica del NMP para identificación de bacterias nitrificantes. La técnica consiste en poner 10 g de suelo húmedo en medio para NMP que contiene algunos elementos como K, Na, Mg, Ca, F, Mo, Mn, Zn, Cu y Co. Se pone en agitación por 24 horas a 20 °C. Posteriormente, se toman 0.25 ml de la suspensión y se adicionan a una caja con 2.25 ml de medio con amonio o nitrato y se ponen a incubar a 25 °C durante dos meses. La oxidación del amonio se revisa utilizando un indicador azul de bromotimol y la oxidación del nitrato se determinó utilizando reactivos de Griess Ilosvay (Boll *et. al.*, 2002).

1.2.2 Pruebas Bioquímicas Comerciales

Sistema API (Analytical Profile Index): En el mercado se encuentran algunas pruebas bioquímicas para la identificación rápida de bacterias, como un ejemplo se tiene el Sistema API. El cual es un sistema que sirve para la identificación de enterobacterias y otras bacterias Gram negativas principalmente, aunque también es aplicable para bacterias Gram positivas (API 20 E, 1990).

La técnica se basa en el metabolismo de las bacterias y consta de 21 pruebas bioquímicas, 20 son miniaturizadas y estandarizadas; la otra prueba (oxidasa) se

realiza de manera separada adicionando un reactivo para determinar la presencia de la enzima oxidasa. Cada prueba se realiza en microtubos que contienen medios específicos deshidratados, estos medios son reconstituidos adicionando una suspensión celular. El sistema consta de 20 pruebas sobre los siguientes sustratos (incluidos en los microtubos del sistema API): ONPG (o-nitrofenol- β -D-galactósido), ADH (arginina), LDC (lisina), ODC (ornitina), CIT (citrate sódico), H₂S (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). El sistema tiene una prueba adicional que se realiza por separado, llamada oxidasa; esta prueba se lleva a cabo adicionando el reactivo de Kovac. Si la muestra aparece de un color púrpura oscuro se considera oxidasa positiva. Según las instrucciones que acompañan al producto, con las 21 pruebas se forman siete grupos ordenados de tres. Al final se obtiene un código que proviene de la condensación de 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 (cero para reacciones negativas) da el correspondiente dígito con un valor entre 0 y 7. Los códigos obtenidos se comparan con los que se encuentran en el Manual Bio Mérieux API para determinar el tipo de microorganismo presente (API 20 E, 1990).

Algunas variantes del sistema API son: El sistema Micro Scan y BBL entre otros. Estos se utilizan para identificar bacterias aerobias y facultativas y el fundamento es el mismo que el del sistema API. El sistema BBL cristal (Becton, Dickinson and Company, 2000) es una prueba que ya se encuentra de forma comercial, consta de placas con medios deshidratados que se incuban durante 18-24 horas a 35-37 °C. Después de la incubación las placas se leen con luz blanca y ultravioleta. Se obtiene un número de 10 dígitos (número de perfil) que se introduce a una base de datos (libro electrónico de códigos para el sistema BBL cristal) para la identificación. Este sistema se utilizó para identificar cepas anaerobias como la de *Bacillus* (Becton, Dickinson and Company, 2000).

Prueba Biolog: Es un sistema automatizado para la identificación de microorganismos. La técnica se basa en el patrón de utilización de sustratos (actividad metabólica

aerobia) (Ibekwe y Kennedy, 1998; Garland, 1996; Zack *et al.*, 1994; Fang *et al.*, 2001).

Las cajas contienen 95 fuentes de carbono y un blanco sin sustrato, cada sustrato tiene un colorante el cual es susceptible de ser reducido por el NADH producido en las rutas respiratorias de las bacterias. Se incuban las cajas a 25 °C y se lee la absorbancia a 405 nm.

El sistema Biolog no se puede utilizar para cuantificar biomasa pero puede detectar variaciones considerables de la capacidad para metabolizar los diferentes sustratos y se pueden identificar bacterias Gram negativas y positivas. Sin embargo, se menciona que la técnica únicamente refleja la actividad de una cierta porción de la comunidad (Ibekwe y Kennedy, 1998; Garland, 1996; Zack *et al.*, 1994; Fang *et al.*, 2001).

1.2.3 Perfiles de proteínas y secuenciación de aminoácidos

Todas las proteínas son moléculas que tienen secuencias específicas de aminoácidos y tienen una forma particular con una variedad de cargas en la superficie, lo cual permite diferenciar células u organismos. Sin embargo, las variaciones en la cantidad de proteínas en células hace que esta técnica sea difícil de aplicar en organismos multicelulares (Black, 1996). Las células de cada especie sintetizan un arreglo único de proteínas (como una huella). Por lo que el análisis de los perfiles de una o más proteínas de diferentes especies de bacterias permiten realizar comparaciones entre ellas (Black, 1996).

Las muestras de proteína se obtienen de las células que son lisadas con detergente. Una vez obtenidas las proteínas se colocan en una placa con gel de poliacrilamida, que se inserta en una cámara llena de buffer y una corriente es pasada a través del gel por un determinado periodo. En el gel se separan las proteínas de acuerdo con su peso molecular (Black, 1996).

También la determinación de la secuencia de aminoácidos permite obtener similitudes y diferencias entre los microorganismos. Por ejemplo las proteínas como los citocromos, que intervienen en el metabolismo oxidativo, son comúnmente utilizados para estudiar secuencias de aminoácidos en microorganismos (Black, 1996).

1.2.4 Pruebas moleculares

Actualmente la aplicación de la biología molecular permite la identificación de microorganismos patógenos como bacterias (Noordhoek *et al.*, 1996; Toze, 1999), así como la determinación de la diversidad de microorganismos presentes en muestras ambientales (Raskin *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1996; Godon *et al.*, 1997; Wintzingerode *et al.*, 1997; Manz *et al.*, 1998; Amann *et al.*, 1997; Spring *et al.*, 2000; McDonal y Brözel, 2000). La ventaja de utilizar dichas técnicas es que permiten el estudio de los microorganismos sin previo cultivo y aislamiento (Wintzingerode *et al.*, 1997; Amann *et al.*, 1995; Godon *et al.*, 1997; Milcic-Terzic y Saval, 2000; Lee *et al.*, 1999).

a) Contenido de Guanina –Citosina (G-C)

Es una técnica ampliamente utilizada por los taxónomos porque permite observar relaciones entre especies. La composición de bases es usualmente expresada como el porcentaje de Guanina más Citosina (G-C). Se ha encontrado que el contenido de G-C en bacterias varía de 23-75 % (Tortora *et al.*, 1998; Black, 1996).

También se ha observado que ciertas especies de bacterias como *Clostridium tetani* y *Staphylococcus aureus* tienen una composición G-C muy similar pero que *P. aeruginosa* tiene una composición muy diferente. Así que, *C. tetani* y *S. aureus* probablemente están estrechamente relacionadas (Black, 1996).

Se ha observado que la mayoría del ADN extraído de un suelo cultivado presenta un porcentaje G-C de 55-73%, que incluye géneros como *Alcaligenes* (G-C= 59-64 %), *Arthrobacter* (G-C= 63-69 %) y *Pseudomonas* (G-C= 58-66%).

b) Secuenciación del ARNr 16S

La técnica molecular en la que se estudia el Ácido Ribonucleico (ARN) de la subunidad pequeña (16S) de los ribosomas, permite el análisis completo de la diversidad microbiana, esto debido a que son estructuras que presentan regiones con secuencias altamente conservadas y otras con alta variabilidad e hipervariabilidad. Para propósitos de identificación se utilizan las regiones hipervariables por la relativamente alta diferencia entre especies pero relativamente baja variabilidad dentro de una misma especie (Böttger, 1996). En la mayoría de las bacterias, la longitud del ácido, en la subunidad pequeña de los ribosomas, es de alrededor de 1,500 nucleótidos y a esta subunidad se le llama 16S (basado en su velocidad de sedimentación) (Tortora *et al.*, 1998).

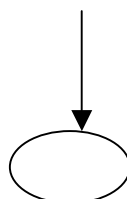
c) Clonación al azar y secuenciación

Con este método se puede determinar la diversidad microbiana en suelo, agua y lodo (Godon *et al.*, 1997). También se pueden determinar grupos de poblaciones por medio de primers específicos. La clonación es el aislamiento e incorporación de un fragmento de ADN dentro de un vector (Madigan *et al.*, 1999). Tradicionalmente se utilizan vectores como plásmidos o bacteriófagos de *E. coli* para realizar el clonaje (Wintzingerode *et al.*, 1997). Cada secuencia correspondiente a un clon se compara con las secuencias disponibles en la base de datos que se encuentra en internet.

Actualmente se usan dos estrategias para aislar genes de ARNr del total de los ácidos nucleicos para conocer la diversidad de las comunidades en muestras ambientales (Figura 1-5). Una de ellas consiste en clonar fragmentos al azar de ADN de la muestra ambiental y analizar aquellos que contienen genes de ARNr. La otra estrategia para estudiar el ARNr se lleva a cabo por medio de una extracción directa del ARNr para posteriormente transcribirlo a ADN por medio de una transcriptasa reversa. Como la cantidad de Ácido Desoxirribonucleico (ADN) clonado que contiene genes de ARNr es pequeña, el segundo paso, casi obligado, es la utilización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (por sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction, PCR) para amplificar este ARNr. Como el ARNr está altamente conservado en la naturaleza, se utilizan primers universales para los tres dominios de organismos (eucariotas, bacterias y arqueas).

Una vez que el ADN de muestras ambientales se amplifica por PCR, los diferentes grupos amplificados deben ser separados para distinguir cada uno de ellos. Existen diferentes técnicas para realizar la separación de los grupos amplificados (Figura 1-5), entre ellas están la electroforesis en gel por gradiente desnaturizante o térmico (Denaturing/Thermal Gradient Gel Electrophoresis, DGGE, TGGE), Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP), Polimorfismo de Conformación de Hebra Simple (Single Strand Conformation Polymorphism, SSCP), Análisis del Espacio Intergénico Ribosomal (Ribosomal Intergenic Spacer Analysis, RISA) y ADN Polimórfico Amplificado al Azar (Random Amplified Polymorphism DNA, RAPD).

MUESTRA AMBIENTAL



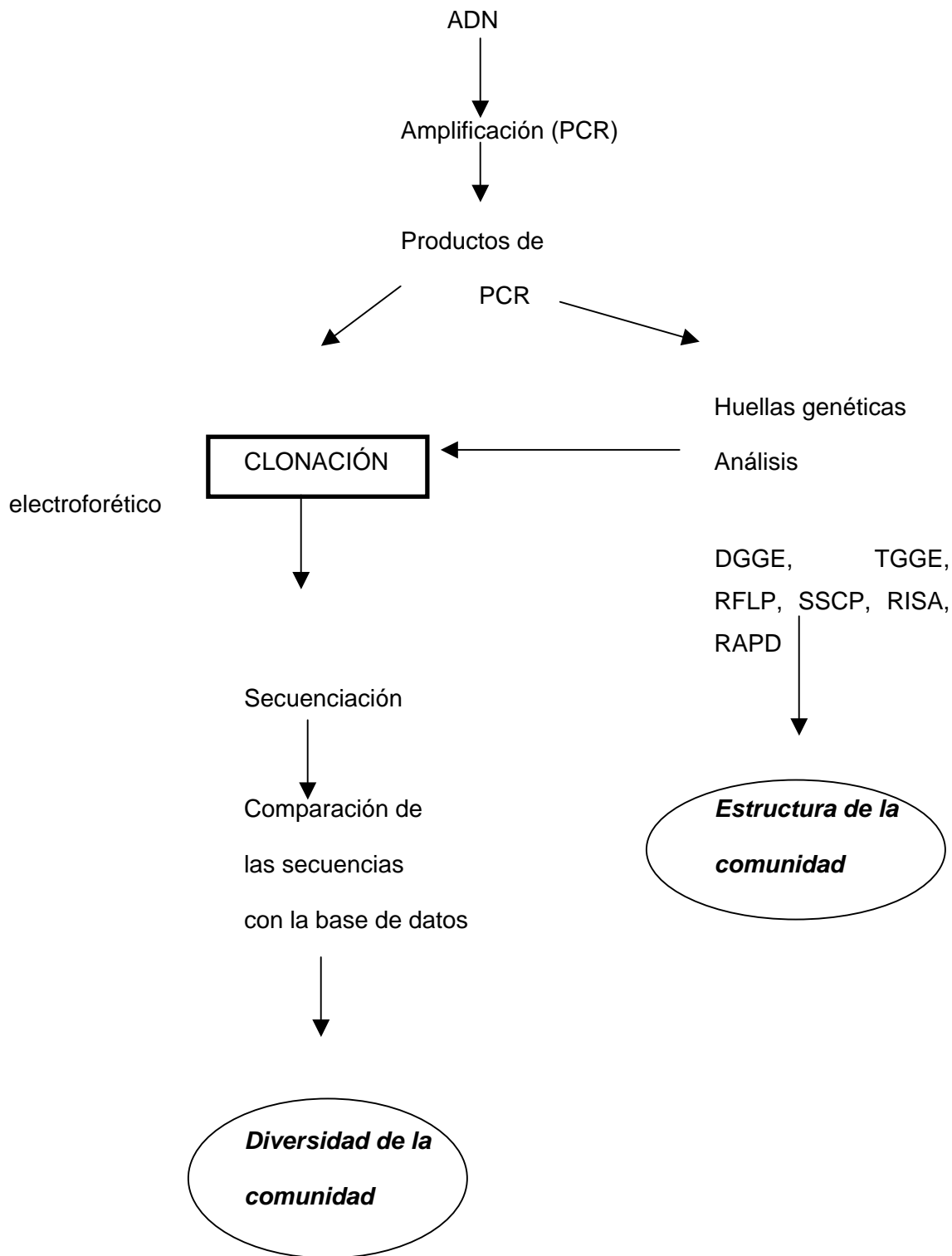


Figura 1-5. Técnicas utilizadas en biología molecular para determinar estructura de las comunidades

d) Electroforesis en gel por gradiente desnaturizante o térmico (DGGE y TGGE)

Es la separación por electroforesis en un gradiente de gel desnaturizante o térmico. En los dos métodos se realiza una separación de los fragmentos de ADN amplificados. Dicha separación se realiza por los cambios conformacionales de las moléculas de

ADN, que se dan por un gradiente lineal de desnaturizante (DGGE) o de temperatura (TGGE). De tal modo que los fragmentos de ADN disminuyen su movilidad electroforética y detienen su migración a diferentes posiciones en el gel (Giraffa y Neviani, 2001; Ranjard *et al.*, 2000).

e) Polimorfismo de Conformación de Hebra Simple (SSCP)

Es el método llamado de Polimorfismo de Conformación de Hebra Simple, en la cual se amplifica la región variable del gen ADNr 16S por lo que se estudia una hebra. La técnica esta basada en la diferencia de movilidad de los fragmentos de ADN de acuerdo con su tamaño y estructura secundaria. Dicha conformación y estructura secundaria depende del fenómeno de plegado de la hebra simple de la molécula de ADN. El análisis requiere una electroforesis uniforme a baja temperatura y sin gradiente desnaturizante (Giraffa y Neviani, 2001).

El método SSCP tiene algunas aplicaciones como por ejemplo, se ha utilizado para monitorear la evolución de las comunidades microbianas dentro de un reactor utilizado para elevar su capacidad de remoción de fósforo (Giraffa y Neviani, 2001) y para estudiar la diferencia entre poblaciones bacterianas de un lago oligotrófico y de una laguna eutrófica (Lee *et al.*, 1996). Además, permite la identificación de poblaciones específicas dentro de una comunidad (Ranjard *et al.*, 2000).

f) Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP)

El RFLP se realiza a partir de cualquier gen amplificado para producir secuencias de diferentes tamaños. Se aísla el ADN y se utilizan enzimas de restricción que cortan el ADN en múltiples fragmentos de diferentes longitudes. Puesto que muchos de esos fragmentos no corresponden a la región que se pretende estudiar, generalmente se utiliza una sonda para que se lleve a cabo una hibridación. Cada fragmento es separado en geles de agarosa o poliacrilamida (Ranjard *et al.*, 2000; Giraffa y Neviani, 2001).

Existen algunas variaciones del RFLP como el Análisis de Restricción de ADN Ribosómico Amplificado (Amplified ARDRA Ribosomal DNA Restriction Analysis) y el Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos de Restricción por Temperatura (Termal – restriction fragment length polymorphis T-RFLP), en el cual se utiliza un primer fluorescente en el extremo 5' durante la PCR (Giraffa y Neviani, 2001; Ranjard *et al.*, 2000).

La técnica se ha utilizado para demostrar cambios en la estructura genética de comunidades de bacterias que son expuestas a cambios ambientales o a compuestos tóxicos (Giraffa y Neviani, 2001).

g) ADN Polimórfico Amplificado al Azar (RAPD).

En este método se amplifica por PCR una región de ADN escogido de manera arbitraria mediante un primer pequeño (generalmente de 10 nucleótidos). En una misma molécula de ADN, el primer se puede fijar en múltiples sitios, ya que la sonda es corta. Por lo tanto, los fragmentos de ADN amplificados presentan diferentes longitudes (polimorfismo de longitud). Los diferentes fragmentos de ADN se separan en gel de agarosa o acrilamida (Giraffa y Neviani, 2001; Ranjar *et al.*, 2000).

h) Análisis del Espacio Intergénico Ribosomal (RISA)

En este método se analiza el espacio que se encuentra entre la subunidad 16S y 23S de los ribosomas, la cual varía de 50 pb a más de 1.5 kb dependiendo de la especie.

g) Hibridación *In Situ* Fluorescente (Fluorescence *In Situ* Hybridization, FISH).

En el FISH se fija la muestra ambiental en paraformaldehído y posteriormente se inmovilizan las células (generalmente con teflón). Después se hace una hibridación *in situ* con una sonda fluorescente. Las muestras se observan en un microscopio de epifluorescencia (Poulsen *et al.*, 1993) o en un microscopio láser de barrido confocal (Lee *et al.*, 1999; McDonald y Brözel, 2000), el cual permite realizar observaciones en tres dimensiones. También se puede utilizar otro tipo de microscopía como la citometría de flujo, la cual permite observar características morfológicas y fisiológicas de los microorganismos (Amann *et al.*, 1990).

El FISH se ha utilizado para analizar la abundancia y organización espacial de bacterias sulfatorreductoras en lodos activados (Manz *et al.*, 1998), la estructura de biopelículas de sistemas de tratamiento de aguas residuales (McDonald y Brözel, 2000) y la actividad de las biopelículas (Poulsen *et al.*, 1993).

Algunas técnicas modernas como las pruebas de ácidos nucleicos con el blanco RNAr marcado con fluorescencia han permitido el estudio de microorganismos en su hábitat natural (Amann *et al.*, 1997; Spring *et al.*, 2000; Rabus *et al.*, 1996; Poulsen *et al.*,

1993; Lee *et al.*, 1999), en especial bacterias en biopelículas (McDonald y Brözel, 2000) y bacterias metanogénicas (Raskin *et al.*, 1994).

1.2.5 Perfil cromatográfico de Ácidos Grasos Celulares

La determinación del perfil cromatográfico de Ácidos Grasos Celulares (AGC) permite la identificación de microorganismos en cultivos puros o en muestras ambientales. El método comercial llamado Sherlock Microbial Identification System (sistema MIDI) es un sistema analítico automatizado que puede identificar bacterias en base a su perfil único de AGC (Sasser, 2001). Únicamente se utiliza para identificar cepas puras y los pasos que se deben realizar son los siguientes: se cultivan los microorganismos en un medio adecuado para su crecimiento. Se incuban durante 24h (bacterias aerobias) o 48h (bacterias anaerobias). Posteriormente, se realiza una saponificación, metilación y extracción. La muestra se pasa a un cromatógrafo de gases y se obtiene su perfil cromatográfico de AGC. Los picos de cada ácido graso se comparan con una base de datos (Sasser, 2001).

Aun cuando éste método permite la identificación de muchas bacterias, es necesario su cultivo y su aislamiento. Sin embargo, se han realizado algunos estudios en los que se analizan las muestras *in situ* (sin previo cultivo y aislamiento) y se han observado algunas diferencias en el perfil cromatográfico de AGC (Bossio *et al.*, 1998).

La técnica del perfil cromatográfico de Ácidos Grasos Celulares presenta algunas ventajas:

- a) Los Ácidos Grasos (AG) son moléculas que se encuentran en todas las membranas celulares de las bacterias (Tortora *et al.*, 1998).
- b) Los AG se encuentran en cantidades constantes. Por lo tanto, si existen cambios en estas cantidades se puede determinar viabilidad y actividad de los microorganismos (Vestal y White, 1989).
- c) La presencia y cantidad de los AG son constantes para cada especie particular de bacterias (Böttger, 1996).
- d) Es una técnica que no necesita cultivos puros, es sencilla y de alta sensibilidad.
- e) En pocos días se pueden tener datos cualitativos y cuantitativos (McNair, 1981). En contraste con la técnica de secuenciación de RNAr, en la cual se obtienen únicamente datos cualitativos (Böttger, 1996).

- f) La cromatografía de gases (CG) es ampliamente utilizada debido a la sensibilidad obtenida por equipo. El detector de conductividad térmica puede fácilmente detectar cantidades de microgramos. El detector de ionización de flama detecta nanogramos (10^{-9} g), y los detectores más selectivos como el de captura de electrones y el detector fotométrico de flama alcanzan los picogramos (10^{-12} g) (McNair, 1981; Tunlid y White, 1990). Debido a esta sensibilidad, la CG es un método preferido para el análisis de trazas. Otra ventaja de esta extrema sensibilidad es que se requiere inyectar al cromatógrafo un volumen en el orden de microlitros (McNair, 1981).

1.3 Viabilidad en bacterias

1.3.1 Cuenta Heterótrofa en Placa (CHP)

Una célula viable se define como la que es capaz de dividirse para dar lugar a descendencia y la forma habitual de llevar una cuenta de células viables es determinando el número de células capaces de generar colonias sobre la superficie de un medio sólido.

Hay dos maneras de llevar a cabo la cuenta en placa: por siembra en superficie o por vertido en placa. En la siembra en superficie, se toma 0.1 ml de la dilución apropiada de la muestra y se extiende en toda la superficie del medio utilizando una barra de vidrio doblada y estéril. La placa se incuba a 35 °C hasta que aparezcan las colonias (24-48 horas).

En el método de vertido en placa se mide un volumen de muestra conocido (0.1 – 1.0 ml) en el medio de cultivo fundido previamente y enfriado hasta aproximadamente 40 °C; después de mezclado se vierte rápidamente en una caja petri y se incuba a 35 °C durante 24-48 horas. El organismo que va a ser contado debe resistir temperaturas de 40-45 °C (Madigan *et al.*, 1997).

En los dos métodos, el número de colonias que se desarrollen en las placas, no debe ser muy elevado para poder contar adecuadamente y por otra parte el número de colonias no debe ser muy bajo para que la cuenta tenga significado estadístico. La práctica habitual indica que el número de colonias debe oscilar entre 30 y 300 por placa (Madigan *et al.*, 1997). Normalmente es necesario hacer más de una dilución para obtener un número de colonias apropiado.

1.3.2 Citometría de flujo

La Citometría de Flujo es una técnica de análisis celular multiparamétrico en la que se examinan las propiedades físicas y químicas de las células, microorganismos u otras partículas biológicas. Su fundamento se basa en hacer pasar una suspensión de partículas (generalmente células) alineadas y de una en una por delante de un haz de láser focalizado (Figura 1-6). El impacto de cada célula con el rayo de luz produce señales que corresponden a diferentes parámetros de la célula y que son recogidos por distintos detectores. Estos convierten dichas señales en señales electrónicas que posteriormente serán digitalizadas para permitir la medida simultánea de varios parámetros en una misma célula.

En el momento en que una célula cae de la nariz del citómetro al pasar por el rayo láser, éste le imprime una carga positiva o negativa, luego al llegar a una serie de placas con cargas positivas o negativas, estas placas atraen a las células según su carga y provocan que las células caigan en recipientes diferentes según el desvío que sufren, las células que no reciben ninguna carga durante su paso por el rayo láser, son colocadas en un receptáculo para desechos.

Al realizar las mediciones en el citómetro de flujo, las células pueden estar vivas o fijadas, pero obligadamente en suspensión celular y en forma de célula única. Al obligarlas a pasar alineadas una a una frente a un haz láser mediante un flujo continuo, cada célula, a la vez que dispersa la luz, emite luz fluorescente como consecuencia de la excitación láser a la que es sometida. Los parámetros que típicamente se miden de forma simultánea por cada célula son:

1. Dispersión frontal de la luz a 2° (*forward scatter*), valor proporcional al tamaño celular.
2. Dispersión de la luz ortogonal (*side scatter*), proporcional a la cantidad de estructuras granulares o complejidad de la célula.
3. Intensidades de fluorescencia a diferentes longitudes de onda.

Se puede obtener información sobre: análisis fenotípico, de ADN y cromosómico, estudios funcionales, receptores de superficie, actividad enzimática, permeabilidad de la membrana y flujo de calcio.

El rayo de luz que ha pasado a través de las células es captado por una serie de sistemas ópticos, filtros, transductores electrónicos de señales y un equipo de cómputo que colecta la luz emitida a una longitud de onda específica, estos sensores se encuentran a diferentes ángulos conforme al origen de la fuente de luz (Radcliff y Jeroszeski, 1998).

Los citómetros de flujo están formados por complejos sistemas fluídicos, óptica láser, detectores electrónicos, convertidores analógico-digitales y digitales, y ordenadores. Los sistemas ópticos permiten el enfoque láser en un haz con un diámetro reducido para impactar sobre el menor número de partículas posibles simultáneamente. El sistema fluídico permite un enfoque hidrodinámico del flujo celular hasta conseguir el alineamiento de las partículas o células, y en los separadores celulares o "*cell sorters*", se produce una rotura del flujo en gotas de tamaño uniforme para conseguir la separación de células individuales. El sistema electrónico se encarga de la cuantificación de los destellos de fluorescencia y de la luz dispersada y, bajo el control del ordenador, se consigue la carga electrónica de las gotas que contienen las células de interés para poder someterlas a deflexión y recogerlas en tubos específicos para tal fin, o sobre pocillos de cultivo de tejidos. El ordenador permite almacenar datos de miles de células por cada muestra, y representar los resultados gráficamente.

Los datos del Citómetro de Flujo pueden adquirirse usando un amplificador lineal o logarítmico. El uso del amplificador logarítmico es el indicado para las cuestiones biológicas, donde las distribuciones están desviadas a la derecha. En este caso, el efecto de la amplificación logarítmica normaliza la distribución. El uso de una amplificación logarítmica requiere de un amplio rango de fluorescencia, que puede ser después comprimido, como en muchas otras distribuciones biológicas. La amplificación lineal se usa cuando no se está seguro de la amplitud del rango de los signos, por ejemplo, los análisis de DNA, flujo de calcio, etc. (Radcliff y Jeroszeski, 1998).

Rayos láser y fluorocromos

Existen varios tipos de rayo láser que pueden ser utilizados en los sistemas de citometría de flujo, pero los tipos más comunes son los iones de argón, helio-neón, criptón y láser teñido.

La selección del fluorocromo a utilizar es en función tanto de la aplicación que se le va a dar como de la longitud de onda a la que es excitado dicho fluorocromo. Algunos de los fluorocromos más utilizados son: el yoduro de dihexyloxacarboyanina (DIOC), diacetato de fluoresceína (DAF) y yoduro de propidio (PI).

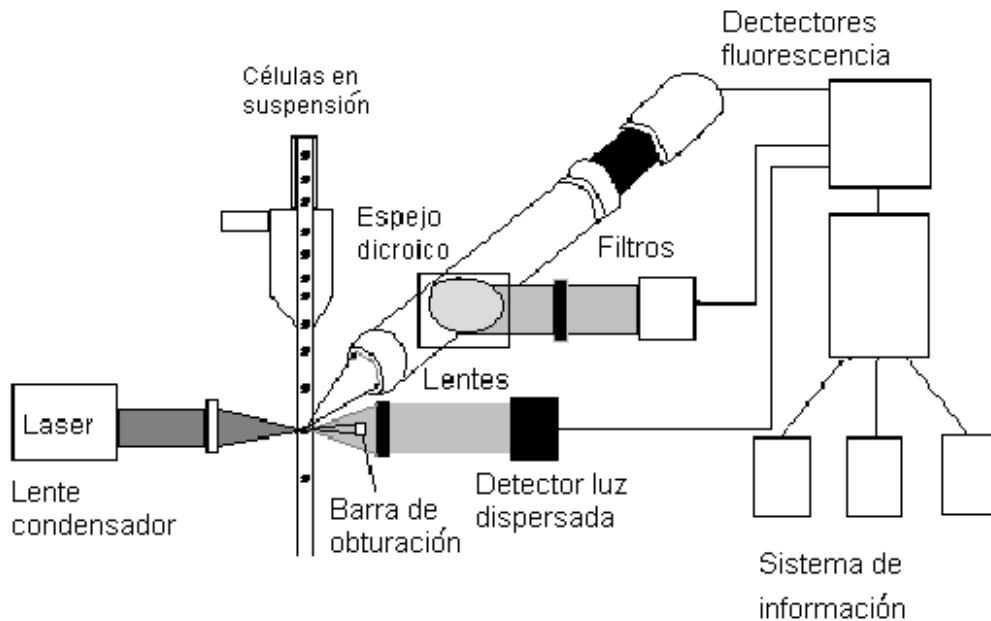


Figura 1-6. Diagrama de un citómetro de flujo

Yoduro de dihexyloxacarboyanina (DIOC). El colorante carbocianina da una medición del potencial transmembranal por su distribución a través de la membrana celular. El potencial de membrana juega un papel crítico en la fisiología de la bacteria. Está íntimamente relacionado en varios procesos tales como: Autólisis bacteriana, transporte de glucosa, quimiotaxis, supervivencia a pH bajo (Novo *et al.*, 1999).

El potencial de membrana es generado por las diferencias en la concentración de iones en lados opuestos de la membrana (fuera de la célula), y son típicamente negativos del orden de -150 mv, con el interior de la célula eléctricamente negativo con respecto al exterior. El potencial de membrana se colapsa (se reduce a cero) cuando se elimina el gradiente de protones a través de la membrana (Tanner y Wellhausen, 1988).

Los colorantes de cianina, son utilizados para la medición del potencial de membrana de las células por medio de un citómetro de flujo. Estos colorantes son lipofílicos con una carga positiva deslocalizada, contienen dos anillos heterocíclicos idénticos pegados por un enlace polymethine (Tanner y Wellhausen, 1988).

Diacetato de fluoresceína: De acuerdo con el estado fisiológico de las células se pueden dividir en vivas y muertas. Las células vivas incluyen aquellas que están metabólicamente activas, las cuales pueden ser viables (con posibilidad de duplicarse) o no viables (pérdida de la viabilidad, es decir, ya no pueden duplicarse). Las células vivas son coloreadas por el diacetato de 5-clorometil fluoresceína (CMFDA) el cual mide la actividad de las esterasas por la hidrólisis de la CMFDA y es comúnmente usada para medir la actividad de la membrana de células intactas.

Yoduro de propidio: El yoduro de propidio es un fluorocromo utilizado para contar células no viables. Es un colorante que entra a las células dañadas y se une a los ácidos nucleicos. Es un agente intercalante, es decir debido a su estructura aromática plana se favorece su inserción entre los pares de bases apareadas del ADN. El yoduro de propidio posee propiedades fluorescentes al ser excitado con luz ultravioleta y emite una fluorescencia intensa de color rojo (Luque y Herráez, 2001).

1.4 Sistemas biológicos de tratamiento de aguas

Los principales objetivos del tratamiento biológico de aguas residuales son transformar los componentes disueltos o partículas biodegradables en productos finales menos complejos o incluso la mineralización de ellos, capturar o incorporar sólidos coloidales suspendidos o no sedimentables en un flóculo o en una biopelícula y, en algunos casos, remover trazas de compuestos orgánicos (Tchobanoglous, 1991).

Los tratamientos biológicos para el tratamiento de aguas residuales pueden ser de cuatro tipos: aerobios, anaerobios, anóxicos y facultativos. Los procesos aerobios son los que requieren oxígeno disuelto; en cambio, en los anaerobios hay ausencia de éste. Los anóxicos se llevan a cabo en presencia de oxígeno combinado (NO_3^- , SO_4^{2-} , etc.). En los procesos facultativos existen poblaciones mixtas, además de que intervienen microorganismos, denominados facultativos, que pueden vivir en presencia o ausencia de oxígeno.

Durante la biodegradación de los contaminantes una parte del sustrato es oxidada para la producción de la energía requerida por los microorganismos para desarrollar sus actividades vitales. La otra parte es sintetizada para formar nuevas células. Al escasear el sustrato la población microbiana entra en la fase de respiración endógena; resultan como productos finales: CO_2 , H_2O , NH_3 y sustancias no biodegradables.

Los procesos biológicos se basan en la utilización, por los microorganismos, de la energía contenida en la materia orgánica contaminante medida como la Demanda Química de Oxígeno (DQO) o como Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO). Una bacteria anaerobia utiliza el 10 % de la energía contenida en su alimento o sustrato para funciones de reproducción, dando origen a nuevas células y el 90% restante lo dirige a la producción de gas metano. Por su parte una bacteria aerobia emplea de 60% a 65% de la energía del sustrato en la síntesis de nuevas células, mientras la fracción restante se utiliza para realizar las funciones metabólicas (Jiménez, 2001).

En función de la forma en que se encuentre la biomasa, los procesos biológicos se clasifican en:

- 1) Sistemas con biomasa suspendida: en estos sistemas los microorganismos se encuentran libres dentro del tanque. Tienen la ventaja de que han sido muy aplicados por lo que fácilmente se encuentra información sobre ellos. El mayor inconveniente es que, frecuentemente, tiene problemas de decantación, por ello los microorganismos se escapan con el efluente. Además requieren de energía para realizar el mezclado del contenido del tanque.
- 2) Sistemas con biomasa fija: en estos sistemas los microorganismos se encuentran adheridos en un soporte. Por regla general tienen menor volumen que los sistemas con biomasa suspendida y producen flóculos con alto grado de sedimentabilidad. Las versiones más modernas de estos procesos son poco aplicados en México (Jiménez, 2001).

1.4.1 Reactores aerobios

Existe buen número de procesos aerobios, los que, a su vez, se subdividen en variantes. En general, pueden agruparse en procesos de tipo extensivo (lagunas), procesos de biomasa en suspensión (lodos activados en sus diversas formas) y procesos de biopelícula (filtros percoladores y disco biológico rotatorio).

Sistemas con biomasa suspendida

Lodos activados. En este sistema se pone en contacto el agua residual con una masa biológica preexistente en un tanque de aeración. La materia orgánica biodegradable contenida en el agua residual es degradada en forma aerobia por microorganismos presentes en los flóculos en sustancias más simples e inocuas para el ambiente.

El influente (agua residual que se va a tratar) entra en el tanque en donde tiene contacto con los microorganismos. El oxígeno necesario es introducido por inyección de aire a presión, o bien, por agitación mecánica, por esta razón a éste se le denomina tanque de aeración. Los objetivos que se buscan al introducir el aire son oxigenar la biomasa y mantenerla en suspensión. Transcurrido cierto tiempo, el líquido conocido como licor mezclado se pasa a un decantador donde la biomasa formada es separada del efluente tratado.

Entre las variantes de lodos activados, las más empleadas son la convencional o de flujo pistón, la completamente mezclada y la aeración extendida. En menor medida se encuentra la estabilización por contacto, la aeración por etapas, la zanja de oxidación y la aeración con oxígeno puro.

Los procesos aerobios por lodos activados están formados por bacterias, hongos, protozoos y nemátodos. En los procesos de tratamiento aerobios las bacterias que actúan en la degradación incluyen miembros de los géneros *Pseudomonas*, *Zoogloea*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Bdellovibrio*, *Mycobacterium* y nitrificantes como *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*. Adicionalmente se pueden presentar formas filamentosas tales como *Sphaerotilus*, *Beggiatoa*, *Thiothrix*, *Leptomitus*, *Leucothrix* y *Geotrichum*. Las bacterias gram positivas reportadas en sistemas aerobios pertenecen a los géneros *Bacillus* y *Micrococcus* (Lewandowski, 1990).

Por lo general las bacterias realizan la función de degradar el sustrato. Sin embargo, las actividades metabólicas de otros organismos son igualmente importantes; por ejemplo, los protozoos y rotíferos actúan como depuradores del efluente. Los protozoos actúan como predadores de bacterias dispersas que no han floculado y los rotíferos consumen cualquier partícula biológica que no ha sedimentado. Los hongos también pueden ser degradadores como por ejemplo los géneros *Phanerochaete* y *Rhizopus*.

Sistemas con biomasa fija

Disco biológico rotatorio. Es un tratamiento aerobio y con biomasa fija. Consiste en una serie de discos circulares de 2 a 3 m de diámetro, fabricados en poliestireno o cloruro de polivinilo desplegado o corrugado, de 10 a 20 mm de ancho, montados en un eje horizontal con espaciamiento de 20 mm entre los discos adyacentes. Los discos están sumergidos en 40% de susuperficie, de manera que al rotarlos, la biopelícula entra en contacto con el agua residual y con el aire en forma alternada con velocidad de 2 a 6 rpm. De esta forma se realiza la aeración de los microorganismos.

Filtro percolador. Es conocido como filtro rociador, biorre y biofiltro, se clasifica dentro de los procesos con biomasa fija. Estos sistemas se caracterizan por tener un medio filtrante como la grava, escorias de hornos, madera de pino o plásticos. Una vez que el filtro se encuentra operando, la superficie del medio comienza a cubrirse con una película viscosa y gelatinosa que contiene bacterias y otro tipo de microorganismos. El efluente de la sedimentación primaria es distribuido uniformemente en el medio de soporte del filtro a través de un sistema distribuidor de flujo. El oxígeno necesario es suministrado por la circulación natural del aire a través de los intersticios entre el medio filtrante y, parcialmente por el oxígeno disuelto presente en el agua residual. Pasando cierto tiempo, comienza el desarrollo microbiano en la interfase anaerobia del medio filtrante, generando el crecimiento de organismos anaerobios y facultativos que, junto con los organismos aerobios, forman el mecanismo básico para la remoción de la materia orgánica. Durante la operación, la capa anaerobia pierde la habilidad de adherirse al medio y el paso del agua residual la desprende (lava) favoreciendo el crecimiento de una nueva película.

1.4.2 Reactores anaerobios

Los sistemas anaerobios involucran la descomposición de materia orgánica e inorgánica en ausencia de oxígeno. En estos sistemas se emplean bacterias heterótrofas y autótrofas que degradan la materia orgánica hasta metano. La degradación de dicha materia orgánica se lleva a cabo por tres grupos de bacterias, el primer grupo esta formado por bacterias hidrolíticas que transforman compuestos de alto peso molecular. El segundo grupo de bacterias (acidogénicas) fermentan los productos de la primera etapa hasta ácidos orgánicos. Algunas de las bacterias representativas de este grupo son *Clostridium* spp, *Peptococcus anaerobus*, *Actinomyces*, *Staphylococcus* y *Escherichia coli*. El tercer grupo de bacterias convierten el hidrógeno y ácido acético en metano y dióxido de carbono; a éste grupo

de bacterias se les llama metanogénicas. Los principales géneros son *Methanobacterium*, *Methanobacillus*, *Methanococcus* y *Methanosarcina* (Tchobanoglous, 1991). La energía contenida en el metano producido puede ser utilizada como energía calorífica directamente o transformada en mecánica o eléctrica según las necesidades existentes en el sitio y, siempre y cuando, se produzca en grandes cantidades que hagan interesante, desde el punto de vista económico, la instalación requerida (Jiménez, 2001).

La evolución de la tecnología anaerobia ha dado lugar a tres generaciones de reactores. La primera comprende aquellos procesos en donde la biomasa se encuentra en suspensión. Los reactores de la segunda generación tienen como característica fundamental que los microorganismos son retenidos en el reactor, ya sea por medio de un soporte en cual se adhieren en forma de biopelícula (filtro anaerobio), o bien, por las propiedades de sedimentación que posee (UASB, Upflow Anaerobic Sludge Blanket o reactores RAFA, reactor anaerobio de flujo ascendente). Los reactores de tercera generación tienen también los microorganismos en forma de biopelícula, pero el soporte se expande o fluidifica con altas velocidades de flujo, en ocasiones, estos sistemas son diseñados sin sedimentador secundario (Jiménez, 2001).

1.4.3 Reactor discontinuo secuencial

Uno de los procesos biológicos utilizados para el tratamiento de aguas industriales es el reactor discontinuo secuencial o Sequencing Batch Reactor (SBR por sus siglas en inglés). Este sistema está constituido por un cultivo mixto de microorganismos en forma de biomasa suspendida o biopelícula, orientado en el tiempo y se basa en un sistema de llenado y vaciado (Fig. 1-7). Cada ciclo del proceso está conformado por cinco etapas en forma secuencial como son: llenado, reacción, sedimentación, vaciado y tiempo muerto (Irvine y Ketchum, 1989; Tchobanoglous, 1991).

1.4.3.1 Etapas del sistema SBR

-Llenado: Es una etapa durante la cual se adiciona el sustrato (agua residual o efluente primario). Típicamente el volumen alimentado es del 75 % del volumen total del reactor. El tiempo aproximado que se utiliza durante la etapa de llenado es del 25 % de la duración total del ciclo.

-Reacción: En ocasiones inicia desde el período de llenado. En esta etapa se lleva a cabo la degradación del material orgánico biodegradable y el tiempo aproximado que se emplea para esta operación es el 35 % del tiempo total del ciclo. En esta etapa, según el tiempo de reacción, el sustrato fácilmente biodegradable comienza a agotarse y el empleo de otros compuestos comienza a seleccionar a los microorganismos deseados.

-Sedimentación: En esta etapa se permite la separación del líquido de la biomasa de modo que el sobrenadante queda clarificado. Típicamente el tiempo empleado en ésta operación es de 0.5 a 1.5 horas. En un reactor de este tipo, la etapa de sedimentación suele ser más eficiente que en un reactor de flujo continuo debido a que el contenido del reactor está completamente en reposo.

-Vaciado: Consiste en el desalojo del agua residual que ya fue tratada. El tiempo requerido para esta etapa es aproximadamente del 5 al 30 % del tiempo total del ciclo.

-Tiempo muerto: Esta etapa se aplica en procesos de tratamiento llamados en serie o múltiples. Con el tiempo muerto se permite que cada uno de los reactores concluya adecuadamente su tiempo de llenado sin afectar a los demás. En algunos casos esta etapa se omite.

La purga de lodos es otro paso importante en el funcionamiento de los sistemas SBR y puede afectar su rendimiento. La cantidad de lodo que se debe purgar y la frecuencia con la que se debe efectuar depende de las necesidades dictadas por los rendimientos (Tchobanoglous, 1991).

1.4.3.2 Ventajas del sistema SBR

El sistema SBR tiene algunas ventajas sobre los sistemas en continuo como es la de permitir el desarrollo de un consorcio de microorganismos estable y con altos rendimientos.

Otra de las ventajas es la flexibilidad en la conducción de su operación, es decir en estos procesos la degradación de los compuestos se realiza en función del tiempo. En

caso de haber un choque de concentración (aporte puntual de un tóxico) se puede prolongar la duración del tratamiento de tal modo que se le permita a los microorganismos degradar totalmente el tóxico.

Además, en este tipo de sistema un solo tanque sirve como tanque de reacción y como sedimentador por lo que puede proporcionar ventajas desde el punto de vista económico (Irvine y Ketchum, 1989).

Por otra parte, una característica única de los sistemas SBR es el no necesitar una recirculación de lodos. Debido a que tanto la aireación como la decantación tienen lugar en el mismo tanque, por lo que no se pierden lodos en la fase de reacción. Se obtienen lodos con excelentes características de sedimentabilidad debido a la actividad cíclica del reactor. Se controla el problema de esponjamiento de lodos ya que los microorganismos filamentosos son controlados por la alta variación en la concentración de sustrato; debido a su flexibilidad es posible la total automatización y aplicación de estrategias de control en el reactor.

Para un reactor que opere de manera eficiente se deben controlar factores ambientales tales como temperatura, pH, concentración de oxígeno disuelto. Así mismo, las características del agua residual como la concentración de sustratos, co-sustratos, compuestos inhibidores, salinidad o la carga orgánica y características propias del proceso que incluyen en tiempo de retención hidráulica, la edad de los lodos, la velocidad de llenado y vaciado, la transferencia del oxígeno al medio y la velocidad de agitación (Tchobanoglous, 1991).

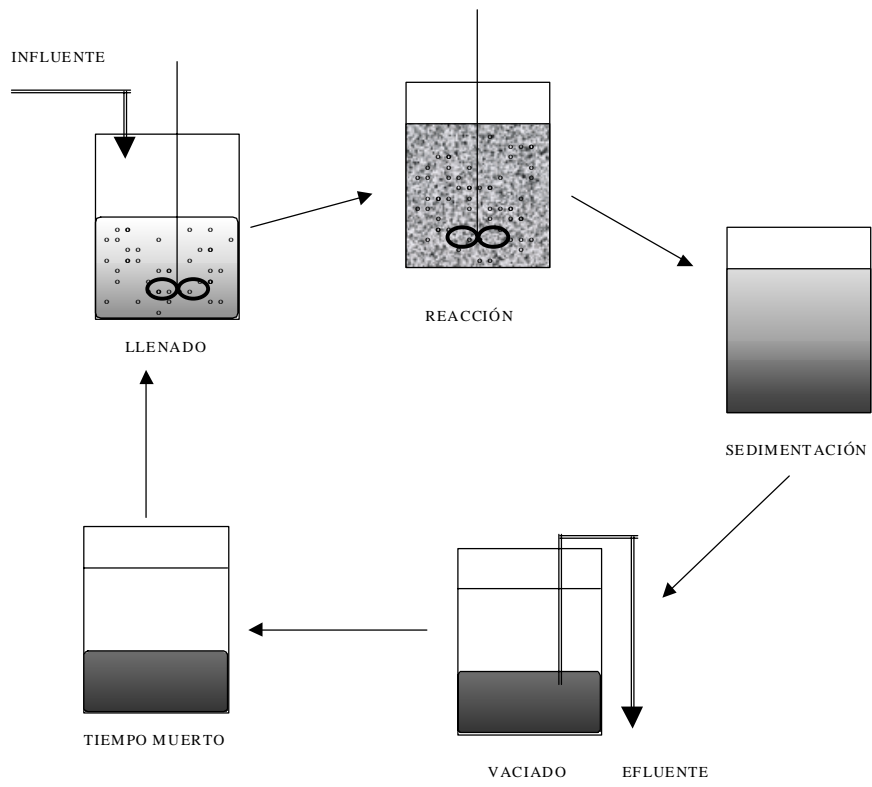


Figura 1-7 Etapas que constituyen un ciclo del proceso SBR

CAPÍTULO II

ANTECEDENTES

2.1 Perfil cromatográfico de AGC para la identificación de microorganismos

2.1.1 Perfil de AGC para la identificación de cepas puras

Los perfiles de Ácidos Grasos Fosfolipídicos (AGF) 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. Algunas de las bacterias identificadas para dichos fines son: *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Leigionella*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Neisseria*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Salmonella* *Staphylococcus* y *Vibrio* entre otras (Heyrman *et al.*, 1999; Haack *et al.*, 1994; Ghanem *et al.*, 1991).

La descripción de las comunidades microbianas en forma cuantitativa es uno de los principales problemas que tienen los ecólogos. Las pruebas clásicas de microbiología requieren de un aislamiento y un subsiguiente cultivo de los microorganismos. Sin embargo, esto no es adecuado para el análisis de muestras ambientales, ya que únicamente del 0.01 al 12 % de los microorganismos presentes en una muestra ambiental pueden ser cultivados en el laboratorio (Amann *et al.*, 1995). Para solucionar este problema se han desarrollado métodos que involucran la detección y separación de componentes bioquímicos y genéticos para utilizarlos como biomarcadores. Estos métodos incluyen la determinación de las poblaciones microbianas por medio del análisis de RNA ribosomal o su correspondiente secuencia de ADN, el análisis de Ácidos Grasos Celulares (AGC) y el de Ácidos Grasos Fosfolipídicos (AGF) (Piotrowska-Seget y Mrozik, 2003).

2.1.2 Perfil de AGC para identificación de comunidades de microorganismos

Para la identificación de grupos de microorganismos se utilizan los perfiles de AGC y de AGF. Algunas de las comunidades de microorganismos encontradas en diferentes ambientes son: algas (Rezanka *et al.*, 1983; Sasser, 2001), actinomicetos (Bååth *et al.*, 1992; McNabb *et al.*, 1997; Sasser, 2001), hongos (Olsson *et al.*, 1997; Sasser, 2001);

Vestal y White, 1989 y Zelles *et al.*, 1997), protozoarios (Mansour *et al.*, 1999; Sasser, 2001) y bacterias anaerobias, aerobias, facultativas y sulfatorreductoras (Taylor y Parkes, 1983; Dowling *et al.*, 1986; Welch, 1991; Rajendran *et al.*, 1992 y Rodríguez *et al.*, 2000). Cada grupo de microorganismos presenta con frecuencia algunos AG. Un ejemplo es la presencia del ácido 10ME18:0, el cual es característico de los actinomicetos. En la Tabla 2-1 se pueden observar los ácidos grasos que se encuentran con frecuencia en los distintos grupos de microorganismos.

Tabla 2-1. Ácidos Grasos encontrados con frecuencia en distintos grupos de microorganismos

Ácidos Grasos Celulares Biomarcadores	Grupo de microorganismos	Referencias
16:1 ω 9c, 16:1 ω 7c, 16:1 ω 7t, 16:1 ω 5c (1997); 18:1 ω 9c, 18:1 ω 7c, 18:1 ω 7t, (1989);	Eubacterias (Gram-)	Sundh <i>et al.</i> , Vestal y White Ritchie <i>et al.</i> , (2000)
i17:0, a17:0, i18:0, i16:0, i15:0, i14:0 (1997); (1989)	Eubacterias (Gram+)	Sundh <i>et al.</i> , Vestal y White
Las mismas de las eubacterias más (1997)	Cianobacterias	Sundh <i>et al.</i> ,
20:0, 22:0, 18:2 ω 6, 18:3 ω 3 i17:1 ω 7, 10ME16:0, 17:1 ω 6 (1986); (1998); (1989)	Sulfatorreductoras	Dowling <i>et al.</i> , Bossio y Scow, Vestal y White
Las mismas de las eubacterias más (1985);	Actinomicetos	Kroppenstedt,

10ME18:0 (1998);		Bossio y Scow,
(2000)		Ritchie <i>et al.</i> ,
16:0, 18:1 ω 9, 18:2 ω 6, 18:3 ω 6, 18:3 ω 3 (1989);	Hongos	Vestal y White,
(1998);		Bossio y Scow,
(2000)		Ritchie <i>et al.</i> ,
16:1 ω 8, 18:1 ω 8 (1985)	Oxidadoras de metano	Nichols <i>et al.</i> ,
18: ²⁻⁹ , 12; 20:3 ω 6; 20:4 ω 6 (1989);	Protozoa	Vestal y White
		Sasser (2001)

Los perfiles de AGF se han utilizado para cuantificar biomasa microbiana (Zelles *et al.*, 1994; Bååth *et al.*, 1992 y Werker y Hall, 1998) y determinar la estructura (distribución) de las comunidades de microorganismos en muestras ambientales como suelos contaminados con cloroformo, sedimentos marinos y biofiltros para aire (White *et al.*, 1997; Sundh *et al.*, 1997 y Werker y Hall, 1998). Los autores anteriores consideran como biomarcadores de bacterias Gram negativas a algunos ácidos grasos insaturados y para bacterias Gram positivas, algunos ácidos ramificados.

Zelles *et al.*, 1997 estudiaron la variación de las comunidades de microorganismos en suelos contaminados con cloroformo. Observaron que los ácidos grasos de cadena ramificada, indicadores de bacterias Gram +, fueron afectados significativamente un 30 %. Mientras que los ácidos grasos monoinsaturados, característicos de bacterias Gram - fueron fuertemente afectados de un 60-70 %. Los polinsaturados, indicadores de eucariontes, disminuyeron de un 70-80 %.

Por otro lado Webster *et al.*, 1997 determinaron la estructura de las comunidades de microorganismos en cinco biofiltros, dos de ellos empacados con carbón activado y los otros tres con composta de residuos de jardín. Se encontraron bacterias Gram + y -, pero las predominantes fueron las Gram -, ya que predominaban los ácidos

monoinsaturados. También, encontraron bacterias sulfatorreductoras, las cuales tienen como biomarcadores a los ácidos saturados de cadena ramificada.

Sundh *et al.*, 1997 determinaron la variación de microorganismos a diferentes profundidades de la tierra de turba después de un tratamiento de fumigación con cloroformo. Encontraron eubacterias principalmente Gram +, concluyen que los ácidos grasos terminalmente ramificados indicaban la presencia de bacterias anaerobias (ácidos grasos terminalmente ramificados) y aerobias (ácidos grasos monoinsaturados) más que la presencia de bacterias Gram positivas o negativas.

Todos los estudios anteriores mencionan que el perfil de ácidos grasos es una herramienta útil para el estudio de comunidades bacterianas en muestras ambientales. Sin embargo, en sistemas de tratamiento biológico de aguas residuales son escasos los estudios en los que se ha utilizado el perfil de AG. Por ejemplo Werker y Hall, (1998) observaron que hay diferencias en los perfiles de AGF de muestras obtenidas de biomasa en suspensión y biomasa adherida al empaque en sistemas de tratamiento de aguas residuales y lo anterior ha sugerido que se trata de dos comunidades de microorganismos distintos. La identificación de microorganismos en los sistemas de tratamiento de aguas residuales podría representar grandes ventajas, ya que ayudaría a seleccionar un inóculo adecuado y de este modo se disminuirían los tiempos de arranque de los sistemas de tratamiento. Además, la identificación de microorganismos por medio de AGC biomarcadores permitiría asociar cambios en las comunidades de bacterias con las condiciones en las que se encuentran los sistemas de tratamiento de aguas residuales. Es necesario considerar que los sistemas de tratamiento de aguas residuales están clasificados en aerobios, facultativos y anaerobios, por lo cual sería conveniente obtener AGC biomarcadores de bacterias de acuerdo con su tipo de respiración. Sin embargo, en la actualidad no se cuenta con AG biomarcadores que permitan la identificación de las comunidades microbianas en dichos sistemas de tratamiento de aguas residuales.

2.1.3 AGC biomarcadores de estrés por ayuno

Con el estudio de los AGC no únicamente se pueden identificar especies, géneros o comunidades de microorganismos, además 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 Ácidos Grasos Fosfolipídicos (AGF) dependiendo del estado metabólico en el que se encuentren los microorganismos y que tales cambios

pueden utilizarse como biomarcadores. Es decir, se ha reportado que los AGF de los microorganismos cambian bajo la influencia de algún factor estresante como la falta de agua (deseccación) (Kieft *et al.*, 1994), cambios en la temperatura (Okuyama *et al.*, 1990; Monteoliva *et al.*, 1988; Evans *et al.*, 1998; Allen *et al.*, 1999; Kropinski *et al.*, 1987; Abu-Shkara *et al.*, 1998), presencia de metales pesados o compuestos aromáticos (Frostegård *et al.*, 1993; Heipieper *et al.*, 1992; Tsitko *et al.*, 1999; Laura *et al.*, 1996), condiciones ácidas o salinas (Monteoliva *et al.*, 1988) y ayuno (Hood *et al.*, 1986; Kieft *et al.*, 1994; Oliver y Stringer, 1984; Guckert *et al.*, 1986).

Con respecto al ayuno se ha reportado que las fosfolipasas de las células muertas o lisadas rompen la cabeza polar de los fosfolípidos de la membrana y se forman diacilgliceroles (una molécula de glicerol combinada con 2 moléculas de ácido graso). Por lo tanto la presencia de diacilgliceroles indicará las células no viables (Ringelberg *et al.*, 1997) y una relación diacilgliceroles/AGF indicará la relación de células no viables y las viables (Kieft *et al.*, 1994; White *et al.*, 1979).

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 16:1 ω 7t/16:1 ω 7c y 18:1 ω 7t/18:1 ω 7c (Guckert *et al.*, 1986 y Webster *et al.*, 1997). Algunos autores mencionan que la relación Trans/Cis es una relación de estrés de lípidos o de ayuno, de tal modo que una relación < 0.1 se encuentra en la mayoría de los microorganismos de cultivos y muestras ambientales en condiciones normales. Sin embargo, en condiciones de estrés la relación aumenta.

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. También Webster *et al.* (1997) midieron la relación de estrés en 5 biofiltros que trataban aire. Tres reactores contenían carbón activado granular y dos contenían composta. Inicialmente, todas las comunidades microbianas presentaron estrés bajo. Conforme continuó el experimento, la tasa de estrés aumentó. Esto debido al cambio de pH en los reactores. Las relaciones variaron de 0.3 hasta 9.0 y encontraron que dichas relaciones se obtuvieron debido a una disminución en el pH, pero que pudo influir un estado de ayuno.

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 (Hood *et al.*, 1986; Guckert *et al.*, 1986; Vestal y White, 1989). Sin embargo, no se han realizado estudios sobre el ayuno de nutrientes o de una fuente de carbono en ambientes como aguas residuales, lo cual es muy importante porque los sistemas de tratamiento de aguas residuales presentan períodos de ayuno. Esto provoca la disminución de la viabilidad de los microorganismos y por lo tanto la disminución de su actividad. Todo esto provoca que los contaminantes del agua no se degraden adecuadamente y que se tenga agua de mala calidad. Además, el estudio del ayuno es fundamental porque su influencia podría provocar desajustes en la composición de la membrana celular.

2.2 Estudios realizados de la microbiología del tratamiento de aguas en el Instituto de Ingeniería de la UNAM

2.2.1 Estudios relacionados con la identificación de bacterias

En el Instituto de Ingeniería de la UNAM se han realizado algunos estudios relacionados con la microbiología de los sistemas de tratamiento de aguas residuales.

Se han realizado algunos estudios en sistemas de tratamiento de aguas residuales y se encontró que en los sistemas SBR (en especial con biomasa fija) se han obtenido buenas eficiencias de degradación (75-100 %) de algunos compuestos tóxicos como 4-clorofenol (Soto, 1999) p-nitrofenol (Melgoza *et al.*, 2000), 2,4 dinitrofenol (Juárez, 2000) y colorantes azo (Cruz y Buitrón, 2000; Quezada *et al.*, 2000). Sin embargo, se desconoce la actividad por separado de los microorganismos que se encuentran adheridos al empaque (biopelícula) y los que se encuentran en suspensión. En el Instituto de Ingeniería de la UNAM se han realizado algunos estudios de degradación de compuestos tóxicos como el 4-clorofenol (Soto, 1999), paranitrofenol (Melgoza *et al.*, 2000), 2, 4-dinitrofenol (Juárez, 2000) y colorantes azo (Cruz y Buitrón, 2000; Quezada *et al.*, 2000). Las eficiencias de degradación son buenas (75-100%). Sin embargo, se desconocen los microorganismos que se encuentran adheridos al empaque (biopelícula) y los que se encuentran en suspensión. La identificación de los

microorganismos en los dos lugares permitiría conocer a los responsables de realizar la degradación.

La identificación de las bacterias se ha efectuado con la ayuda de las técnicas convencionales, por ejemplo Buitrón *et al.*, (1998), al estudiar la degradación de una mezcla de fenoles, pudieron aislar e identificar bacterias del género *Micobacterium* y algunas bacterias que son aerobias pero que no son actinomicetos. En este caso la técnica implicó mucho tiempo, ya que los actinomicetos (como las micobacterias) necesitan por lo menos una semana para crecer. Una técnica alternativa como la de los AGC podría permitir la identificación de micobacterias en tan solo un par de horas.

Quezada *et al.*, (2000) identificaron bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Alcaligenes* y *Flavobacterium*, entre otros. En este caso una técnica como la de los AGC podría permitir la identificación de más bacterias.

2.2.2 Estudios relacionados con el ayuno y viabilidad de las bacterias

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). En biofiltros con biomasa en suspensión se observó que la viabilidad disminuye después de un periodo de ayuno de 4, 8, 12 y 24 horas, teniendo como fuente de carbono una mezcla de fenoles (Torres, 1998). Para el caso del 4- clorofenol el tiempo de degradación aumenta de 0.7 a 4.5 h con un periodo de ayuno de 24 horas y de 2 a 4 horas para el caso del 2,4,6 triclorofenol (Buitrón y Ortiz, 1997). Para un sistema de lodos activados, el porcentaje de células activas disminuyó un 40 % en los dos primeros días de ayuno (materia orgánica) y hasta un 5 % después de 5 días de ayuno (Coello *et al.*, 2001).

El estudio de este factor (ayuno) es de gran importancia debido a que se ha observado que el ayuno disminuye la viabilidad de las bacterias y esto aumenta el tiempo de degradación de los compuestos y por lo tanto se tiene agua de mala calidad. Además, el ayuno es un factor que puede afectar el perfil de AGC y por lo tanto puede interferir en el presente estudio.

CAPÍTULO II

ANTECEDENTES

2.1 Perfil cromatográfico de AGC para la identificación de microorganismos

2.1.1 Perfil de AGC para la identificación de cepas puras

Los perfiles de Ácidos Grasos Fosfolípidicos (AGF) 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. Algunas de las bacterias identificadas para dichos fines son: *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Leigionella*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Neisseria*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Salmonella* *Staphylococcus* y *Vibrio* entre otras (Heyrman *et al.*, 1999; Haack *et al.*, 1994; Ghanem *et al.*, 1991).

La descripción de las comunidades microbianas en forma cuantitativa es uno de los principales problemas que tienen los ecólogos. Las pruebas clásicas de microbiología requieren de un aislamiento y un subsiguiente cultivo de los microorganismos. Sin embargo, esto no es adecuado para el análisis de muestras ambientales, ya que únicamente del 0.01 al 12 % de los microorganismos presentes en una muestra ambiental pueden ser cultivados en el laboratorio (Amann *et al.*, 1995). Para solucionar este problema se han desarrollado métodos que involucran la detección y separación de componentes bioquímicos y genéticos para utilizarlos como biomarcadores. Estos métodos incluyen la determinación de las poblaciones microbianas por medio del análisis de RNA ribosomal o su correspondiente secuencia de ADN, el análisis de Ácidos Grasos Celulares (AGC) y el de Ácidos Grasos Fosfolípidicos (AGF) (Piotrowska-Seget y Mrozik, 2003).

2.1.2 Perfil de AGC para identificación de comunidades de microorganismos

Para la identificación de grupos de microorganismos se utilizan los perfiles de AGC y de AGF. Algunas de las comunidades de microorganismos encontradas en diferentes ambientes son: algas (Rezanka *et al.*, 1983; Sasser, 2001), actinomicetos (Bååth *et al.*, 1992; McNabb *et al.*, 1997; Sasser, 2001), hongos (Olsson *et al.*, 1997; Sasser, 2001);

Vestal y White, 1989 y Zelles *et al.*, 1997), protozoarios (Mansour *et al.*, 1999; Sasser, 2001) y bacterias anaerobias, aerobias, facultativas y sulfatorreductoras (Taylor y Parkes, 1983; Dowling *et al.*, 1986; Welch, 1991; Rajendran *et al.*, 1992 y Rodríguez *et al.*, 2000). Cada grupo de microorganismos presenta con frecuencia algunos AG. Un ejemplo es la presencia del ácido 10ME18:0, el cual es característico de los actinomicetos. En la Tabla 2-1 se pueden observar los ácidos grasos que se encuentran con frecuencia en los distintos grupos de microorganismos.

Tabla 2-1. Ácidos Grasos encontrados con frecuencia en distintos grupos de microorganismos

Ácidos Grasos Celulares Biomarcadores	Grupo de microorganismos	Referencias
16:1 ω 9c, 16:1 ω 7c, 16:1 ω 7t, 16:1 ω 5c (1997); 18:1 ω 9c, 18:1 ω 7c, 18:1 ω 7t, (1989);	Eubacterias (Gram-)	Sundh <i>et al.</i> , Vestal y White Ritchie <i>et al.</i> , (2000)
i17:0, a17:0, i18:0, i16:0, i15:0, i14:0 (1997); (1989)	Eubacterias (Gram+)	Sundh <i>et al.</i> , Vestal y White
Las mismas de las eubacterias más (1997)	Cianobacterias	Sundh <i>et al.</i> ,
20:0, 22:0, 18:2 ω 6, 18:3 ω 3 i17:1 ω 7, 10ME16:0, 17:1 ω 6 (1986); (1998); (1989)	Sulfatorreductoras	Dowling <i>et al.</i> , Bossio y Scow, Vestal y White
Las mismas de las eubacterias más (1985);	Actinomicetos	Kroppenstedt,

10ME18:0 (1998);		Bossio y Scow,
(2000)		Ritchie <i>et al.</i> ,
16:0, 18:1 ω 9, 18:2 ω 6, 18:3 ω 6, 18:3 ω 3	Hongos	Vestal y White,
(1989);		Bossio y Scow,
(1998);		Ritchie <i>et al.</i> ,
(2000)		
16:1 ω 8, 18:1 ω 8	Oxidadoras de metano	Nichols <i>et al.</i> ,
(1985)		
18: ²⁻⁹ , 12; 20:3 ω 6; 20:4 ω 6	Protozoa	Vestal y White
(1989);		Sasser (2001)

Los perfiles de AGF se han utilizado para cuantificar biomasa microbiana (Zelles *et al.*, 1994; Bååth *et al.*, 1992 y Werker y Hall, 1998) y determinar la estructura (distribución) de las comunidades de microorganismos en muestras ambientales como suelos contaminados con cloroformo, sedimentos marinos y biofiltros para aire (White *et al.*, 1997; Sundh *et al.*, 1997 y Werker y Hall, 1998). Los autores anteriores consideran como biomarcadores de bacterias Gram negativas a algunos ácidos grasos insaturados y para bacterias Gram positivas, algunos ácidos ramificados.

Zelles *et al.*, 1997 estudiaron la variación de las comunidades de microorganismos en suelos contaminados con cloroformo. Observaron que los ácidos grasos de cadena ramificada, indicadores de bacterias Gram +, fueron afectados significativamente un 30 %. Mientras que los ácidos grasos monoinsaturados, característicos de bacterias Gram - fueron fuertemente afectados de un 60-70 %. Los polinsaturados, indicadores de eucariontes, disminuyeron de un 70-80 %.

Por otro lado Webster *et al.*, 1997 determinaron la estructura de las comunidades de microorganismos en cinco biofiltros, dos de ellos empacados con carbón activado y los otros tres con composta de residuos de jardín. Se encontraron bacterias Gram + y -, pero las predominantes fueron las Gram -, ya que predominaban los ácidos

monoinsaturados. También, encontraron bacterias sulfatorreductoras, las cuales tienen como biomarcadores a los ácidos saturados de cadena ramificada.

Sundh *et al.*, 1997 determinaron la variación de microorganismos a diferentes profundidades de la tierra de turba después de un tratamiento de fumigación con cloroformo. Encontraron eubacterias principalmente Gram +, concluyen que los ácidos grasos terminalmente ramificados indicaban la presencia de bacterias anaerobias (ácidos grasos terminalmente ramificados) y aerobias (ácidos grasos monoinsaturados) más que la presencia de bacterias Gram positivas o negativas.

Todos los estudios anteriores mencionan que el perfil de ácidos grasos es una herramienta útil para el estudio de comunidades bacterianas en muestras ambientales. Sin embargo, en sistemas de tratamiento biológico de aguas residuales son escasos los estudios en los que se ha utilizado el perfil de AG. Por ejemplo Werker y Hall, (1998) observaron que hay diferencias en los perfiles de AGF de muestras obtenidas de biomasa en suspensión y biomasa adherida al empaque en sistemas de tratamiento de aguas residuales y lo anterior ha sugerido que se trata de dos comunidades de microorganismos distintos. La identificación de microorganismos en los sistemas de tratamiento de aguas residuales podría representar grandes ventajas, ya que ayudaría a seleccionar un inóculo adecuado y de este modo se disminuirían los tiempos de arranque de los sistemas de tratamiento. Además, la identificación de microorganismos por medio de AGC biomarcadores permitiría asociar cambios en las comunidades de bacterias con las condiciones en las que se encuentran los sistemas de tratamiento de aguas residuales. Es necesario considerar que los sistemas de tratamiento de aguas residuales están clasificados en aerobios, facultativos y anaerobios, por lo cual sería conveniente obtener AGC biomarcadores de bacterias de acuerdo con su tipo de respiración. Sin embargo, en la actualidad no se cuenta con AG biomarcadores que permitan la identificación de las comunidades microbianas en dichos sistemas de tratamiento de aguas residuales.

2.1.3 AGC biomarcadores de estrés por ayuno

Con el estudio de los AGC no únicamente se pueden identificar especies, géneros o comunidades de microorganismos, además 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 Ácidos Grasos Fosfolipídicos (AGF) dependiendo del estado metabólico en el que se encuentren los microorganismos y que tales cambios

pueden utilizarse como biomarcadores. Es decir, se ha reportado que los AGF de los microorganismos cambian bajo la influencia de algún factor estresante como la falta de agua (deseccación) (Kieft *et al.*, 1994), cambios en la temperatura (Okuyama *et al.*, 1990; Monteoliva *et al.*, 1988; Evans *et al.*, 1998; Allen *et al.*, 1999; Kropinski *et al.*, 1987; Abu-Shkara *et al.*, 1998), presencia de metales pesados o compuestos aromáticos (Frostegård *et al.*, 1993; Heipieper *et al.*, 1992; Tsitko *et al.*, 1999; Laura *et al.*, 1996), condiciones ácidas o salinas (Monteoliva *et al.*, 1988) y ayuno (Hood *et al.*, 1986; Kieft *et al.*, 1994; Oliver y Stringer, 1984; Guckert *et al.*, 1986).

Con respecto al ayuno se ha reportado que las fosfolipasas de las células muertas o lisadas rompen la cabeza polar de los fosfolípidos de la membrana y se forman diacilgliceroles (una molécula de glicerol combinada con 2 moléculas de ácido graso). Por lo tanto la presencia de diacilgliceroles indicará las células no viables (Ringelberg *et al.*, 1997) y una relación diacilgliceroles/AGF indicará la relación de células no viables y las viables (Kieft *et al.*, 1994; White *et al.*, 1979).

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 16:1 ω 7t/16:1 ω 7c y 18:1 ω 7t/18:1 ω 7c (Guckert *et al.*, 1986 y Webster *et al.*, 1997). Algunos autores mencionan que la relación Trans/Cis es una relación de estrés de lípidos o de ayuno, de tal modo que una relación < 0.1 se encuentra en la mayoría de los microorganismos de cultivos y muestras ambientales en condiciones normales. Sin embargo, en condiciones de estrés la relación aumenta.

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. También Webster *et al.* (1997) midieron la relación de estrés en 5 biofiltros que trataban aire. Tres reactores contenían carbón activado granular y dos contenían composta. Inicialmente, todas las comunidades microbianas presentaron estrés bajo. Conforme continuó el experimento, la tasa de estrés aumentó. Esto debido al cambio de pH en los reactores. Las relaciones variaron de 0.3 hasta 9.0 y encontraron que dichas relaciones se obtuvieron debido a una disminución en el pH, pero que pudo influir un estado de ayuno.

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 (Hood *et al.*, 1986; Guckert *et al.*, 1986; Vestal y White, 1989). Sin embargo, no se han realizado estudios sobre el ayuno de nutrientes o de una fuente de carbono en ambientes como aguas residuales, lo cual es muy importante porque los sistemas de tratamiento de aguas residuales presentan períodos de ayuno. Esto provoca la disminución de la viabilidad de los microorganismos y por lo tanto la disminución de su actividad. Todo esto provoca que los contaminantes del agua no se degraden adecuadamente y que se tenga agua de mala calidad. Además, el estudio del ayuno es fundamental porque su influencia podría provocar desajustes en la composición de la membrana celular.

2.2 Estudios realizados de la microbiología del tratamiento de aguas en el Instituto de Ingeniería de la UNAM

2.2.1 Estudios relacionados con la identificación de bacterias

En el Instituto de Ingeniería de la UNAM se han realizado algunos estudios relacionados con la microbiología de los sistemas de tratamiento de aguas residuales.

Se han realizado algunos estudios en sistemas de tratamiento de aguas residuales y se encontró que en los sistemas SBR (en especial con biomasa fija) se han obtenido buenas eficiencias de degradación (75-100 %) de algunos compuestos tóxicos como 4-clorofenol (Soto, 1999) p-nitrofenol (Melgoza *et al.*, 2000), 2,4 dinitrofenol (Juárez, 2000) y colorantes azo (Cruz y Buitrón, 2000; Quezada *et al.*, 2000). Sin embargo, se desconoce la actividad por separado de los microorganismos que se encuentran adheridos al empaque (biopelícula) y los que se encuentran en suspensión. En el Instituto de Ingeniería de la UNAM se han realizado algunos estudios de degradación de compuestos tóxicos como el 4-clorofenol (Soto, 1999), paranitrofenol (Melgoza *et al.*, 2000), 2, 4-dinitrofenol (Juárez, 2000) y colorantes azo (Cruz y Buitrón, 2000; Quezada *et al.*, 2000). Las eficiencias de degradación son buenas (75-100%). Sin embargo, se desconocen los microorganismos que se encuentran adheridos al empaque (biopelícula) y los que se encuentran en suspensión. La identificación de los

microorganismos en los dos lugares permitiría conocer a los responsables de realizar la degradación.

La identificación de las bacterias se ha efectuado con la ayuda de las técnicas convencionales, por ejemplo Buitrón *et al.*, (1998), al estudiar la degradación de una mezcla de fenoles, pudieron aislar e identificar bacterias del género *Micobacterium* y algunas bacterias que son aerobias pero que no son actinomicetos. En este caso la técnica implicó mucho tiempo, ya que los actinomicetos (como las micobacterias) necesitan por lo menos una semana para crecer. Una técnica alternativa como la de los AGC podría permitir la identificación de micobacterias en tan solo un par de horas.

Quezada *et al.*, (2000) identificaron bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Alcaligenes* y *Flavobacterium*, entre otros. En este caso una técnica como la de los AGC podría permitir la identificación de más bacterias.

2.2.2 Estudios relacionados con el ayuno y viabilidad de las bacterias

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). En biofiltros con biomasa en suspensión se observó que la viabilidad disminuye después de un periodo de ayuno de 4, 8, 12 y 24 horas, teniendo como fuente de carbono una mezcla de fenoles (Torres, 1998). Para el caso del 4- clorofenol el tiempo de degradación aumenta de 0.7 a 4.5 h con un periodo de ayuno de 24 horas y de 2 a 4 horas para el caso del 2,4,6 triclorofenol (Buitrón y Ortiz, 1997). Para un sistema de lodos activados, el porcentaje de células activas disminuyó un 40 % en los dos primeros días de ayuno (materia orgánica) y hasta un 5 % después de 5 días de ayuno (Coello *et al.*, 2001).

El estudio de este factor (ayuno) es de gran importancia debido a que se ha observado que el ayuno disminuye la viabilidad de las bacterias y esto aumenta el tiempo de degradación de los compuestos y por lo tanto se tiene agua de mala calidad. Además, el ayuno es un factor que puede afectar el perfil de AGC y por lo tanto puede interferir en el presente estudio.

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

3.1 Estrategia experimental para obtener la metodología de los AGC biomarcadores

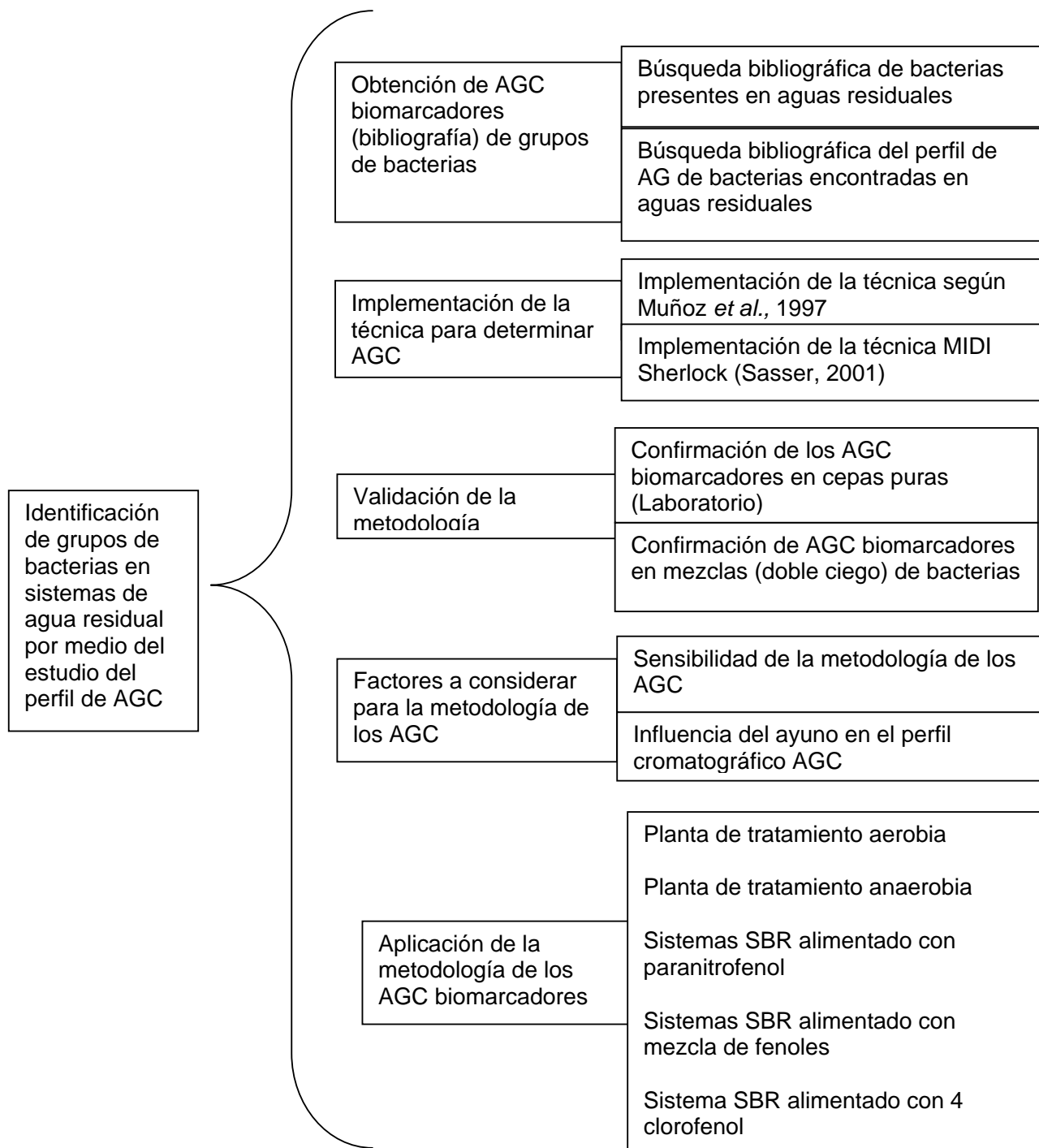


Figura 3-1 Diagrama de flujo de la estrategia experimental

3.2 Obtención de AGC biomarcadores

3.2.1 Bacterias presentes en sistemas de tratamiento de aguas residuales (revisión bibliográfica)

Se realizó una revisión bibliográfica para determinar las bacterias presentes en los sistemas de tratamiento de aguas residuales. La revisión incluyó sistemas de tratamiento aerobios y anaerobios.

3.2.2 Análisis cualitativo de los datos obtenidos

Posteriormente, se realizó una revisión bibliográfica de los perfiles cromatográficos de Ácidos Grasos Celulares (AGC) de cada género o especie encontrado en la revisión anterior. Lo anterior se realizó basado en las siguientes publicaciones: Bøe y Gjerde, 1980; Laskin y Lechevalier, 1981; Taylor y Parkers, 1983; Dowgling *et al.*, 1986; McNabb *et al.*, 1997; Sundh *et al.*, 1997; Ivanova *et al.*, 2005) La revisión incluyó ácidos grasos saturados, insaturados, ramificados, ciclopentanos, con grupos hidroxilo (OH) y metilo (ME). Se obtuvieron los AGC biomarcadores por grupo de bacterias de acuerdo con su sistema respiratorio (aerobias, facultativas y anaerobias). Es decir, se identificaron los AG que se presentan como únicos de cada grupo.

3.2.3 Análisis cuantitativo (Análisis de Componentes Principales, ACP)

Para analizar de forma cuantitativa la base de datos obtenida, se realizó un análisis multivariado llamado Análisis de Componentes Principales (ACP). Se consideraron 39 géneros o especies de bacterias y 58 ácidos grasos celulares. Se utilizó un paquete llamado Stat Graphics 5.0 (Manugistic, 2000).

3.3 Técnicas para determinar AGC

3.3.1 Técnica de Muñoz *et al.* (1997)

Se tomó una muestra de biomasa del reactor biológico de 20 ml para obtener 40 mg de muestra (para la biomasa en suspensión) y para el caso de las muestras de biomasa fija se rasparon 40 mg de la biopelícula. Las muestras se centrifugaron a 3000 r.p.m. durante 15 minutos y se pesaron 3 mg de la pastilla, para posteriormente realizar los pasos siguientes:

a) Saponificación: Se colocó 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. Se evaporó el solvente en una campana de extracción con una corriente de aire y a 60 °C.

b) Extracción: A cada muestra se le agregó 1 ml de HCl al 10 % más 1 ml de éter etílico. Se agitó con vortex. El sobrenadante orgánico (éter etílico) conteniendo los lípidos disueltos se recuperaron con una pipeta Pasteur y se colocó en un tubo nuevo. Se agregó más éter etílico a la fase acuosa. Se agitó con vortex y se tomó el sobrenadante para pasarlo al tubo nuevo. Se repitió el paso anterior una vez más. Se colocó 1 ml de agua destilada a la fase orgánica. Se agitó y la fase acuosa se retiró del tubo. Se repitió el paso anterior dos veces más. Las muestras se sometieron a una corriente de aire a 30 °C para evaporar el solvente.

c) Esterificación: Los ácidos obtenidos en el paso anterior, se resuspendieron en 1 ml de éter etílico y 1 ml de solución de diazometano (ver preparación en el anexo 1). Se dejó reaccionar durante 15 minutos. 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 dos gotas de éter de petróleo y de ésta suspensión se tomó con una jeringa Hamilton un volumen de 2 µl, el cual se inyectó en un cromatógrafo VARIAN STAR 3600 CXGC (Varian Associates, Inc.), equipado con una columna capilar de sílice HP-1, de 30 m de longitud, 0.32 mm de diámetro interno, 0.25 µm de grosor y un detector de ionización de flama. La temperatura de la columna fue programada a 50-280 °C a 10 °C/min. y se mantuvo a 280 °C durante 10 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 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. Los cromatogramas fueron comparados con mezcla comercial estándar (47080-U, Supelco).

Tiempos de retención

Se realizaron tres inyecciones de cada estándar, de las cepas puras y de las muestra. Posteriormente se calculó la media aritmética y la desviación estándar a los tiempos de retención.

Porcentajes de áreas

Se sumaron todas las áreas bajo la curva para obtener el 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 de las tres inyecciones.

3.3.2 Técnica MIDI Sherlock (Sasser, 2001)

Para las muestras de los sistemas de tratamiento de aguas se pesaron 60mg de muestra, previamente centrifugados a 3000 rpm durante 10 min. en condiciones asépticas en tubos de 13 x 100 mm previamente enjuagados con hexano. Posteriormente, las muestras se procesaron de acuerdo con lo propuesto por Sasser, 2001 (Ver Figura 3-2). Para las cepas puras se pesaron 40 mg de muestra como lo indica la técnica MIDI.

a) Saponificación: A cada tubo con muestra se le puso 1 ml del reactivo 1 (ver anexo 1) y cerraron y sellaron con cinta de teflón. Se agitaron vigorosamente con un vortex durante 5 a 10 segundos y se pusieron en un baño de agua a 100 °C durante 5 minutos. Posteriormente, se volvieron a agitar durante 5 a 10 segundos y se regresaron al baño de agua a 100 °C durante 25 minutos.

b) Metilación: Los tubos se dejaron enfriar y se les adiciona 2 ml del reactivo 2 (ver anexo). Se agitaron durante 5 a 10 segundos y pusieron a calentar por 10 +/- 1 minutos a 80 +/- 1°C (este paso es crítico en tiempo y temperatura).

c) Extracción: Los tubos se dejaron enfriar y se les colocó 1.25 ml del reactivo 3 (ver anexo). Se pusieron en un rotador clínico por 10 minutos y posteriormente se desechó la fase acuosa.

d) Lavado: Se adiciona 3 ml del reactivo a la fase orgánica y se colocaron en el rotador clínico durante 5 minutos. Posteriormente, se recuperaron 2/3 de la fase orgánica y se colocaron en viales para cromatografía.

Análisis de los ésteres metílicos: Las muestras conteniendo los ácidos grasos esterificados, antes de ser inyectados en el cromatógrafo se evaporaron con una corriente de aire filtrado (0.2 μm) y posteriormente se resuspendieron con 10 μl de hexano. Con una jeringa Hamilton se tomó un volumen de 1 μl para inyectarlo a un cromatógrafo HP 6890 equipado con una columna HP-5MS al 5 % de metil fenil silicona (Cat. 10991s-433 Supelco). La columna era de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno, 25 mm de grosor. El cromatógrafo tenía un detector selectivo de masas Agilent 5973. La elución se efectuó con helio como gas acarreador a un flujo de 1ml/min con un gradiente de temperatura de 170 a 280°C, a razón de 10°C/min. La temperatura del detector y del inyector fue de 280 °C y 260°C respectivamente.

La señal electrónica del detector pasó a una computadora donde se lleva a cabo la integración de los picos por medio del programa ChemStation. La composición de los ésteres metílicos de los ácidos grasos es comparada con una base de datos (biblioteca) almacenada.

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). Se adicionaron 3 ácidos grasos como estándar interno (ác. behénico, 22:0, ác. Lignocérico, 24:0 y Trans-9hexadecanoato, 16:1 ω 9t), se resuspendieron en hexano y se mantuvieron en congelación (-20°C) para cada inyección.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis cualitativo y cuantitativo de los resultados obtenidos. Para el análisis cualitativo se clasificaron las bacterias de acuerdo con su sistema respiratorio (anaerobio, facultativo y aerobio) y se separaron los ácidos grasos que se encontraban únicamente en uno de los tres tipos de respiración. Para el caso del análisis cuantitativo se realizó un análisis multivariado llamado Análisis de Componentes Principales (ACP) en el que se consideraron los porcentajes de área de cada ácido graso. Primero se efectuó el análisis de los AGC en función de las bacterias y después las bacterias en función de los AGC. Se obtuvieron los eigenvalores y se graficaron los datos. Este análisis se realizó de acuerdo con Pla (1986), con el apoyo del paquete Stat Graphics Plus 5.0.

3.4 Validación de la metodología de los AGC biomarcadores

3.4.1 Confirmación de AGC biomarcadores en cepas puras

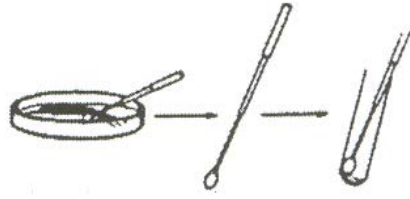
Los resultados obtenidos del análisis cualitativo y cuantitativo para la búsqueda de AGC biomarcadores, se confirmaron en el laboratorio. Es decir, se confirmó la presencia de AGC biomarcadores de cada grupo de bacterias de acuerdo con su tipo de respiración. Para lo anterior, se escogieron cepas puras representativas de cada grupo de respiración (6 aerobias, 5 facultativas y 5 anaerobias) (Tabla 3-2). Se sembraron por estriados continuos y se incubaron a 37 °C durante 24 horas excepto *Enterococcus* y *Clostridium* que se incubaron en medio líquido durante 1 y 3 días respectivamente. Después del tiempo de incubación, se pesaron 60 mg de cada cepa en condiciones asépticas. Posteriormente, se procesaron las muestras como se indica en el apartado 3.3.2. Las muestras se procesaron por triplicado y se pasaron al cromatógrafo. Una vez obtenido el perfil cromatográfico de AGC se localizaron los biomarcadores obtenidos por bibliografía.

3.4.2 Confirmación de AGC biomarcadores en mezclas de bacterias “doble ciego”

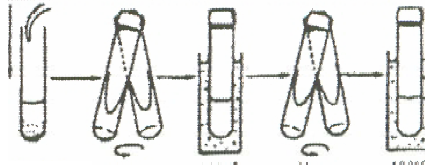
Se identificaron las bacterias presentes en dos mezclas desconocidas (doble ciego). Se sembraron 16 cepas puras en los medios de cultivo que se observan en la Tabla 3-1. Posteriormente se prepararon 2 mezclas (doble ciego) que incluyeron algunas de las 16 bacterias presentes, para lo cual se utilizaron los biomarcadores encontrados en la bibliografía y se confirmaron en el laboratorio.

Todas las cepas se sembraron por estriado continuo y se incubaron a 37 °C durante 24 horas excepto *Clostridium* que se incubó durante 3 días. Posteriormente, una persona ajena al estudio pero con conocimientos en microbiología formó 2 mezclas de bacterias como se muestra en la Tabla 3-2. Se tomaron 30 +/- 5 mg de cada cepa y se resuspendieron en solución salina al 0.85 %. Las muestras se procesaron como se indica en el apartado 3.3.2 por duplicado y se pasaron al cromatógrafo. Una vez obtenido el perfil cromatográfico de AGC se localizaron los biomarcadores y se determinaron las comunidades de bacterias. Al final se comparó lo obtenido con la Tabla 3-2.

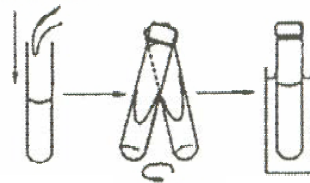
TOMA DE MUESTRA



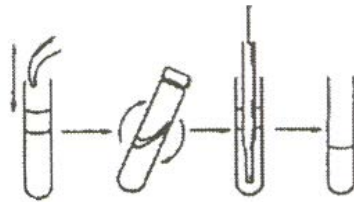
SAPONIFICACIÓN



METILACIÓN



EXTRACCIÓN



LAVADO

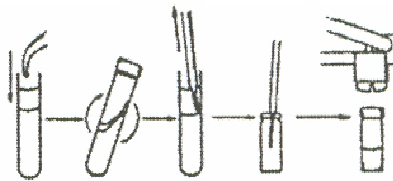


Figura 3-2. Diagrama de flujo de la técnica MIDI, Sherlock (Sasser, 2001)

Tabla 3-1. Cepas puras utilizadas en el presente estudio

Tipo de respiración	Bacteria	Tipo de medio
Aerobia	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145	Agar nutritivo
Aerobia	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Agar nutritivo
Aerobia	<i>Pseudomonas putida</i>	Agar gelosa-sangre
Aerobia	<i>Mycobacterium fortuitum</i> ATCC <u>6841</u>	Medio Lowenstein Jensen
Aerobia	<i>Alcaligenes faecalis</i>	Agar gelosa-sangre
Aerobia	<i>Acinetobacter</i>	Agar nutritivo
Facultativa	<i>Escherichia coli</i>	Agar nutritivo
Facultativa	<i>Escherichia coli</i> ATCC 9637	Agar nutritivo
Facultativa	<i>Salmonella enteritidis</i>	Agar nutritivo
Facultativa	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Agar nutritivo
Facultativa	<i>Proteus mirabilis</i>	Agar nutritivo
Anaerobia	<i>Enterococcus durans/hirae</i>	Caldo cerebro-corazón (BHI)
Anaerobia	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 6633	Agar nutritivo
Anaerobia	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 6051	Agar nutritivo
Anaerobia	<i>Micrococcus luteus</i>	Agar nutritivo
Anaerobia	<i>Clostridium</i>	Caldo cerebro-corazón (BHI)

Tabla 3-2. Mezclas de bacterias (doble ciego)

Mezcla 1	Mezcla 2	Tipo de grupo bacteriano
<i>P. aeruginosa</i>		Aerobia
<i>Acinetobacter</i>		Aerobia
<i>Alcaligenes</i>		Aerobia
<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 6633	Anaerobia
<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	Anaerobia
<i>Escherichia coli</i> ATCC 9637	<i>Escherichia coli</i>	Facultativa
	<i>Proteus mirabilis</i>	Facultativa

3.5 Factores a considerar en la metodología de los AGC biomarcadores

3.5.1 Sensibilidad de la metodología de los AGC biomarcadores

Para determinar la sensibilidad de la metodología propuesta de los AGC biomarcadores se realizaron los siguientes pasos:

De cada grupo de bacterias utilizadas en el proyecto (aerobias, facultativas y anaerobias) Tabla 3-2 se escogieron las bacterias que tuvieron biomarcadores con la abundancia más pequeña (550) al utilizar 60 mg de muestra y que al disminuir la cantidad de muestra tratada podrían desaparecer. Es decir, que no se detectarían AGC biomarcadores. Las cepas utilizadas fueron: *Proteus mirabilis*, *Salmonella enteritidis*, *Acinetobacter*, *Clostridium* y *Micrococcus luteus*.

Ya seleccionadas las cepas se sembraron por estriado continuo en los medios ya establecidos y se incubaron a 37 °C durante 24 horas excepto *Clostridium* que se incubó durante 3 días. Se pesaron las diferentes cantidades de muestra (20, 30, 40, 50 y 60 mg) y se procesaron como se indica en la Sección 3.3.2. Posteriormente se buscaron los AGC biomarcadores en cada cepa.

3.5.2 Influencia del ayuno en el perfil cromatográfico de AGC de *P. aeruginosa* ATCC 10145

3.5.2.1 Crecimiento de *P. aeruginosa* ATCC 10145

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 puso a crecer en caldo nutritivo con una concentración inicial de 100 mg/L como Carbono Orgánico Total, a 25°C y aerado con un flujo de 0.8 ml/min (Figura 3-3). Una vez que tuvo la cantidad de SSV mayor a 300 mg/l (150 NTU como turbiedad), se siguió una cinética de consumo de sustrato y se tomó muestra para determinar Cuenta Heterótrofa en Placa. Posteriormente, la biomasa se centrifugó (300 mg/l de biomasa), 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 desechó el sobrenadante; la operación se repitió una vez más.

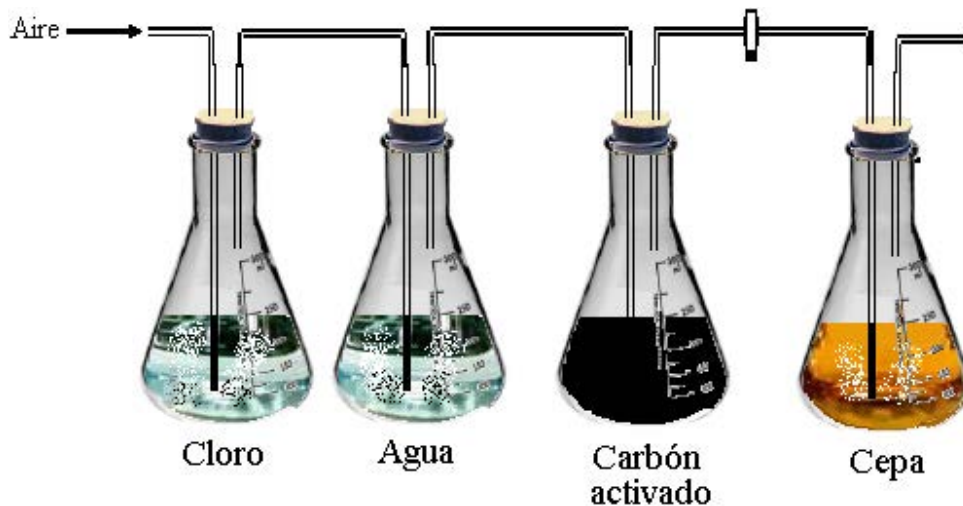


Figura 3-3. Sistema de aeración utilizado para el crecimiento de *P. aeruginosa*

3.5.2.2 Determinación del perfil de AGC después del ayuno.

La cepa se dividió en 4 matraces de 1L con volumen de reacción de 550 ml, y se dejó pasar 1, 2 3 y 5 días sin alimentar. Se tomaron muestras para determinar AGC y Cuenta Heterótrofa en Placa (CHP). Terminado el periodo de ayuno se volvió a alimentar con la concentración de 100 mg/l de COT y se siguieron las cinéticas de consumo. Todo el experimento anterior se repitió una vez más.

3.5.2.3 Viabilidad de *Pseudomonas aeruginosa* por CHP y citometría de flujo

Se tomaron muestras después del ayuno para determinar viabilidad. Para determinar células vivas se mezclaron 200 µl de muestra más 10 µl de Diacetato de fluoresceína (DAF). Para determinar células muertas se mezclaron 200 µl de muestra más 50 µl de yoduro de propidio (IP) y para determinar permeabilidad en la membrana se mezclaron 200 µl de muestra más 5 µl de Dihexilaxacarbocianina (DIOC). Las muestras con DAF se incubaron durante 30 minutos a 37 °C y las demás se mantuvieron en oscuridad a temperatura ambiente. Las muestras se pasaron a un Citómetro de flujo EPICS ALTRA de Coulter equipado con un detector láser de argón. El número de eventos que se pasaron fue de 5000 por segundo.

3.6 Aplicación de la metodología de los AGC biomarcadores

3.6.1 Plantas de tratamiento aerobias

Se tomaron muestras de plantas de tratamiento aerobias (Tabla 3-3). Se centrifugaron 9 ml de muestra a 35000 rpm durante 10 minutos y posteriormente se pesaron 60 mg de la pastilla del centrifugado en tubos de 13x100 previamente enjuagados con hexano. Las muestras se procesaron por triplicado como indica la sección 3.3.2. para obtener el perfil de AGC. Las condiciones de las plantas de tratamiento en el momento de tomar las muestras se presentan en el siguiente cuadro.

Tabla 3-3. Características de las plantas de tratamiento aerobias

Lugar de procedencia de la muestra	Tipo de agua que trata el sistema	Concentración de Oxígeno (mg/l)	% de remoción como DQO (mg/l)
Lodos Activados, Planta "Cerro de la Estrella"	Agua residual municipal	3.0	94.28
Lodos Activados, Planta "Ciudad Universitaria"	Agua residual municipal	3.0	92.0

3.6.2 Plantas de tratamiento anaerobias

Se tomaron muestras de plantas de tratamiento anaerobias (Tabla 3-4). Se centrifugaron 9 ml de muestra a 35000 rpm durante 10 minutos y posteriormente se pesaron 60 mg de muestra en tubos de 13x100 previamente enjuagados con hexano. Las muestras se procesaron por triplicado como indica la sección 3.3.2. para obtener el perfil de AGC. Las condiciones de las plantas de tratamiento en el momento de tomar las muestras se presentan en el siguiente cuadro.

Tabla 3-4. Características de las plantas de tratamiento anaerobias

Lugar de procedencia de la muestra	Tipo de agua que Trata el sistema	Potencial de oxidorreducción	Actividad metanogénica (g CH ₄ DQO/g SSV·d)
Industria Química Coatzacoalcos, Veracruz	Agua del proceso de ác. Tereftálico	-232.1	0.48
Cervecería Toluca, México	Agua del proceso de cerveza	-312.4	0.42

3.6.3 Sistema SBR alimentado con paranitrofenol

Se tomaron muestras de un sistema SBR alimentado con paranitrofenol en una concentración de 25 mg/l y con ácido propiónico (como cosustrato) en una relación 1:20 (Buitrón *et al.*, 2005). El sistema se estuvo aerando y tenía un agitador Cole Parmer modelo Servodyne® para lograr la homogeneización del sistema a 65-85 rpm, en la fase anaerobia. La temperatura se mantenía a 27 °C y el inóculo, obtenido de una planta de tratamiento de agua residual doméstica, se mantuvo como biomasa en suspensión. El reactor funcionó con una etapa anaerobia y una aerobia. Durante el primer ciclo (aclimatación), la etapa anaerobia fue de 36 horas, para los siguientes ciclos dicha etapa se redujo a 5 horas. El reactor operó con la siguiente estrategia: fase de llenado (5 min.), fase anaerobia (variable), fase aerobia (3 horas), sedimentación (30 min.) y descarga (10 min.). Las eficiencias de degradación del paranitrofenol fueron del 99 %. En el presente trabajo se tomaron muestras al día cero, 2, 6, 12 y 27 de operación del reactor para estudiar el perfil cromatográfico de AGC. Se tomaron 9 ml de muestra y se centrifugaron a

3,500 rpm durante 10 minutos. Posteriormente, se procesaron como lo indica el apartado 3.3.2 para determinar las AGC. Las muestras se procesaron por duplicado.

3.6.4 Sistema SBR alimentado con una mezcla de fenoles.

Se tomaron muestras de la biomasa suspendida y adherida a los empaques de un reactor discontinuo de lecho móvil (Buitrón *et al.*, 2006). El reactor tenía una capacidad de 12 litros y estaba empacado con cilindros de polietileno de alta densidad (BCN 009 plus, 2H Germany), Este sistema trataba un efluente sintético de una mezcla de fenoles (fenol, 4 clorofenol, 2,4 diclorofenol y 2,4,6 triclorofenol), a una concentración de 200 mg/L (50 mg/l de cada uno). El reactor trabajó a temperatura de 20 +/-2 °C. La mezcla de fenoles fue degradada con eficiencias superiores al 98% como Fenol y superior al 95 % como Carbono Orgánico Disuelto. Se tomaron muestras al tiempo cero, 20 y 45 días de operación del reactor.

Biomasa en suspensión: Se tomaron 9 ml de la biomasa en suspensión y se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 minutos. Posteriormente, la pastilla del centrifugado se procesó como se indica en la sección 3.2.2. Las muestras se procesaron por triplicado.

Biomasa adherida: Los empaques se enjuagaron con solución salina al 0.85 % y se rasparon con un escobillón estéril para después centrifugar el líquido a 3,500 rpm durante 10 minutos. Posteriormente, se procesaron las muestras por triplicado como lo indica la sección 3.3.2.

3.7 Técnicas analíticas

3.7.1 Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV)

Se determinaron de acuerdo con APHA (1992) para obtener la concentración de biomasa presente en el estudio de la influencia de ayuno y en el estudio para determinar la cantidad de muestra adecuada para el estudio del perfil de AG.

3.7.2 Carbono Orgánico Total (COT)

Las muestras fueron filtradas y se acidificaron con ácido fosfórico 1:20. Posteriormente, se determinó la concentración (mg/l) de TOC en un analizador Shimadzu 5050. Esta determinación se realizó al caldo nutritivo (Bioxon, CAT-103-1) que se utilizó y a las muestras obtenidas de las cinéticas.

3.7.3 Cuenta Heterótrofa en Placa (CHP)

Es un método utilizado para estimar el número de colonias de bacterias que se han desarrollado en cajas petri con medios de cultivo. Con éste 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 de placa difusa, en agar Cuenta Heterótrofa en Placa, CHP (Bioxon, CAT-104) según APHA, 1992.

3.7.4 Citometría de flujo

Se tomaron muestras después de cada ayuno (1, 2, 3 y 5 días) para confirmar la viabilidad de la bacteria. Para determinar células vivas se mezclaron 200 μ l de muestra más 10 μ l de Diacetato de fluoresceína (DAF). Para determinar células muertas se mezclaron 200 μ l de muestra más 50 μ l de yoduro de propidio (IP) y para determinar permeabilidad en la membrana se mezclaron 200 μ l de muestra más 5 μ l de DIOC. Las muestras con DAF se incubaron durante 30 minutos a 37 °C y las demás se mantuvieron en oscuridad a temperatura ambiente. Las muestras se pasaron a un Citómetro de flujo EPICS ALTRA de Coulter con un detector láser de argón. El número de eventos que se pasaron fue de 5000 por segundo.

3.7.5 Turbiedad

Se determinó la turbiedad mediante un espectrofotómetro DR/2000 para saber cuanta biomasa se tenía.

3.7.6 Identificación de bacterias

Se realizaron tinciones Gram a todas las bacterias para posteriormente realizar la identificación con los métodos, API 20 E, Micro Scan y BBL. En el caso de la cepa de *Mycobacterium* se realizó una tinción de Ziehl-Neelsen y se puso a crecer en medio Lowenstein Jensen durante una semana. Para diferenciar entre *M. marinum* y *M. fortuitum*, las cuales crecen en un tiempo no mayor a 7 días, la cepa se puso a crecer en un medio Mc Conkey, ya que únicamente crecen en este medio *M. fortuitum* y *M. intracellulare*.

En el caso de *Clostridium*, se sembró en caldo tioglicolato a 37 °C durante 48 horas. Se realizó un frote y se tiñó de acuerdo con las técnicas de Gram y Shaeffer-Fulton. También se realizaron pruebas de catalasa y se observó la ubicación de las endosporas.

Sistema API 20 E: Esta identificación se realizó a la cepa *P. aeruginosa* para confirmar que se trataba de una cepa pura. El sistema API 20-E es utilizado para la identificación de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* y otros bacilos Gram negativos.

Sistema Micro Scan: Sistema Micro Scan: Es una prueba miniaturizada con reactivos deshidratados, los páneces se inoculan y rehidratan con una suspensión de microorganismos estandarizada. Se incuban a 35 °C por un mínimo de 16 horas. Las pruebas se leen en un lector automático que esta conectado a una computadora, la cual tiene una base de datos para la identificación de las muestras (Trademark of 3M Company, 1999). Con este sistema se identificaron bacterias aerobias y facultativas. Para todos los sistemas de identificación utilizados fue necesario crecer las cepas en medios adecuados, de tal modo que las bacterias facultativas crecieron en agar nutritivo, las aerobias en agar nutritivo y agar gelosa-sangre y para bacterias anaerobias se crecieron en agar nutritivo o en caldo cerebro-corazón en condiciones anaerobias.

3.7.7 Espectroscopía de masas:

En el espectrofotómetro de masas los componentes se convierten en iones gaseosos. A menudo el sistema de entrada contiene un medio para la volatilización de muestras sólidas y líquidas. La fuente de iones de un espectrómetro de masas convierte los componentes de una muestra en iones por bombardeo con electrones, iones, moléculas o fotones. Alternativamente, la ionización se lleva a cabo por energía térmica o eléctrica. En muchos casos el sistema de entrada y la fuente de iones están combinadas en un único componente. En ambos casos, lo que se obtiene es un haz de iones positivos o negativos (frecuentemente positivos) que es entonces acelerado en el analizador de masas (Skoog and Leary, 1994).

La función del analizador de masas es parecida a la de la rejilla de un espectrómetro óptico. En el primero, sin embargo, la dispersión está basada en las relaciones carga/masa de los iones del analito en vez de en la longitud de onda de los fotones. El espectrómetro de masas contiene un detector (para iones) que convierte el haz de iones en una señal eléctrica que puede ser

entonces procesada, almacenada en la memoria de un ordenador y mostrada o registrada de varias maneras.

La cromatografía de gases/espectrometría de masas (CG/MS) se ha convertido en una de las más poderosas herramientas al alcance de los químicos para el análisis de mezclas orgánicas y bioquímicas complejas (Skoog and Leary, 1994).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Obtención de Ácidos Grasos Celulares Biomarcadores

4.1.1 Revisión bibliográfica de las bacterias presentes en sistemas de tratamiento de aguas residuales

Las bacterias encontradas en la bibliografía en los sistemas de tratamiento de aguas residuales se encuentran en la Tabla 1 del anexo 2. Posteriormente, se buscaron los perfiles cromatográficos de los ácidos grasos celulares que corresponden a algunas de las bacterias encontradas en sistemas aerobios y anaerobias (Tabla 4-1). El porcentaje de área fue obtenido respecto al total de AGC y se reportó como intervalo porque los datos se obtuvieron de diferentes fuentes. Cuando el ácido graso no se encontraba se incluyó el cero en el intervalo. Cabe mencionar que los perfiles cromatográficos de las demás bacterias no se pudieron obtener ya que no se tenían disponibles en la bibliografía. Por otra parte en los sistemas de tratamiento anaerobio se tiene la presencia de bacterias metanogénicas, de las cuales no se pudo obtener el perfil de ácidos grasos celulares. Esto debido a que son el grupo más primitivo de procariontes (arqueas) y son diferentes a las eubacterias, en la constitución de su membrana. Los lípidos de las arqueobacterias están ligados al glicerol por medio de un enlace éter ($-\text{CH}_2\text{-O-CH}_2-$) y no por una unión éster ($-\text{CH}_2\text{-O-CO-CH}_2$), como comúnmente se encuentran en las eubacterias (Ratledge, 1996). Debido a esta diferencia, no es posible identificar las arqueas con técnicas cromatográficas que detecten el perfil de AGC.

4.1.1.1 Análisis cualitativo

Una vez obtenido el perfil cromatográfico de AGC de cada bacteria, se dividieron en grupos de acuerdo con su tipo de aceptor final de electrones (aerobias, facultativas y anaerobias) y se obtuvieron los AG biomarcadores. Es decir, se separaron aquellos ácidos que fueran únicos de un grupo de bacterias de acuerdo con su tipo de aceptor final de electrones. Es interesante observar que algunos ácidos grasos saturados y algunos con grupo hidroxilo (de 10, 12 y 18 carbonos) son biomarcadores de bacterias aerobias, mientras que algunos ácidos ramificados

y algunos hidroxí (de 14 carbonos) son biomarcadores de bacterias anaerobias. En el caso de bacterias facultativas se tienen diversos ácidos grasos biomarcadores incluyendo algunos ácidos insaturados, ramificados, con grupo hidroxí y ciclopropanos.

Tabla 4-1. AGC biomarcadores obtenidos del análisis de la literatura

AGC biomarcadores	Porcentaje de área	Tipo de bacteria	Ejemplo de bacterias (género o grupo)	Referencias
3OH10:0	14.6-20.3	Aerobias	<i>Alcaligenes</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Alteromonas</i> (grupo) Actinomicetos (grupo) Nocardioformes	Bøe and Gjerde (1980), Laskin y Lechevalier (1981), Vestal and White (1989), Welch (1991), Rajendran <i>et al.</i> (1992), McNabb <i>et al.</i> (1997), Sundh <i>et al.</i> (1997), Bossio and Scow (1998), Tsitko <i>et al.</i> (1999), Gomez-Gil <i>et al.</i> (2003), Ivanona <i>et al.</i> (2005), Jung <i>et al.</i> (2005). Banowetz <i>et al.</i> (2006).
2OH12:0	2.4-18.5			
3OH12:0	4.6-35.2			
15:1 ω 5c	0-1.6			
2OH18:0	0-3.8			
10ME18:0	1.3-28.7			
22:0	3.0-4.0			
24:0	3.0-25.0			
26:0	0.7-7.2			
11:0	0-1.1	Facultativas aerobia	<i>Salmonella</i> <i>E. coli</i> <i>Klebsiella</i> <i>Staphylococcus</i>	Laskin y Lechevalier (1981), Vestal and White (1989), Gomez-Gil <i>et al.</i> (2003)
2OH14:0	0-0.6			
3OH14:0	3.6-7.9			
15:0 cy	0-20.3			
18:1 ω ^{9,11}	0-18.5			
a19:0	0-36.2			
i12:0	0.1-0.6	Anaerobias	<i>Bacillus</i> <i>Cytophaga</i> <i>Sarcina</i> <i>Clostridium</i> <i>Pectinatus</i> <i>Macrococcus</i> (grupo) Sulfato-reductoras	Laskin y Lechevalier (1981), Dowling <i>et al.</i> (1986), Vestal and White (1989), Rajendran <i>et al.</i> (1992), Haack <i>et al.</i> (1994), Sundh <i>et al.</i> (1997), Yamamoto <i>et al.</i> (1998), Bossio and Scow (1998), Chihib <i>et al.</i> (1999). Mannerová <i>et al.</i> (2003), Scheldeman <i>et al.</i> (2004).
a14:0	0-4.5			
14:1 ω 7	0-2.7			
15:1 ω 6	0-4.6			
a16:0	0-5.3			
16:1 ω 5	1.3-2			
a17:1	0-4.6			
i17:0	0-15.5			
i17:1	1.9-40.72			
a18:0	38.1-63.9			
i18:1 ω 7c	0-3.8			
17:1 ω 6	0-8.9			
Oh18:0	0-10.9			
OH19:0	0-19.6			

El ácido 10ME18:0 se encuentra únicamente en bacterias aerobias y en el género *Desulfobacter* (bacteria anaerobia). Es decir, no se encuentra únicamente en un grupo. Sin embargo, en el género *Desulfobacter* se presenta en un porcentaje pequeño (0-0.5%) en

comparación con el porcentaje presente en actinomicetos (1.3% a 28.7%) con un valor promedio de 1.32+/- 3.2%. Por lo anterior se puede considerar biomarcador de bacterias aerobias. Cabe mencionar que las bacterias aerobias que presentan dicho AGC son bacterias del grupo de las nocardioformes (como *Rhodococcus* y *Nocardia*) y actinomicetos (como *Mycobacterium*).

En el caso de *Streptomyces* que es un actinomiceto, no presenta el ácido 10ME18:0 y además presenta ácidos ramificados, los cuales se consideran típicos de bacterias anaerobias. Por lo anterior se puede decir que *Streptomyces* es un caso excepcional.

En el caso de los ácidos i15:0, a15:0 y a17:0 (Tabla 2, anexo2) se encuentran en bacterias facultativas y en el género *Streptomyces*, en éste último en porcentaje pequeño (1.2-3.3). Lo anterior indica que la ausencia de dichos ácidos puede ser una herramienta útil para descartar bacterias aerobias.

Es posible encontrar algunos ácidos grasos como biomarcadores de grupos más específicos de bacterias como por ejemplo: en el caso de las bacterias aerobias se tienen los ácidos 10ME18:0 y el 15:1 ω 5c que son biomarcadores del grupo de las nocardias y actinomicetos (Tabla 4-1), mientras que dentro del grupo de bacterias anaerobias se tiene el ácido biomarcador a18:0 que se encuentra únicamente en *Sarcina lutea* y *Bacillus*, en porcentajes considerables (38.7-63.86).

4.1.1.2 Análisis cuantitativo (ACP)

Se realizó un Análisis multivariado llamado Análisis de Componentes Principales (ACP) para analizar los datos de forma cuantitativa. El propósito del ACP es obtener un número pequeño de combinaciones lineales a partir de muchas variables. En el presente trabajo se analizaron las bacterias y los AGC, es decir primero se analizaron los ácidos grasos y posteriormente se analizaron las bacterias (su posición y agrupación).

a) Análisis de Ácidos Grasos Celulares. La prueba de ACP permitió la formación de cinco grupos (Figura 4-1). Se puede observar que en el Grupo I se incluyen únicamente ácidos grasos ramificados y el insaturado 14:1 ω 7, que de acuerdo con el análisis cualitativo (Tabla 4-1) se trata de AG presentes en mayor proporción en bacterias anaerobias. En el caso del grupo II se encuentran incluidos la mayor parte de los ácidos insaturados, los cuales también se

encuentran en mayor proporción en bacterias anaerobias. La mayoría de los ácidos grasos incluidos en el grupo III son hidroxilados y saturados, lo que cualitativamente indica que son AGC biomarcadores de bacterias aerobias (Tabla 4-1). También se incluyen los ciclopropanos y pocos ramificados e insaturados que, de acuerdo con el análisis cualitativo, en su mayoría no son biomarcadores de ningún grupo de bacterias, excepto el ácido $18:1\omega^{9y11}$, $a19:0$ y $15:0cy$.

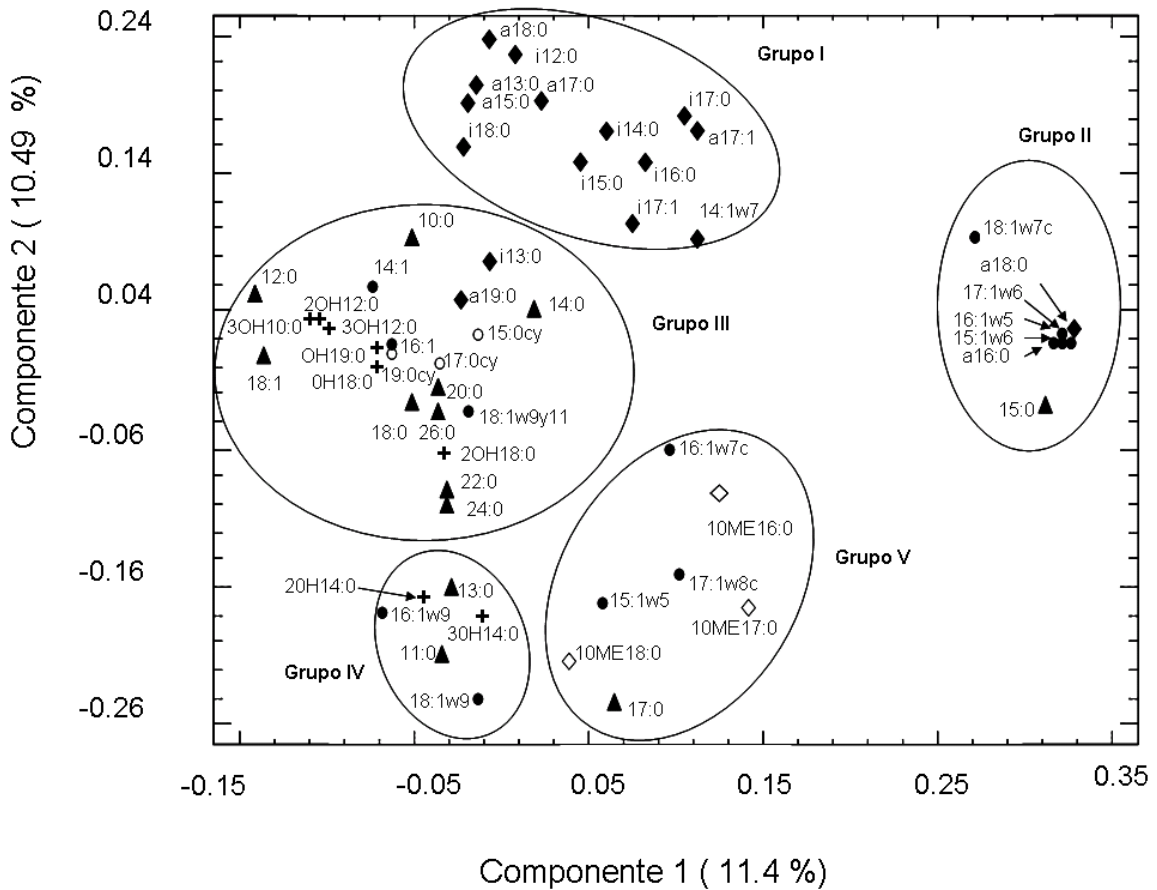


Figura 4-1. Grupos de AGC formados por el ACP. \blacklozenge ramificados, \bullet Monoinsaturados, \blacktriangle Saturados \blacklozenge con grupos metilo, $+$ con grupos hidroxilados, \odot ciclopropanos

En el grupo IV se incluyen AGC biomarcadores de bacterias facultativas como son el AG saturado $11:0$ y ácidos grasos con grupo hidroxilado de 14 carbonos ($3OH14:0$ y $2OH14:0$). Es importante observar que los AGC con grupo hidroxilado son biomarcadores de bacterias aerobias y facultativas, sin embargo para el caso de bacterias aerobias son AGC con grupo hidroxilado de 10 ,

12 y 18 carbonos a diferencia de los biomarcadores de bacterias facultativas que son de 14 carbonos.

El grupo V incluye AGC insaturados y ramificados de 15 a 17 carbonos, los cuales son AGC biomarcadores de bacterias aerobias. En este último caso, de acuerdo con los datos utilizados en el ACP (Tabla 2 del Anexo 2), este grupo estaría indicando, en especial AGB para bacterias aerobia del grupo de las nocardias, actinomicetos y micobacterias.

Si se observa la gráfica de los eigenvalores (Figura 4-2) se puede observar que se necesitan 17 componentes para explicar la variabilidad de más del 80 % de los datos originales. Lo anterior no es muy alentador, ya que el primero, segundo y tercer componentes principales comprendieron el 11.41, 10.49 y 8.95 % respectivamente de la varianza de las 53 variables iniciales. Por lo tanto, se tiene un porcentaje acumulado del 31.36 % para los tres primero componentes principales. Esto quiere decir que el ACP no pudo explicar un buen porcentaje de variabilidad de los datos originales con pocos componentes. Por lo anterior, se decidió realizar el ACP de tal modo que se agruparan las bacterias. Es decir, agrupar las bacterias en función de los AGC.

b) Análisis de bacterias. Los resultados mostraron que se necesitan 8 componentes principales para explicar la variabilidad del 81.95% de los datos originales (Figura 4-3). El primero, segundo y tercer componentes principales resumen el 38.04, 10.92 y 9.92 % respectivamente, lo cual indica que con los tres primeros componentes principales se tiene un porcentaje acumulado de 58.89 de los datos originales (39 especies de bacterias y 58 ácidos grasos).

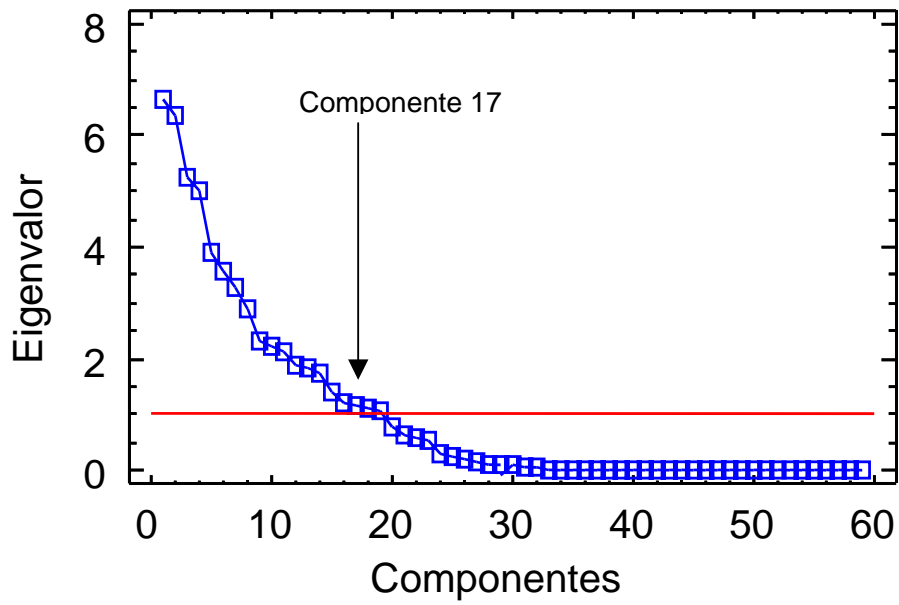


Figura 4-2. Eigenvalores obtenidos por el ACP al analizar los AGC

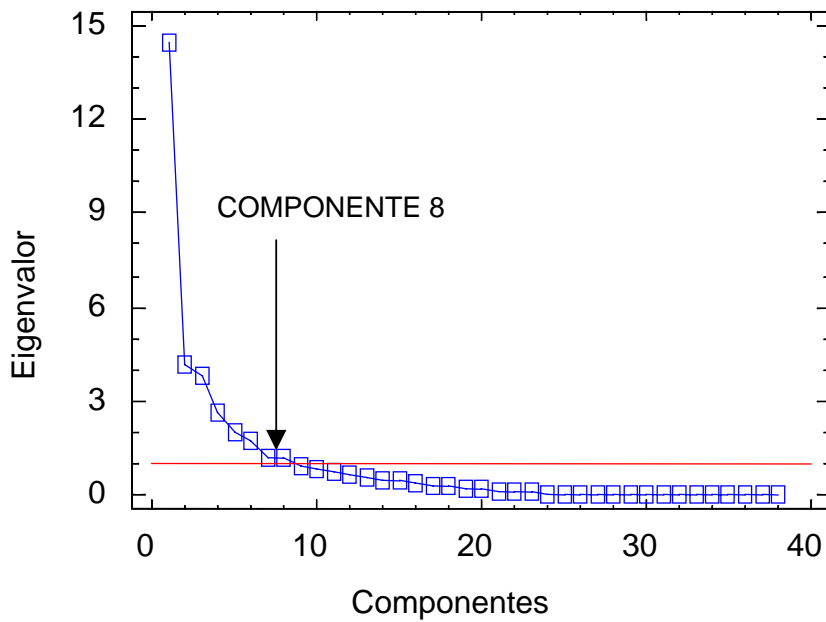


Figura 4-3. Eigenvalores obtenidos por el ACP al analizar las bacterias

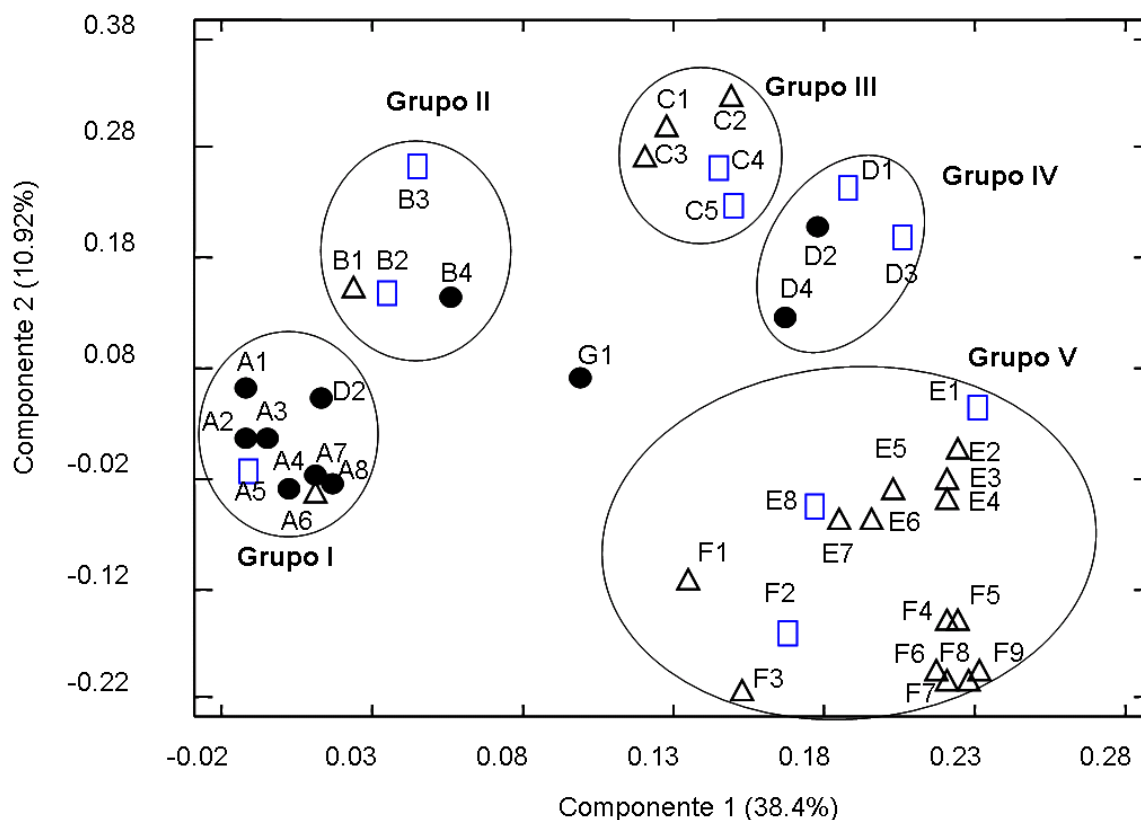


Figura 4-4. AGC presentes en cada grupo formado por el ACP. Bacterias aerobias Δ , facultativas \square , anaerobias \bullet **Grupo I:** A1) *Bacillus licheniformis* A2) *Sarcina lutea*, A3) *Amycolaptosis* sp., A4) *Corynebacterium* sp., A5) *Staphylococcus* sp., A6) *Streptomyces* sp., A7) *Desulfobacter* spp., A8) *Desulfovibrio desulfuricans*. **Grupo II:** B1) *Flavobacterium* sp., B2) *Escherichia coli*, B3) *Achromobacter* sp., B4) *Coryneform* sp., **Grupo III:** C1) *Alcaligenes* sp., C2) *Micrococcus* sp., C3) *Pseudomonas aeruginosa*, C4) *Lactobacillus* sp., C5) *Aeromonas* sp., **Grupo IV:** D1) *Vibrio cholerae*, D2) *Bifidobacterium* sp., D3) *Streptococcus* sp., D4) *Clostridium* spp., **Grupo V:** E1) *Proteus vulgaris*, E2) *Pseudomonas aeruginosa*, E3) *Mycobacterium* spp., E4) *Pseudomonas* spp., E5) *Rhodococcus globerulus*, E6) *Gordona* spp., E7) *Mycobacterium fortuitum*, E8) *Klebsiella* sp., F1) *Rhodococcus caprophylyus*, F2) *Salmonella* sp., F3) *Nocardia asteroides*, F4) *Rhodococcus erythropolis*, F5) *Rhodococcus equi*, F6) *Rhodococcus rhodochrous*, F7) *Tsukamurella paurometabola*, F8) *Nocardia farcinica*, F9) *Nocardia otitidiscaviarum*, G1) *Bacteroides*.

Con el análisis de componentes principales se pudieron observar 5 grupos de bacterias (Figura 4.4) constituidos de la siguiente manera: Grupo I (Anaerobias Gram positivas o negativas y facultativas Gram positivas), Grupo II (Anaerobias Gram negativas y facultativas Gram

negativas), Grupo III (Aerobias Gram positivas o negativas y facultativas Gram positivas o negativas), Grupo IV (Anaerobias Gram positivas o negativas y facultativas Gram negativas), Grupo V (Aerobias Gram positivas o negativas y facultativas Gram negativas).

Es decir, el análisis permitió dividir las bacterias anaerobias de las aerobias claramente. Sin embargo, las bacterias facultativas están distribuidas en todos los grupos, lo cual podría indicar la afinidad de las bacterias facultativas hacia un tipo de respiración (aerobio o anaerobio). Por ejemplo *Salmonella* es una bacteria facultativa y se encuentra en el grupo de las bacterias aerobias. En el caso de *Vibrio* y *Escherichia* que son también facultativas se encuentran compartiendo el grupo con bacterias anaerobias.

La bibliografía reporta que el género *Streptomyces* tiene respiración aerobia (Pelczar y Chan, 1988). Sin embargo, el ACP lo agrupa con las bacterias anaerobias (indicado como A6). Esto se debe a que es un actinomiceto Gram positivo, que presenta ácidos grasos ramificados (i15:0, a15:0, i16:0, a16:0, i17:0 y a17:0) como la mayoría de las bacterias anaerobias encontradas en los sistemas de tratamiento de aguas residuales (Ver Tabla 2 en el anexo 2). Con respecto a *Bacteroides*, se trata de una bacteria anaerobia. Sin embargo, con el ACP se encuentra alejada de ese grupo. Esto se debe a que en la bibliografía se reporta que tiene pocos ácidos grasos ramificados (i14:0, i16:0) en comparación con otras bacterias anaerobias (Ver Tabla 2 en el anexo 2).

En conclusión, el ACP permitió confirmar lo que se obtuvo con el análisis cualitativo. Además, como se pudo observar, los AGC están relacionados con el tipo de respiración de las bacterias.

4.2 Técnicas para determinar AGC

4.2.1 Técnica de Muñoz *et al.* (1997)

Se ha reportado que en las plantas de tratamiento de aguas residuales se encuentran presentes bacterias del género *Mycobacterium*, especialmente en sistemas de lodos activados (Blackall and Burrell, 1999). También en los sistemas que degradan compuestos tóxicos como fenoles, se ha reportado la presencia de *Mycobacterium*, esto debido a que utilizan los lodos activados para el arranque de los sistemas que tratan dichos compuestos tóxicos. Las especies

encontradas son *Mycobacterium peregrinum* y *Mycobacterium fortuitum* (Buitrón y González, 1996).

Buitrón y González, 1996 reportan que en sistemas que degradan mezclas de fenoles (2 clorofenol, 2,4 diclorofenol y 2,4,6 triclorofenol), se han aislado e identificado bacterias del género *Mycobacterium*.

La técnica MIDI Sherlock (Sasser, 2001) es una de las más sencillas y comúnmente utilizadas para obtener el perfil de AGC de muchas bacterias. Sin embargo, en el caso de bacterias de género *Mycobacterium* no es fácil obtener su perfil cromatográfico de AGC, esto se debe a que su pared celular tiene una constitución especial y diferente a otras bacterias. Las micobacterias presentan su pared celular con un alto contenido de lípidos (superior al 60 %) incluyendo ceras A, B, C y D, unidos a polisacáridos como las glucanas, mananas, arabinogalactanas y arabinomananas. Además, presentan glicolípidos, ácidos micólicos, micósidos C y proteínas.

Ésta constitución de las micobacterias las hace resistentes a algunos ácidos y alcoholes. En especial los ácidos micólicos con cadena de 22 a 26 carbonos no son liberados con el tratamiento MIDI (Figura 4-5) y por lo tanto no es posible cuantificarlos (Müller *et al.*, 1998). Estos autores proponen la utilización de la técnica MIDI modificada adicionando al tratamiento una pirrólisis con un hidróxido de trimetilsulfonio. Sin embargo, una técnica también utilizada es la de Muñoz *et al.*, 1997, ya que utiliza hidróxido de potasio y una mezcla de metanol-benceno. Este último permite la extracción de los AGC de 22 a 26 carbonos.

En la Figura 4-6 se puede observar el perfil de AGC de *Mycobacterium fortuitum*, obtenido con la técnica de Muñoz *et al.*, 1997. La bacteria tiene ácidos grasos saturados (13:0, 16:0 y 18:0), el ácido tuberculoesteárico (10ME18:0) y ácidos saturados de 22 y 24 carbonos (22:0 y 24:0). Como se puede observar, los ácidos 22:0 y 24:0 si se pueden extraer con la técnica de Muñoz *et al.*, 1997.

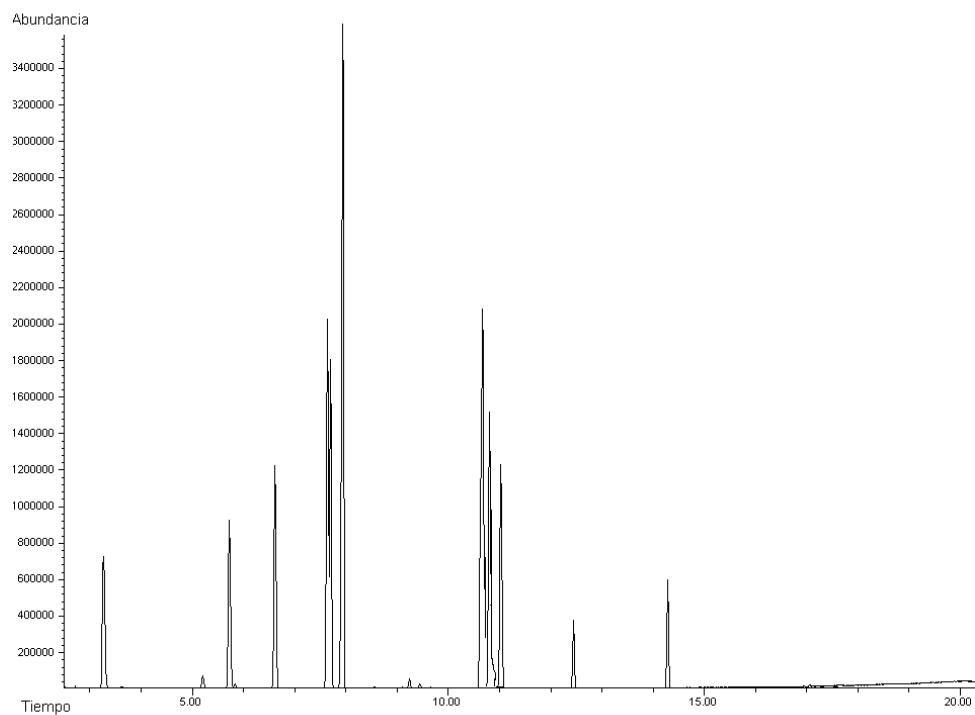
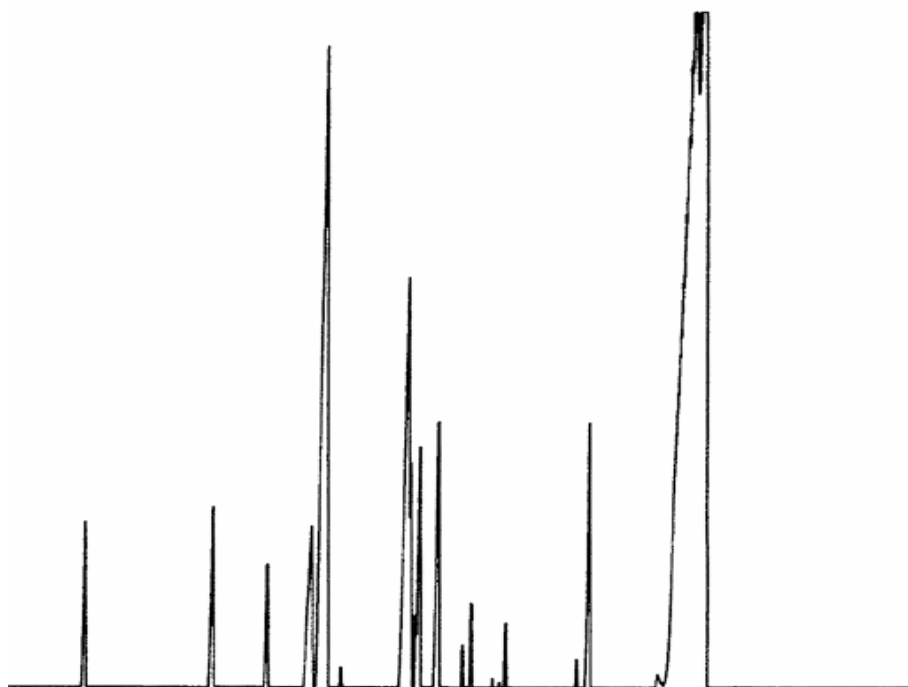


Figura 4-5. Perfil cromatográfico de AGC en *Mycobacterium* (MIDI, Sherlock 2001)



CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Obtención de Ácidos Grasos Celulares Biomarcadores

4.1.1 Revisión bibliográfica de las bacterias presentes en sistemas de tratamiento de aguas residuales

Las bacterias encontradas en la bibliografía en los sistemas de tratamiento de aguas residuales se encuentran en la Tabla 1 del anexo 2. Posteriormente, se buscaron los perfiles cromatográficos de los ácidos grasos celulares que corresponden a algunas de las bacterias encontradas en sistemas aerobios y anaerobias (Tabla 4-1). El porcentaje de área fue obtenido respecto al total de AGC y se reportó como intervalo porque los datos se obtuvieron de diferentes fuentes. Cuando el ácido graso no se encontraba se incluyó el cero en el intervalo. Cabe mencionar que los perfiles cromatográficos de las demás bacterias no se pudieron obtener ya que no se tenían disponibles en la bibliografía. Por otra parte en los sistemas de tratamiento anaerobio se tiene la presencia de bacterias metanogénicas, de las cuales no se pudo obtener el perfil de ácidos grasos celulares. Esto debido a que son el grupo más primitivo de procariontes (arqueas) y son diferentes a las eubacterias, en la constitución de su membrana. Los lípidos de las arqueobacterias están ligados al glicerol por medio de un enlace éter ($-\text{CH}_2\text{-O-CH}_2-$) y no por una unión éster ($-\text{CH}_2\text{-O-CO-CH}_2$), como comúnmente se encuentran en las eubacterias (Ratledge, 1996). Debido a esta diferencia, no es posible identificar las arqueas con técnicas cromatográficas que detecten el perfil de AGC.

4.1.1.1 Análisis cualitativo

Una vez obtenido el perfil cromatográfico de AGC de cada bacteria, se dividieron en grupos de acuerdo con su tipo de aceptor final de electrones (aerobias, facultativas y anaerobias) y se obtuvieron los AG biomarcadores. Es decir, se separaron aquellos ácidos que fueran únicos de un grupo de bacterias de acuerdo con su tipo de aceptor final de electrones. Es interesante observar que algunos ácidos grasos saturados y algunos con grupo hidroxilo (de 10, 12 y 18 carbonos) son biomarcadores de bacterias aerobias, mientras que algunos ácidos ramificados

y algunos hidroxí (de 14 carbonos) son biomarcadores de bacterias anaerobias. En el caso de bacterias facultativas se tienen diversos ácidos grasos biomarcadores incluyendo algunos ácidos insaturados, ramificados, con grupo hidroxí y ciclopropanos.

Tabla 4-1. AGC biomarcadores obtenidos del análisis de la literatura

AGC biomarcadores	Porcentaje de área	Tipo de bacteria	Ejemplo de bacterias (género o grupo)	Referencias
3OH10:0	14.6-20.3	Aerobias	<i>Alcaligenes</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Alteromonas</i> (grupo) Actinomicetos (grupo) Nocardioformes	Bøe and Gjerde (1980), Laskin y Lechevalier (1981), Vestal and White (1989), Welch (1991), Rajendran <i>et al.</i> (1992), McNabb <i>et al.</i> (1997), Sundh <i>et al.</i> (1997), Bossio and Scow (1998), Tsitko <i>et al.</i> (1999), Gomez-Gil <i>et al.</i> (2003), Ivanona <i>et al.</i> (2005), Jung <i>et al.</i> (2005). Banowetz <i>et al.</i> (2006).
2OH12:0	2.4-18.5			
3OH12:0	4.6-35.2			
15:1 ω 5c	0-1.6			
2OH18:0	0-3.8			
10ME18:0	1.3-28.7			
22:0	3.0-4.0			
24:0	3.0-25.0			
26:0	0.7-7.2			
11:0	0-1.1	Facultativas aerobia	<i>Salmonella</i> <i>E. coli</i> <i>Klebsiella</i> <i>Staphylococcus</i>	Laskin y Lechevalier (1981), Vestal and White (1989), Gomez-Gil <i>et al.</i> (2003)
2OH14:0	0-0.6			
3OH14:0	3.6-7.9			
15:0 cy	0-20.3			
18:1 ω ^{9,11}	0-18.5			
a19:0	0-36.2			
i12:0	0.1-0.6	Anaerobias	<i>Bacillus</i> <i>Cytophaga</i> <i>Sarcina</i> <i>Clostridium</i> <i>Pectinatus</i> <i>Macrococcus</i> (grupo) Sulfato-reductoras	Laskin y Lechevalier (1981), Dowling <i>et al.</i> (1986), Vestal and White (1989), Rajendran <i>et al.</i> (1992), Haack <i>et al.</i> (1994), Sundh <i>et al.</i> (1997), Yamamoto <i>et al.</i> (1998), Bossio and Scow (1998), Chihib <i>et al.</i> (1999). Mannerová <i>et al.</i> (2003), Scheldeman <i>et al.</i> (2004).
a14:0	0-4.5			
14:1 ω 7	0-2.7			
15:1 ω 6	0-4.6			
a16:0	0-5.3			
16:1 ω 5	1.3-2			
a17:1	0-4.6			
i17:0	0-15.5			
i17:1	1.9-40.72			
a18:0	38.1-63.9			
i18:1 ω 7c	0-3.8			
17:1 ω 6	0-8.9			
Oh18:0	0-10.9			
OH19:0	0-19.6			

El ácido 10ME18:0 se encuentra únicamente en bacterias aerobias y en el género *Desulfobacter* (bacteria anaerobia). Es decir, no se encuentra únicamente en un grupo. Sin embargo, en el género *Desulfobacter* se presenta en un porcentaje pequeño (0-0.5%) en

comparación con el porcentaje presente en actinomicetos (1.3% a 28.7%) con un valor promedio de 1.32+/- 3.2%. Por lo anterior se puede considerar biomarcador de bacterias aerobias. Cabe mencionar que las bacterias aerobias que presentan dicho AGC son bacterias del grupo de las nocardioformes (como *Rhodococcus* y *Nocardia*) y actinomicetos (como *Mycobacterium*).

En el caso de *Streptomyces* que es un actinomiceto, no presenta el ácido 10ME18:0 y además presenta ácidos ramificados, los cuales se consideran típicos de bacterias anaerobias. Por lo anterior se puede decir que *Streptomyces* es un caso excepcional.

En el caso de los ácidos i15:0, a15:0 y a17:0 (Tabla 2, anexo2) se encuentran en bacterias facultativas y en el género *Streptomyces*, en éste último en porcentaje pequeño (1.2-3.3). Lo anterior indica que la ausencia de dichos ácidos puede ser una herramienta útil para descartar bacterias aerobias.

Es posible encontrar algunos ácidos grasos como biomarcadores de grupos más específicos de bacterias como por ejemplo: en el caso de las bacterias aerobias se tienen los ácidos 10ME18:0 y el 15:1 ω 5c que son biomarcadores del grupo de las nocardias y actinomicetos (Tabla 4-1), mientras que dentro del grupo de bacterias anaerobias se tiene el ácido biomarcador a18:0 que se encuentra únicamente en *Sarcina lutea* y *Bacillus*, en porcentajes considerables (38.7-63.86).

4.1.1.2 Análisis cuantitativo (ACP)

Se realizó un Análisis multivariado llamado Análisis de Componentes Principales (ACP) para analizar los datos de forma cuantitativa. El propósito del ACP es obtener un número pequeño de combinaciones lineales a partir de muchas variables. En el presente trabajo se analizaron las bacterias y los AGC, es decir primero se analizaron los ácidos grasos y posteriormente se analizaron las bacterias (su posición y agrupación).

a) Análisis de Ácidos Grasos Celulares. La prueba de ACP permitió la formación de cinco grupos (Figura 4-1). Se puede observar que en el Grupo I se incluyen únicamente ácidos grasos ramificados y el insaturado 14:1 ω 7, que de acuerdo con el análisis cualitativo (Tabla 4-1) se trata de AG presentes en mayor proporción en bacterias anaerobias. En el caso del grupo II se encuentran incluidos la mayor parte de los ácidos insaturados, los cuales también se

encuentran en mayor proporción en bacterias anaerobias. La mayoría de los ácidos grasos incluidos en el grupo III son hidroxilados y saturados, lo que cualitativamente indica que son AGC biomarcadores de bacterias aerobias (Tabla 4-1). También se incluyen los ciclopropanos y pocos ramificados e insaturados que, de acuerdo con el análisis cualitativo, en su mayoría no son biomarcadores de ningún grupo de bacterias, excepto el ácido $18:1\omega^{9y11}$, $a19:0$ y $15:0cy$.

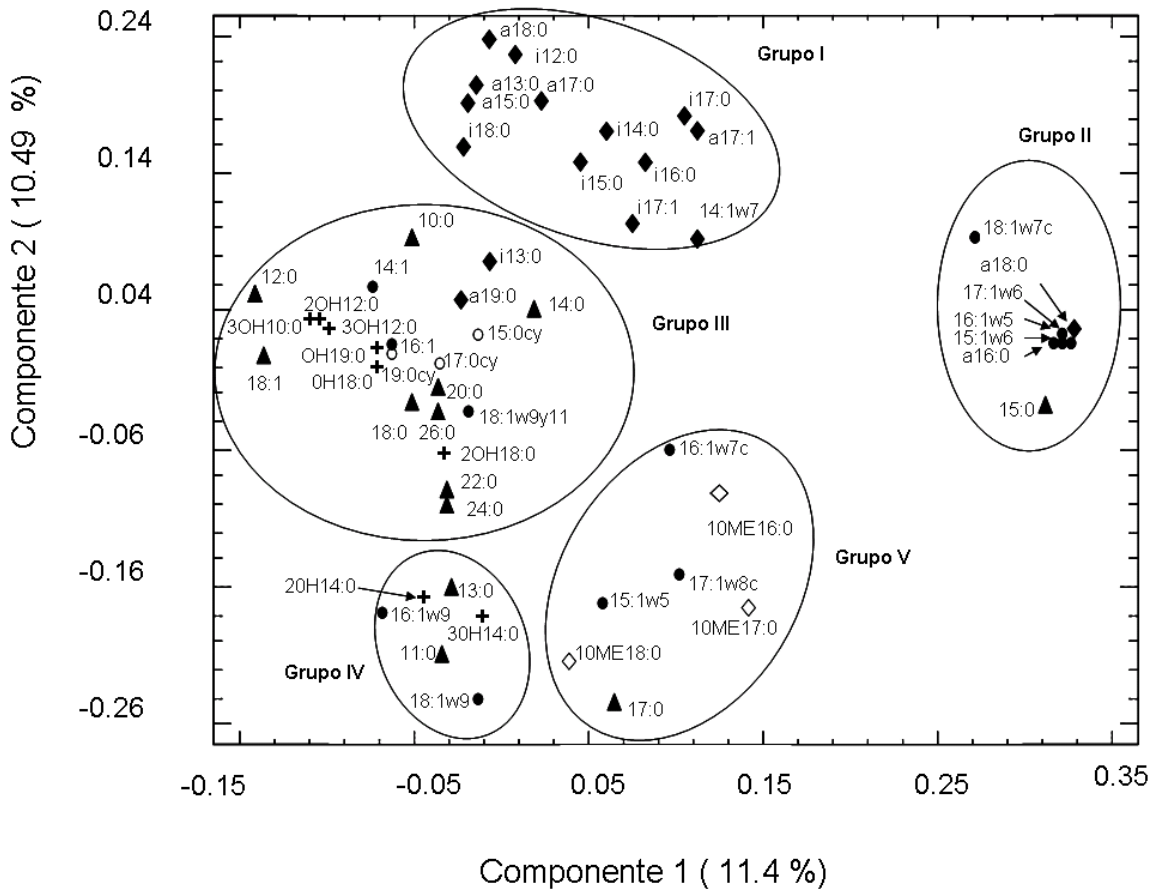


Figura 4-1. Grupos de AGC formados por el ACP. \blacklozenge ramificados, \bullet Monoinsaturados, \blacktriangle Saturados \diamond con grupos metilo, $+$ con grupos hidroxilados, \circ ciclopropanos

En el grupo IV se incluyen AGC biomarcadores de bacterias facultativas como son el AG saturado $11:0$ y ácidos grasos con grupo hidroxilado de 14 carbonos ($3OH14:0$ y $2OH14:0$). Es importante observar que los AGC con grupo hidroxilado son biomarcadores de bacterias aerobias y facultativas, sin embargo para el caso de bacterias aerobias son AGC con grupo hidroxilado de 10 ,

12 y 18 carbonos a diferencia de los biomarcadores de bacterias facultativas que son de 14 carbonos.

El grupo V incluye AGC insaturados y ramificados de 15 a 17 carbonos, los cuales son AGC biomarcadores de bacterias aerobias. En este último caso, de acuerdo con los datos utilizados en el ACP (Tabla 2 del Anexo 2), este grupo estaría indicando, en especial AGB para bacterias aerobia del grupo de las nocardias, actinomicetos y micobacterias.

Si se observa la gráfica de los eigenvalores (Figura 4-2) se puede observar que se necesitan 17 componentes para explicar la variabilidad de más del 80 % de los datos originales. Lo anterior no es muy alentador, ya que el primero, segundo y tercer componentes principales comprendieron el 11.41, 10.49 y 8.95 % respectivamente de la varianza de las 53 variables iniciales. Por lo tanto, se tiene un porcentaje acumulado del 31.36 % para los tres primero componentes principales. Esto quiere decir que el ACP no pudo explicar un buen porcentaje de variabilidad de los datos originales con pocos componentes. Por lo anterior, se decidió realizar el ACP de tal modo que se agruparan las bacterias. Es decir, agrupar las bacterias en función de los AGC.

b) Análisis de bacterias. Los resultados mostraron que se necesitan 8 componentes principales para explicar la variabilidad del 81.95% de los datos originales (Figura 4-3). El primero, segundo y tercer componentes principales resumen el 38.04, 10.92 y 9.92 % respectivamente, lo cual indica que con los tres primeros componentes principales se tiene un porcentaje acumulado de 58.89 de los datos originales (39 especies de bacterias y 58 ácidos grasos).

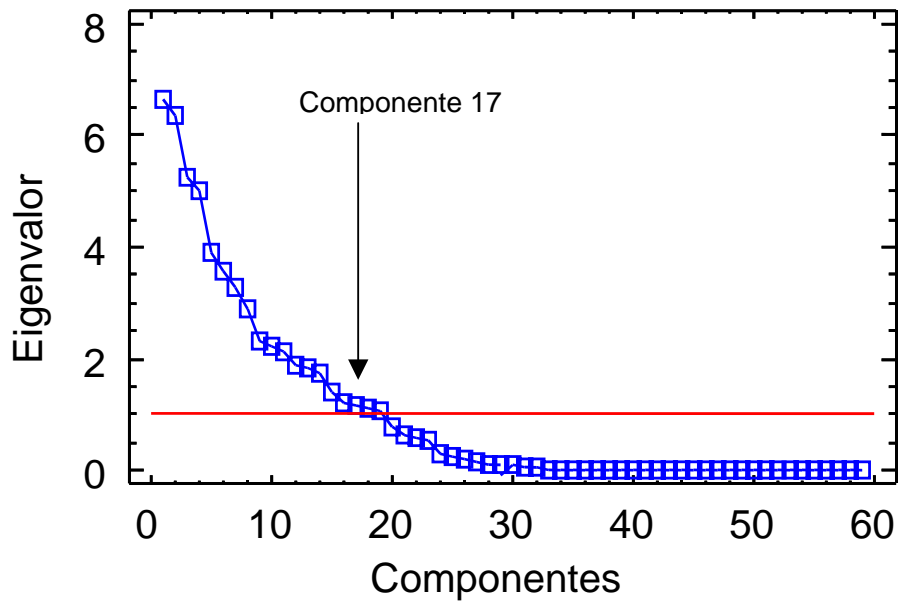


Figura 4-2. Eigenvalores obtenidos por el ACP al analizar los AGC

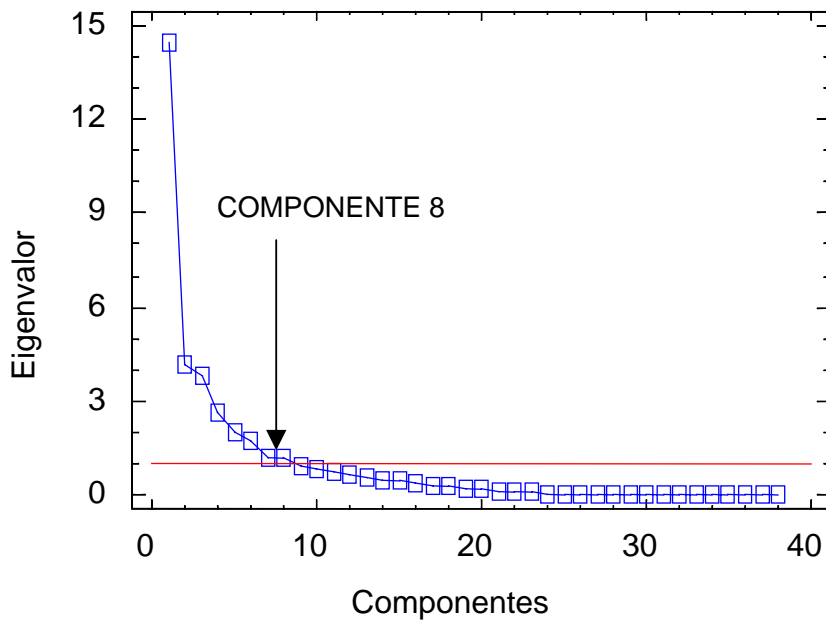


Figura 4-3. Eigenvalores obtenidos por el ACP al analizar las bacterias

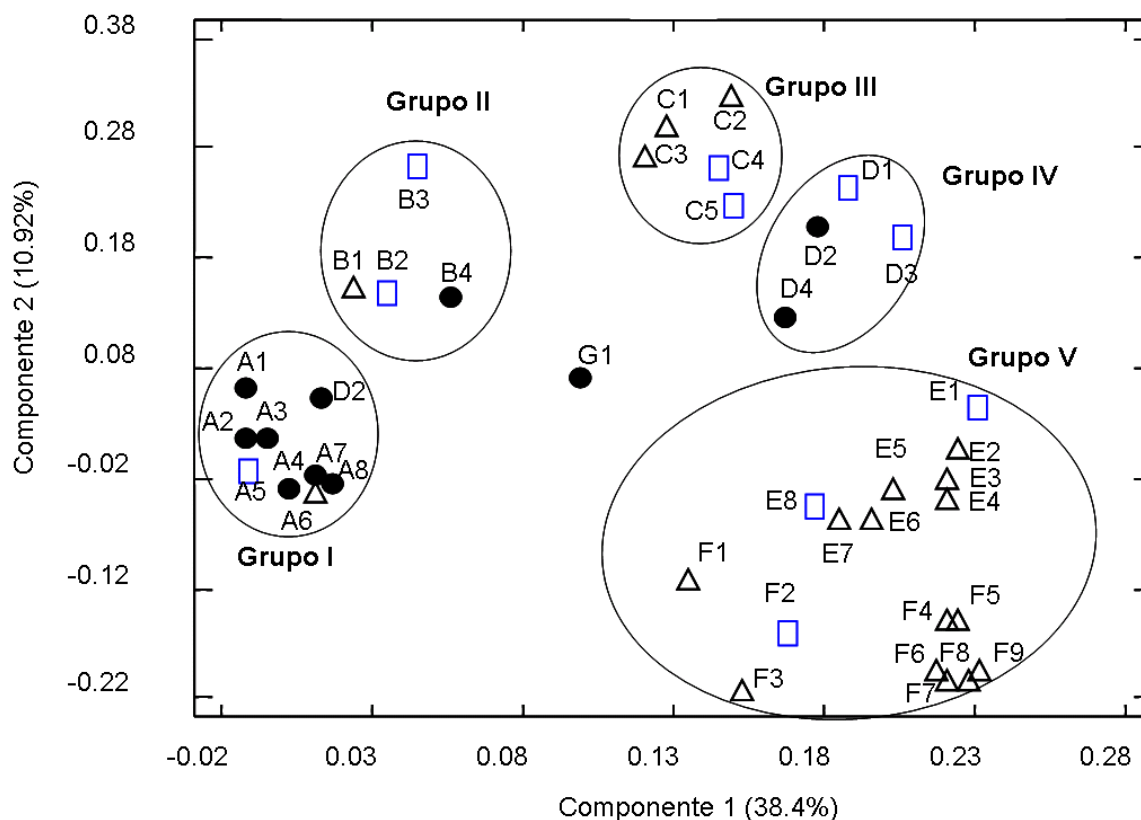


Figura 4-4. AGC presentes en cada grupo formado por el ACP. Bacterias aerobias Δ , facultativas \square , anaerobias \bullet **Grupo I:** A1) *Bacillus licheniformis* A2) *Sarcina lutea*, A3) *Amycolaptosis* sp., A4) *Corynebacterium* sp., A5) *Staphylococcus* sp., A6) *Streptomyces* sp., A7) *Desulfobacter* spp., A8) *Desulfovibrio desulfuricans*. **Grupo II:** B1) *Flavobacterium* sp., B2) *Escherichia coli*, B3) *Achromobacter* sp., B4) *Coryneform* sp., **Grupo III:** C1) *Alcaligenes* sp., C2) *Micrococcus* sp., C3) *Pseudomonas aeruginosa*, C4) *Lactobacillus* sp., C5) *Aeromonas* sp., **Grupo IV:** D1) *Vibrio cholerae*, D2) *Bifidobacterium* sp., D3) *Streptococcus* sp., D4) *Clostridium* spp., **Grupo V:** E1) *Proteus vulgaris*, E2) *Pseudomonas aeruginosa*, E3) *Mycobacterium* spp., E4) *Pseudomonas* spp., E5) *Rhodococcus globerulus*, E6) *Gordona* spp., E7) *Mycobacterium fortuitum*, E8) *Klebsiella* sp., F1) *Rhodococcus caprophyllus*, F2) *Salmonella* sp., F3) *Nocardia asteroides*, F4) *Rhodococcus erythropolis*, F5) *Rhodococcus equi*, F6) *Rhodococcus rhodochrous*, F7) *Tsukamurella paurometabola*, F8) *Nocardia farcinica*, F9) *Nocardia otitidiscaviarum*, G1) *Bacteroides*.

Con el análisis de componentes principales se pudieron observar 5 grupos de bacterias (Figura 4.4) constituidos de la siguiente manera: Grupo I (Anaerobias Gram positivas o negativas y facultativas Gram positivas), Grupo II (Anaerobias Gram negativas y facultativas Gram

negativas), Grupo III (Aerobias Gram positivas o negativas y facultativas Gram positivas o negativas), Grupo IV (Anaerobias Gram positivas o negativas y facultativas Gram negativas), Grupo V (Aerobias Gram positivas o negativas y facultativas Gram negativas).

Es decir, el análisis permitió dividir las bacterias anaerobias de las aerobias claramente. Sin embargo, las bacterias facultativas están distribuidas en todos los grupos, lo cual podría indicar la afinidad de las bacterias facultativas hacia un tipo de respiración (aerobio o anaerobio). Por ejemplo *Salmonella* es una bacteria facultativa y se encuentra en el grupo de las bacterias aerobias. En el caso de *Vibrio* y *Escherichia* que son también facultativas se encuentran compartiendo el grupo con bacterias anaerobias.

La bibliografía reporta que el género *Streptomyces* tiene respiración aerobia (Pelczar y Chan, 1988). Sin embargo, el ACP lo agrupa con las bacterias anaerobias (indicado como A6). Esto se debe a que es un actinomiceto Gram positivo, que presenta ácidos grasos ramificados (i15:0, a15:0, i16:0, a16:0, i17:0 y a17:0) como la mayoría de las bacterias anaerobias encontradas en los sistemas de tratamiento de aguas residuales (Ver Tabla 2 en el anexo 2). Con respecto a *Bacteroides*, se trata de una bacteria anaerobia. Sin embargo, con el ACP se encuentra alejada de ese grupo. Esto se debe a que en la bibliografía se reporta que tiene pocos ácidos grasos ramificados (i14:0, i16:0) en comparación con otras bacterias anaerobias (Ver Tabla 2 en el anexo 2).

En conclusión, el ACP permitió confirmar lo que se obtuvo con el análisis cualitativo. Además, como se pudo observar, los AGC están relacionados con el tipo de respiración de las bacterias.

4.2 Técnicas para determinar AGC

4.2.1 Técnica de Muñoz *et al.* (1997)

Se ha reportado que en las plantas de tratamiento de aguas residuales se encuentran presentes bacterias del género *Mycobacterium*, especialmente en sistemas de lodos activados (Blackall and Burrell, 1999). También en los sistemas que degradan compuestos tóxicos como fenoles, se ha reportado la presencia de *Mycobacterium*, esto debido a que utilizan los lodos activados para el arranque de los sistemas que tratan dichos compuestos tóxicos. Las especies

encontradas son *Mycobacterium peregrinum* y *Mycobacterium fortuitum* (Buitrón y González, 1996).

Buitrón y González, 1996 reportan que en sistemas que degradan mezclas de fenoles (2 clorofenol, 2,4 diclorofenol y 2,4,6 triclorofenol), se han aislado e identificado bacterias del género *Mycobacterium*.

La técnica MIDI Sherlock (Sasser, 2001) es una de las más sencillas y comúnmente utilizadas para obtener el perfil de AGC de muchas bacterias. Sin embargo, en el caso de bacterias de género *Mycobacterium* no es fácil obtener su perfil cromatográfico de AGC, esto se debe a que su pared celular tiene una constitución especial y diferente a otras bacterias. Las micobacterias presentan su pared celular con un alto contenido de lípidos (superior al 60 %) incluyendo ceras A, B, C y D, unidos a polisacáridos como las glucanas, mananas, arabinogalactanas y arabinomananas. Además, presentan glicolípidos, ácidos micólicos, micósidos C y proteínas.

Ésta constitución de las micobacterias las hace resistentes a algunos ácidos y alcoholes. En especial los ácidos micólicos con cadena de 22 a 26 carbonos no son liberados con el tratamiento MIDI (Figura 4-5) y por lo tanto no es posible cuantificarlos (Müller *et al.*, 1998). Estos autores proponen la utilización de la técnica MIDI modificada adicionando al tratamiento una pirrólisis con un hidróxido de trimetilsulfonio. Sin embargo, una técnica también utilizada es la de Muñoz *et al.*, 1997, ya que utiliza hidróxido de potasio y una mezcla de metanol-benceno. Este último permite la extracción de los AGC de 22 a 26 carbonos.

En la Figura 4-6 se puede observar el perfil de AGC de *Mycobacterium fortuitum*, obtenido con la técnica de Muñoz *et al.*, 1997. La bacteria tiene ácidos grasos saturados (13:0, 16:0 y 18:0), el ácido tuberculoesteárico (10ME18:0) y ácidos saturados de 22 y 24 carbonos (22:0 y 24:0). Como se puede observar, los ácidos 22:0 y 24:0 si se pueden extraer con la técnica de Muñoz *et al.*, 1997.

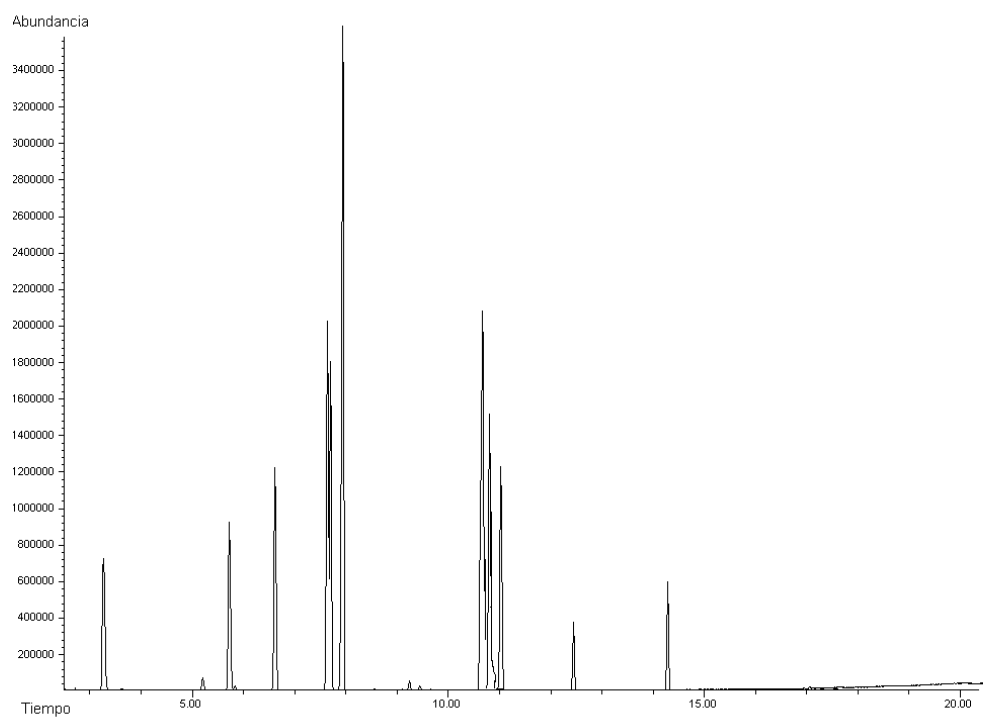
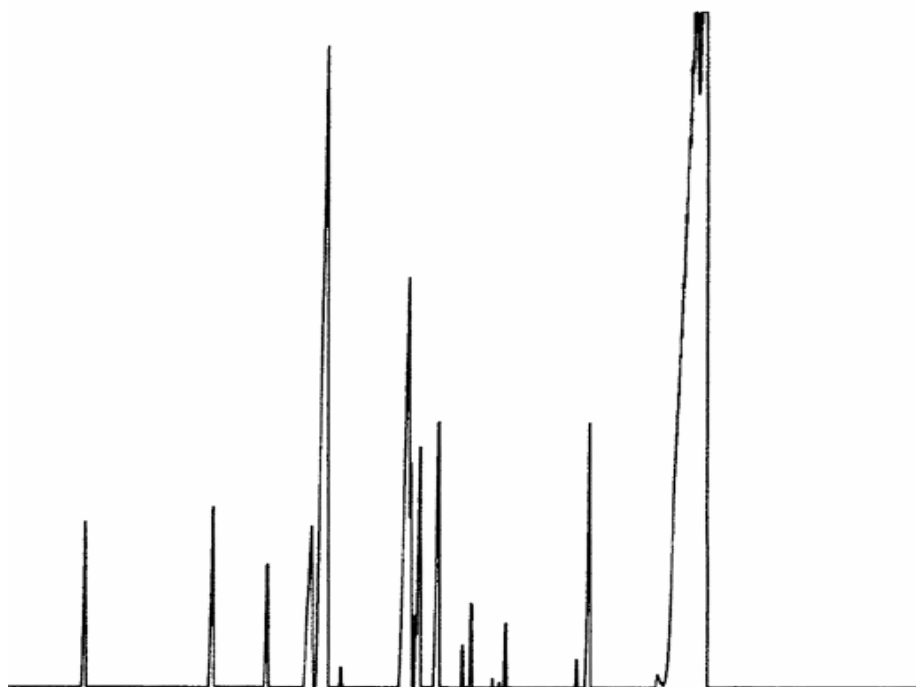


Figura 4-5. Perfil cromatográfico de AGC en *Mycobacterium* (MIDI, Sherlock 2001)



CONCLUSIONES

En este trabajo fue posible evidenciar que el perfil de AGC está relacionado con el tipo de aceptor terminal de electrones de las bacterias, por lo que fue factible obtener AGC biomarcadores y proponer una metodología para la identificación de grupos de bacterias presentes en sistemas de tratamiento de aguas residuales.

Por medio del perfil de AGC fue posible diferenciar bacterias aerobias, aerobias facultativas y anaerobias. Los AGC biomarcadores, para bacterias aerobias fueron ácidos con grupo hidroxilo de 12 carbonos, ácidos saturados y un metilado (2OH12:0, 3OH12:0, 10ME18:0, 22:0 y 24:0). Para bacterias anaerobias los ácidos ramificados i17:0 y a17:0 y para aerobias facultativas los ácidos con grupo hidroxilo de 14 carbonos 2OH14:0 y 3OH14:0.

La metodología de los AGC biomarcadores que se propone es confiable, ya que se detectaron en forma adecuada los AG biomarcadores de las mezclas doble ciego. Además, es lo suficientemente sensible para permitir detectar los biomarcadores propuestos si se utilizan muestras de 50 a 60 mg.

Se observó que el ayuno influye en el perfil cromatográfico de AGC, de tal manera que la relación trans/cis de los ácidos 16:1ω9 y 18:1ω9 tiende a incrementarse conforme aumentan los días de ayuno en *P. aeruginosa*. La relación aumenta de 0.23 a 1.47 y de 0.14 a 0.71 (de cero a cinco días de ayuno) para los ácidos de 16 y 18 carbonos respectivamente. Se observó que la variación en la relación trans/cis de los Ácidos grasos de 16 y 18 carbonos, debida al ayuno, no afecta la metodología propuesta.

El empleo de los AGC biomarcadores fue útil para diferenciar la estructura de las comunidades de bacterias en la biomasa en suspensión y adherida al empaque de un sistema SBR alimentado con la mezcla de fenoles. Fue posible relacionar los AGC de las bacterias con la colonización del empaque del sistema. La metodología permitió observar la forma en que las bacterias aerobias, aerobias facultativas y anaerobias se adhieren al empaque durante la aclimatación a un tóxico (mezcla de fenoles).

Se encontró que con los AGC biomarcadores es posible seguir los cambios en las comunidades de bacterias durante la aclimatación de un sistema anaerobio-aerobio. Se evidenció que la cantidad de bacterias aerobias y aerobias facultativas disminuyó

durante el periodo de aclimatación de un reactor alimentado con paranitrofenol, mientras que la cantidad de bacterias anaerobias aumentó. Durante la aclimatación al paranitrofenol no hubo diferencia significativa entre los valores obtenidos de la relación trans/cis del ácido 16:1 ω 9 mientras que para el ácido 18:1 ω 9, los valores de la relación trans/cis tuvieron diferencia significativa. Lo anterior indica que la variación de la relación trans/cis del ácido 18:1 ω 9 está relacionado con la adaptación de los microorganismos al paranitrofenol.

La metodología de los AGC propuesta en este trabajo es una herramienta útil y sencilla que permite caracterizar las comunidades de bacterias presentes en los sistemas de agua residual. Es decir, permite observar el tipo de comunidades bacterianas presentes, así como la variación que hay en dichas comunidades como respuesta a algún factor externo como el ayuno o la presencia de un tóxico.

RECOMENDACIONES

El presente estudio permitió observar las diferencias en los grupos de las comunidades de bacterias en sistemas para tratamiento de aguas. Sin embargo, las bacterias anaerobias estrictas no se pueden detectar por lo que se recomienda que la metodología de los AGC se complemente con herramientas de biología molecular.

La base de datos de los AGC, que se logró recopilar deberá complementarse, de tal modo que se pudo determinar subgrupos de bacterias como las sulfatorreductoras y desnitrificantes, entre otras.

Se recomienda realizar más estudios relacionados con el género *Streptomyces*, para poder separar u observar con claridad la diferencia entre bacterias anaerobias y dicho género.

BIBLIOGRAFÍA

- Abu-Shkara F., Neeman I., Sheinman R. and Armon R. (1998). The effect of fatty acid alteration in coliform bacteria on disinfection resistance and/or adaptation. *Water Science and Technology*. **38**(12). 133-139.
- Allen E. E., Facciotti D. and Batlett D. (1999). Monounsaturated but not polyunsaturated fatty acids are required for growth of the deep-sea bacterium *photobacterium profundum* SS9 at high pressure and low temperature. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**(4). 1710-1720.
- Amann R., Binder B., Olsen R., Chisholm S., Devereux R. and Stalh D. (1990). Combination of 16S rRNA-Targeted oligonucleotide with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology*. **56**(69). 1919-1925.
- Amann R. I., Ludwig W. and Schleifer K-H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology Reviews*. **59**(1). 143-169.
- Amann R., Glöckner F-O. and Neef A. (1997). Modern methods in subsurface microbiology: in situ identification of microorganisms with nucleic acid probes. *FEMS Microbiology Reviews*. **20**. 191-200.
- American Public Health Association; American Water Works Association; Water Pollution Control Federation. (1992). *Standard methods for examination of water and wastewater*. American Public Health Association. 18th 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.
- Bååth E., Frostegård Å. and Fritze H. (1992). Soil bacterial biomass, activity, phospholipid fatty acid pattern, and pH tolerance in an area polluted with alkaline dust deposition. *Applied and Environmental Microbiology*. **58**(12). 4026-4031.
- Banowetz G. M., Whittaker G. W., Dierksen K. P., Azevedo M. D., Kennedy A. C., Griffith S. M. and Steiner J. J. (2006). Fatty acid methyl ester analysis to identify source of soil in surface water. *Journal of Environmental Quality*. **35**. 133-140.
- Becton, Dickinson and Company (2000). BD BBL Crystal™ Identification systems. Gram-positive ID kit. Edit. Becton, Dickinson and Company. USA. Págs. 19-23.
- Bishop P. and Yu T. (1999). A microelectrode study of redox potential change in biofilms. *Water Science and Technology*. **39** (7). 179-185.

- Bitton G. (1999). Activated sludge process. En Bitton G. Wastewater Microbiology. Edit. Wiley-Liss. USA. Págs. 150, 152, 167, 175, 176, 184 y 193.
- Black, J. (1996). Growth and culturing of bacteria. En Black, J. Microbiology principles and applications. Edit. Prentice Hall, U.S. A. Págs. 159 y 160.
- Blackall L.L. and Burrell P. (1999). The microbiology of nitrogen removal in activated sludge systems. In Seviour R. J. and Blackall. The microbiology of activated sludge. Edit. Kluwer Academic Publishers. Londres. Pág. 76-96, 175-178 y 209.
- Bøe B. and Gjerde J. (1980). Fatty acid profiles patterns in the classification of some representatives of the families *enterobacteriaceae* and *Vibrionaceae*. *J. Gen. Microbiol.* **116**. 41-49.
- Boll A. G., Nazario F. S., Lemos P. A., Mejía C. T., Pescador E. N. y Varela F. L. (2002). Manual del curso práctico de ecología microbiana. Editores. Gisela Boll Argüello y Trinidad Mejía Coahuila. ENCB. IPN. México, D. F. Págs. 32-40.
- Bossio D. A. and Scow K. M. (1998). Impacts of carbon and flooding on soil microbial communities: phospholipid fatty acid profiles and substrate utilization patterns. *Microbiology and Ecology.* **35**. 265-278.
- Bossio D. A., Scwo K. M., Gunapala N. and Graham K. J. (1998). Determinants of soil microbial communities: effects of agricultural management season, and soil type on phospholipid fatty acid profiles. *Microbiology and Ecology.* **36**. 1-12.
- Böttger E. C. (1996). Approaches for identification of microorganisms. Despite longer experience with fatty acid profiles, DNA-based analysis offers several advantages. *ASM News.* **62**(5). 247-250.
- Buitrón, G. and González, A. (1996). Characterization of the microorganisms from an acclimated activated Sludge degrading phenolic compounds. *Water Science and Technology.* **34** (5-6). 289-294.
- Buitrón M. G. and Ortiz J. (1997). Biodegradation of phenolic compounds with a sequencing batch biofilter. In Precedings of the 52nd Industrial Waste Conference. May 5-6. Michigan, USA. 236-269.
- Buitrón G., González A. and López L. M. (1998). Biodegradation of phenolic compounds by an acclimated activated sludge and isolated bacteria. *Water Science and Technology.* **37** (4-5). 371-378.
- Buitrón G., Moreno G., García M. E. and Moreno J. (2005). Effect of co-substrate, biomass and sulfate concentration on the performance of a control strategy used to determine the anaerobic stage length of an anaerobic/aerobic SBR degrading p-nitrophenol. *Water Science and Technology.* **52** (12). 441-447.

- Buitrón G., Moreno-Andrade I. and Corrales A. (2006). Treatment of a mixture of phenols in a sequencing batch moving bed bioreactor. En memorias de 7th Specialised Conference on Small Water and Wastewater Systems. 8 al 10 de marzo. México, D. F. Págs. 150-155.
- Caldwell D. R. (1995). Structure formation. En Caldwell D. R. Microbial Physiology and Metabolism. Edit. Wm. C. Brown communications. USA. Págs. 36 y 37.
- Chihib N. E., Crepin T., Delattre G. and 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 Microbiology Letters*. 177. 167-175.
- Coello O. M., Sales M. D. and Quiroga A. J. M. (2001). Evolution of the activated sludge system under starvation conditions. In 3rd IWA International Specialised Conference on Microorganisms in Activated Sludge and Biofilm Processes. Paper No. 30. Roma, Italia. 1-5.
- Cruz A. and Buitrón G. (2000). Biotransformation of disperse blue 79 by anaerobic sequencing batch biofilter. *Water Science and Technology*. **42**(5-6). 317-320.
- Dowling N. J. E., Widdel F. and White D. C. (1986). Phospholipid ester-linked fatty acid biomarkers of acetate-oxidizing sulphate-reducers and other sulphide-forming bacteria. *Journal of General Microbiology*. 132. 1815-1825.
- 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 Journal of Food Microbiology*. **40**. 159-167.
- Fang C., Radosevich M. and Fuhrmann J. (2001). Characterization of rhizosphere microbial community structure in five similar grass species using FAME and Biolog analyses 33. 679-682.
- Frostegård Å., Tunlid A. and Bååth E. (1993). Phospholipid fatty acid composition, biomass, and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals. *Applied and Environmental Microbiology*. **59**(11). 3605-3617.
- Garland J. (1996). Patterns of potential source utilization by rhizosphera communities. *Soil Biology and Biochemistry*. **28**(2). 223-230.
- Ghanem F. M., Ridpath A. C., Moore W. E. and Moore L.V. (1991). Identification of *Clostridium botulinum*, *Clostridium argentinense*, and related organisms by cellular fatty acid analysis. *Journal Clinical Microbiology*. **29**(6). 1114-1124.

- Giraffa G. and Neviani E. (2001). DNA-based, culture independent-strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. *International Journal of Food Microbiology*. 67. 19-34.
- Gomez-Gil B., Thompson L., Thompson C. C. and Swings J. (2003). *Vibrio rotiferianus* sp. nov., isolated from cultures of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *International Journal of Systematic and Evolution Microbiology*. 53. 239-243.
- Godon J. J., Zumstein E., Dabert P., Habouzit F. and Moletta R. (1997). Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(7). 2802-2813.
- Gottschalk, G. (1986). Biosíntesis of *Escherichia coli*, cells from glucose. En Gottschalk, G. Bacterial metabolism. Edit. Springer Verlag, New York, USA. Págs. 37, 65-69.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology*. 52(4) 794-801.
- Haack S. K., Garchow H., Odelson D. A., Forney L. I. and Klug M. J. (1994). Accuracy, Reproducibility, and interpretation of fatty acid methyl ester profiles of model bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology*. 60(7). 2483-2493.
- Heipieper H. J., Diefenbach R. and Keweloh H. (1992). Conversion of cis unsaturated fatty acids to trans, a possible mechanism for the protection of phenol-degrading *Pseudomonas putida* P8 from substrate toxicity. *Applied and Environmental Microbiology*. 58(6). 1847-1852.
- Heipieper H. J., Meulenbeld G., van Oirschot Q. and De Bont J. (1996). Effect of environmental factors on the trans/cis ratio of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida* S12. *Applied an Environmental Microbiology*. 62 (8). 2773-2777.
- Heyrman J., Mergaert J., Denys R. and Swings J. (1999). The use of fatty acid methyl ester analysis (FAME) for the identification of heterotrophic bacteria present on three mural paintings showing severe damage by microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 181. 55-62.
- 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*. *Applied Environmental Microbiology*. 52(4). 788-793.
- Hungate R. E. (1969). A roll tube method for the cultivation of strict anaerobes. *Methodes in Microbiology*. 3b. 117-132.

- Ibekwe A. and Kennedy A. (1998). Phospholipid fatty acid profiles and carbon utilization patterns for analysis of microbial community structure under field and greenhouse conditions. *FEMS Microbiol. Ecol.* 26. 151-163.
- Irvine, R. L. and Ketchum, L. H. (1989). Sequencing batch reactors for biological wastewater treatment. *CRC Critical Reviews in Environmental control.* 18 (8). 225-294.
- Ivanova E. P., Bowman J. P., Lysenko A. M., Zhukova N. V., Gorskova N. M. Sergeev A. F. and Mikhailov V. V. (2005). *Alteromonas addita* sp. nov. *International Journal Systematic and Evolution Microbiology.* 55. 1065-1068.
- Jawetz E., Melnick J. L. y Adelberg E. (1987). Cultivo de microorganismos. En *Microbiología médica*. Edit. El Manual Moderno S. A. de C. V. México, D. F. Págs. 76-79.
- Jiménez C.B.E. (2001). Procesos Biológicos. En Jiménez C. B. E. La contaminación ambiental en México: causas y efectos y tecnología apropiada. Edit. Limusda S.A. de C.V. Méx., D.F. Págs. 257 – 280.
- Juárez B. L. (2000). Uso de un biofiltro discontinuo para la degradación del 2,4 DNF en ambientes secuenciados anaerobios/aerobios. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ingeniería (Ambiental). Facultad de Ingeniería, UNAM. México, D. F.
- Jung A. Y., Lee M. H., Oh T. K., Park Y. H. and Yoon J. H. (2005). *Psychrobacter cibarius* sp. nov., isolated from jeotgal, a traditional Korean fermented seafood. *International Journal of Systematic and Evolution Microbiology.* 55. 577-582.
- Kieft T. L., Ringelberg D. B. and White D. C. (1994). Changes in ester-linked phospholipid fatty acid profiles of subsurface bacteria during starvation and desiccation in a porous medium. *Applied and Environmental Microbiology.* 60(9). 3292-3299.
- Kropinski A. M., Lewis V. and Berry D. (1987). Effect of growth temperature on the lipids, outer membrane proteins, and lipopolysaccharides of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *Journal of Bacteriology.* 169(5). 1960-1966.
- Kroppenstedt, R. M. (1985). Fatty acids and menaquinone analysis of actinomycetes and related organisms. En *Chemical methods in bacterial systematics*. Edit. M. Goodfellow and D. E. Minnikin. Academic Press. London. Págs. 173-199.
- Laskin A. and Lechevalier H. (1981). *Handbook of microbiology*. Vol. IV. Edit. CRC. Press in USA. Págs. 394-456.
- Laura D., de Socio G., Frassanito R. and Rotilio R. (1996). Effect of antrazine on *Ochrobacterium anthropi* membrane fatty acid. *Applied and Environmental Microbiology.* 62(7). 2644-2646.

- Lee D. H., Zo Y. G. and Kim S. J. (1996). Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-Single Strand Conformation Polymorphism. *Applied and Environmental Microbiology*. **62**(9). 3112-3120.
- Lee N. Nielsen P. H., Andreasen K. H., Juretschko S., Nielsen J. L. Schleifer K. H. and Wagner M. (1999). Combination of fluorescent in situ hybridization and microautoradiography- a new tool for structure- function analyses in microbial ecology. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**(3). 1289-1297.
- Lehninger A. L. (1985). Lípidos y membranas. En Bioquímica. 2da. Edición. Edit. Omega. Barcelona, España. Págs. 303-327.
- Lewandowski G. A. (1990). Batch biodegradation of industrial organic compounds using different liquor from different POTWs. *Research Journal WPCF*. **62**(6). 803-809.
- Luque, C. J. and Herráez, A. (2001). Biología molecular e Ingeniería genética. Conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud. Ediciones Harcourt, S. A. Madrid, España. Págs. 130-132.
- Madigan M. T., Martinko J. M. and Parker J. (1997). Crecimiento microbiano. En Madigan M. T., Martinko J. M. and Parker J. Biology of microorganisms. 8th edition. Edit. Prentice- Hall, Inc. USA. Págs. 156-158.
- Mannerová S., Pantuček R., Doskar J., Svec P., Snauwaert C., Vancanneyt M., Swings J. and Sedláček I. (2003). *Macrococcus brunensis* sp. nov., *Macrococcus hajekii* sp. nov. and *Macrococcus lamae* sp. nov., from the skin of llamas. *International Journal of Systematic and Evolution Microbiology*. **53**. 1647-1654.
- Mansour M. P., Volkman J. K., Holdsworth D. G., Jackson A. E. and Blackburn S. I. (1999). Very-long-chain (C₂₈) highly unsaturated fatty acids in marine dinoflagellates. *Phytochemistry*. **50**. 541-548.
- Manugistics, 2000. Statgraphics Plus 5. Statistical Graphics Corporation.
- Manz W., Eisenbrecher M., Neu T. R. and Szewzyk U. (1998). Abundance and spatial organization of Gram-negative sulfate-reducing bacteria in activated sludge investigated by in situ probing with specific 16S rRNA targeted oligonucleotides. *FEMS Microbiology Ecology*. **25**. 43-61.
- Marques de Cantú M. J. (1991). Análisis de varianza. En Probabilidad y estadística para Ciencias Químico-Biológicas. Edit. McGraw Hill. México, D. F. Págs. 364-384.

- Mayberry W. and Lane J. (1993). Sequential alkaline saponification/acided hydrolysis/esterification: a one tube method with enhanced recovery of both cyclopropane and hydroxylated fatty acids. *J. Microbiol. Meth.* **18**. 21-32.
- McDonald R. and Brözel V. S. (2000). Community analysis of bacterial biofilms in a simulated recirculating cooling-water system by fluorescent *in situ* hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Water Research.* **34**(9). 2439-2446.
- McKinney R. (1962). Microbiology for Sanitary Engineers. Edit. McGraw-Hill. Book Company, Inc. USA. Págs. 158-163.
- McNabb A. M., Schuttleworth R., Behme R. and Colby W. D. (1997). Fatty acid characterization of rapidly growing pathogenic aerobic actinomycetes as a means of identification. *J. Clin. Microbiol.* **35**(6) 1361-1368.
- McNair, M. H. (1981). Cromatografía de gases. Edit. The General Secretariat of Organization of American State. Washington D. C. Págs. 6 y 7.
- Melgoza R. M., Chew M. and Buitrón G. (2000). Start-up of a sequential anaerobic/aerobic batch reactor for the mineralization of P-nitrofenol. *Water Science Technology.* **42**(5-6). 289-292.
- Milic-Terzic T. y Saval S. (2000). Aplicación de técnicas de biología molecular para la detección y monitoreo de bacterias degradadoras de contaminantes orgánicos. Artículo Técnico-Teórico. *Ingeniería y Ciencias Ambientales.* **46**. 24-30.
- Monteoliva S. M., Ferrer M. R., Ramos C. A, Quesada E. and Monteoliva M. (1988). Cellular fatty acid composition of *Deleya halophila*: effect of growth temperature and salt concentration. *Journal of General Microbiology.* **134**. 199-203.
- 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.
- Müller K., Schmid E. and Kroppenstedt R. (1998). Improved identification of Mycobacteria by using the Microbial Identification System in combination with additional trimethylsulfonium hydroxide pyrolysis. *J. Clin. Microbiol.* **36**(9). 2477-2480.
- Nichols P., Smith G., Antworth C., Hanson R. and White D. (1985). Phospholipid and lipopolysaccharide normal and hydroxy fatty acids as potential signatures for methane-oxidizing bacteria. *FEMS Microbiology Ecology.* **10**. 327-335.
- Noordhoek G. T., van Embden J. D. and Kolk A. H. (1996). Reliability of nucleic acid amplification for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: an international collaborative quality control study among 30 laboratories. **34**(10). 2522-2525.

- Novo D., Perlmutter N. G., Hunt R. H. and Shapiro H. M. (1999). Accurate flow cytometric membrane potential measurement in bacteria using diethyloxacarbocyanine and a ratiometric technique. *Cytometry*. **35**: 55-63.
- Okuyama H., Sasaki S., Higashi S. and Murata N. (1990). A *trans*-unsaturated fatty acid in a Psychrophilic bacterium, *Vibrio* sp. Strain ABE-1. *Journal of Bacteriology*. **172**(6). 3515-3518.
- Oliver J. D. and Stringer W. F. (1984). Lipid composition of a psychrophilic marine *Vibrio* sp. during starvation-induced morphogenesis. *Applied and Environmental Microbiology*. **47**(3). 461-466.
- Olsson P. A., Bååth E. and Jakobsen I. (1997). Phosphorus effects on the mycelium and storage structures of an arbuscular mycorrhizal fungus as studied in the soil and roots by analysis of fatty acid signatures. *Applied and Environmental Microbiology*. **63**(9). 3531-3538.
- Pelczar M. J. y Chan E. C. S. (1988). Características de géneros seleccionados de microorganismos. En Pelczar M. J. y Chan E. C. S. Elementos de Microbiología. Edit. Mc Graw- Hill. Págs. 134 y 135.
- Piotrowska-Seget Z. and Mrozik A. (2003). Signature Lipid Biomarker (SLB) analysis in determining changes in community structure of soil microorganisms. *Polish Journal of Environmental Studies*. **12**(6). 669-675.
- Pla, L. E. (1986). Análisis Multivariado: Método de Componentes Principales. Secretaría General de la Organización de los Estados ÇAmericanos. Washington, D. C. E. U. pp. 93.
- Poulsen L. K., Ballard G. and Stahl D. A. (1993). Use of rRNA fluorescence in situ hybridization for measuring the activity of single cells in young and established biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*. **59**(5). 1354-1360.
- Quezada M., Linares I. and Buitrón G. (2000). Use of a sequencing batch biofilter for degradation of azo dyes (acids and bases). *Water Science and Technology*. **42** (5-6). 329-336.
- Rabus R., Fukui M., Wilkes H. and Widdel F. (1996). Degradative capacities and 16S rRNA-targeted whole -cell hybridization of sulfate-reducing bacteria in an anaerobic enrichment culture utilizing alkylbenzenes from crude oil. *Applied and Environmental Microbiology*. **62**(10). 3605-3613.
- Radcliff G. and Jaroszeski M. J. (1998). En Jaroszeski M. and Radcliff G. Basics of flow cytometry. En Jaroszeski M. J. and Richard H. Flow cytometry protocols. Edit. Humana Press. USA. Págs. 1-24.

- 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. *Applied and Environmental Microbiology*. **58**(2). 562-571.
- Ramírez-Gama R. M., Luna M. B., Mejía C. A., Velásquez M. O., Tsuzuki R. G., Vierna G. L., Hernández G. L. y Muggenburg I. (1996). Manual de Prácticas de Microbiología General. Editor. R. M. Ramírez Gama. Facultad de Química, UNAM. México, D. F. Págs. 176, 178, 193, 200-205.
- Ranjard L., Poly F. and Nazaret S. (2000). Mini-review. Monitoring complex bacterial communities using culture-Independent molecular techniques: application to soil environment. *Research Microbiology*. **151**. 167-177.
- Raskin L., Stromley J. M., Rittmann B. and Stahl D. (1994). Group-Specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. *Applied and Environmental Microbiology*. **60**(4). 1232-1240.
- Ratledge C. (1996). Lipids microbial en: Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medicine. Vol. 3. Robert A. Meyers (ed). pp. 403-471.
- Rezanka T. Vokoun J., Slavicek J. and Podojil M. (1983). Determination of fatty acids in algae by capillary gas chromatography mass spectrometry. *Journal Chromatography*. **268**. 71-78.
- 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 Microbiology Reviews*. **20**. 371-377.
- Ritchie N. J., Schutter M. E., Dick R. P. and Myrold D.D. (2000) Use of length heterogeneity PCR and fatty acid methyl ester profiles to characterize microbial communities in soil. *Applied Environmental and Microbiology*. **66**. 1668-1675.
- Rodríguez A. W., Moreno R. G., López M. L.M. y Buitrón M. G. (2000) Caracterización de la biomasa de un reactor anaerobio/aerobio con base en el análisis del perfil de los ácidos grasos. XII Congreso Nacional FEMISCA. Ciencia y Conciencia. Morelia, Michoacán. 21-24 de marzo. 741-750.
- Sasser M. (2001). Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. Nota técnica No. 101. MIDI Sherlock. USA.
- Scheldeman P., Goossens K., Rodríguez-Días M., Pil A., Goris J., Herman L., De Vos P., Niall A., Logan N. A. and Heyndrickx M. (2004). *Paenibacillus lactis* sp. nov., isolated from raw and heat-treated milk. *International Journal of Systematic and Evolution Microbiology*. **54**. 885-891.

- Skoog D. A. y Leary J. J. (1994). Análisis Instrumental. Espectrometría de masas. En Skoog D. A. y Leary J. J. Espectrometría de masas. Edit. Mc Graw-Hill. 4ta. Edición. México, D. F. Págs. 493, 494, 527 y 528.
- Soddell J. (1999). Foaming. En Seviar R. J. and Blackall L. L. The microbiology of activated sludge. Edit. Kluwer Academic Publishers. Londres. Págs. 175-178.
- Soto B. G. (1999). Biodegradación de compuestos tóxicos en un proceso SBR controlado por medio del oxígeno disuelto. Tesis para obtener el grado de Maestra en Ingeniería Química (Procesos). Facultad de Química, UNAM. Méx. D. F.
- Spring S., Schulze R., Overmann J. and Schleifer K. (2000). Identification and characterization of ecologically significant prokaryotes in the sediment of freshwater lakes: molecular and cultivation studies. *FEMS Microbiology Reviews*. **24**. 573-590.
- Stainer R. Rudd T., Laster J. N. (1986). Metabolismo microbiano: Biosíntesis. En Stainer R. Microbiología. 4ta edición. Ed. Reverté, S. A. Barcelona, España. Págs. 77, 78 y 207.
- Stronach S. M. (1986). Anaerobic digestion processes in industrial wastewater treatment Edit. Addison Wesley Longman, Inc. USA. Págs. 125 a135.
- Sundh I., Nilsson M. and Borgå P. (1997). Variation in Microbial community structure in two boreal peatlands as determined by analysis of phospholipid fatty acid profiles. *Applied and Environmental Microbiology*. **63**(4).1476-1482.
- Tanner, M. K. and Wellhausen S. R. (1998). Flow Cytometric detection of fluorescent redistributional dyes for measurement of cell transmembrane potential. En Jaroszeski M. J. and Richard H. Flow cytometry protocols. Edit. Humana Press. USA. Págs. 85-95.
- Tortora G., Furke B. and Case C. (1998). Clasificación de los microorganismos. En Tortora G., Funke B. and Case C. Microbiology an introduction. 6th edition. Edit. Addison Wesley. Longman, USA. Págs. 288, 289.
- Taylor J. and Parkes J. (1983). The cellular fatty acids of the sulphate-reducing bacteria, *Desulfobacter* sp., *Desulfobubllbus* sp. and *Desulfovibrio* desulfuricans. *J. Gen. Microbiol.* 129. 3303-3309.
- Tchobanoglous G. (1991). Biological Unit Processes. In Tchobanoglous G. Wastewater engineering: treatment, disposal, and reuse. Metcalf and Eddy. Edit. McGraw-Hill. Inc. Págs. 400-403.

- Torres A. (1999). Determinación de la influencia del ayuno en la viabilidad de bacterias aclimatadas a una mezcla de fenoles. Tesis para obtener el grado de Químico Farmacéutico Biólogo. Facultad de Química, UNAM. Págs. 63, 64.
- Toze S. (1999). PCR and the detection of microbial pathogens in water and wastewater. *Water Research*. **33**(17). 3545-3556.
- Trademark of 3M Company. (1999). Micro Scan Prompt™ Inoculation System. St. Paul, MN. USA.
- Tsitko I., Zaitzev G., Lobanok A. and Salkinoja-salonen M. (1999). Effect of aromatic compounds on cellular fatty acid composition of *Rhodococcus opacus*. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**(2). 853-855.
- Tunlid A. and White D. C. (1990). Use of lipid biomarkers in environmental samples. In *Analytical Microbiology Methods*. Tunlid A. and White D. C. Edit. A. Fox *et al.* N. Y, USA. 259-274.
- Vestal R. and White D. C. (1989). Lipid analysis in microbial ecology: Quantitative approaches to the study of microbial communities. *BioScience*. **39**. 535-541.
- Webster T. S., Devanny J. S., Torres E. M. and Basrai S. S. (1997). Microbial ecosystems in compost and granular activated carbon biofilters. *Biotechnology and Bioengineering*. **53**(3). 296-303.
- Welch D. F. (1991). Applications of cellular fatty acid analysis. *Clinical Microbiology Reviews*. **4**(4). 422-438.
- Werker A. G. and Hall E. R. (1998). Using microbial fatty acids to quantify, characterize and compare biofilm and suspended microbial population in wastewater treatment systems. *Water Science and Technology*. **38**(4-5). 273-280.
- White, D. C., Pinkart, H. C., and Ringelberg, D. B. (1997). Biomass measurements: Biochemical approaches. In *Manual of Environmental Microbiology*. Hurst, C., Knudsen, G., Mc Inerney, M.,
- 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.
- Wintzingerode F. v., Göbel U. B. and Strackebrandt E. (1997). Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews*. **21**. 213-229.
- 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 Microbiology Letters*. **161**. 351-358.

- Zak J. C., Willig M. R., Moorhead D. L. and Wildman H. G. (1994). Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. *Soil Biology and Biochemistry*. **26**(9). 1101-1108.
- Zelles L., Bai Q. Y., Ma R. X., Rackwitz R., Winter K. and Beese F. (1994). Microbial Biomass, metabolic activity and nutritional status determined from fatty acid patterns and poly-hydroxybutyrate in agriculturally-managed soils. *Soil Biology and Biochemistry*. **26**(4). 439-446.
- Zelles L., Palojarvi A., Kandeler E., Von Lütow M., Winter K. and Bai Q. Y. (1997). Changes in soil microbial properties and phospholipid fatty acid fractions after chloroform fumigation. *Soil Biology and Biochemistry*. **29**(9). 1325-1336.
- Zelles L. (1999). Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterization of microbial communities in soil: a review. *Biology Fertil Soils*. **29**. 111-129.

ANEXO 1

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Técnica según Muñoz, 1997

1) Solución etérea de diazometano

Prepararla en una campana de extracción entre 0-4 °C y no utilizar material de vidrio esmerilado

- 1) Medir 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. Dejar el matraz en hielo durante unos minutos
- 2) Adicionar con precaución a la fase acuosa 1 gramo de nitrosometilurea (utilizar cubrebocas y guantes). El diazometano gaseoso se solubilizará en el éter. El recipiente conteniendo la nitrosometilurea puede ser enjuagado con un poco de éter etílico a 4 °C
- 3) Decantar la fase etérea sobre otro matraz erlenmeyer previamente enfriado, el cual debe contener algunas lentejas de KOH para eliminar la humedad. Esta solución puede utilizarse quince minutos después de su preparación. Para conservar la solución, tapar muy bien el matraz con un tapón de hule cubierto de papel aluminio.

Técnica MIDI, Sherlock (Sasser, 2001)

Reactivo 1. Saponificación:

45 g de NaOH
150 ml de metanol
150 ml de agua destilada

Reactivo2.Metilación:

325 ml de HCl 6.0 N certificado
275 ml de metanol

Reactivo 3.Extracción:

200 ml de hexano
200 ml de metil-terbutil-éter

Reactivo 4.Lavado:

10.8 g de NaOH
900 ml de agua destilada

ANEXO 2

Tabla 2. Ácidos grasos presentes en bacterias encontradas en sistemas de tratamiento de aguas residuales (AGC saturados)

ANAEROBIAS

	Saturados												Respiración	Gram		
	10:0	11:0	12:0	13:0	14:0	15:0	16:0	17:0	18:0	19:0	20:0	22:0			24:0	26:0
<i>Bifidobacterium</i>					3.5		22.90		22.6						anaerobia	positiva
<i>Bacillus linchenformis</i>			0.1-0.5		1.0-7										anaerobia	positiva
<i>Clostridium</i> spp	tr-3		tr-33		6.47-33		6.7-52.1		1.95-9		tr-8.00				anaerobia	positiva
<i>Sarcina lutea</i>	0-8.1		0.14-8.1		0.9-6.45		0.1-10.1		0-5.7						anaerobia	positiva
<i>Bacteriodes</i>			0-3.2	1.4	1.4-5.4	5.50	2.5-5.6	0.60	1.4-3.4						anaerobia	negativa
<i>Coryneform</i>					3.1-42.1		0.7-2								anaerobia	negativa
<i>Desulfobacter</i> spp.				0-tr	2.4-31.4	0.4-23.7	7.4-32.7	tr-2.9	0.1-0.4						anaerobia	negativa
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>			0.58-3.07			0.03-0.4	3.40-9.61	0.32-0.60	4.89-6.47						anaerobia	negativa

FACULTATIVAS

	Saturados												Respiración	Gram		
	10:0	11:0	12:0	13:0	14:0	15:0	16:0	17:0	18:0	19:0	20:0	22:0			24:0	26:0
<i>Corynebacterium</i>	tr-2		1.0-3.0		3.0-15		1.0-3		1.0-16						facultativa	positiva
<i>Escherichia coli</i>			3.8	1.2	43.8		tr	1.40							facultativa	negativa
<i>Aeromonas (salmonicida)</i>			6.37-6.85	0.41-0.50	2.53-4.7	2.03-2.05	20.57-25.38	1.23-1.26	2.03-4.3	0.2-0.25	0.5-1.85				facultativa	negativa
<i>Salmonella</i>		1.07	5.15	8.11		0.65	25.58	10.13							facultativa	negativa
<i>Proteus vulgaris</i>					3.6		35.6		19.8						facultativa	negativa
<i>Vibrio cholerae</i>					3.9		29.5		3.1						facultativa	negativa
<i>Klebsiella</i>			0.73		4.65	1.18	38.97	1.31	1.19						facultativa	negativa
<i>Lactobacillus</i>					0.7-4		7.0-37.0		1.0-5.0						facultativa	positiva
<i>Streptococcus</i>			0.4-7.7		2.37-17.1		26.39-34.84		0.4-8.34						facultativa	positiva
<i>Staphylococcus</i>			tr		tr-0.71		2.00		2.7-6		7.00				facultativa	positiva

AEROBIAS

	Saturados												Respiración	Gram		
	10:0	11:0	12:0	13:0	14:0	15:0	16:0	17:0	18:0	19:0	20:0	22:0			24:0	26:0
<i>Pseudomonas (fluorescentes)</i>							36.90		18.70						aerobia	negativa
<i>aeruginosa</i>			11.8		1.00		7.8-37.0		2.00						aerobia	negativa
<i>Pseudomonas</i> spp			2.6		3.5		49.5		8.60						aerobia	negativa
<i>Flavobacterium aquatile</i>	17.6		15.00		29.2										aerobia	negativa
<i>Micrococcus</i>			0.4		0-4.4		0.2-21		0-tr						aerobia	positiva
<i>Alcaligenes</i>			0.1-39.6		1-11.0		11.6-38.4		tr-7						aerobia	negativa
<i>Rhodococcus caprophilus equi</i>					1.9-6.4	3.2-18.3	19.7-31.9	1.8-10.5	1.7-4.4	<0.5-2.7					aerobia	positiva
<i>erythropolis</i>					3.3-9.9	1.3-1.6	26.4-30.0	0-9.8	0.9-1.1	0-1.9					aerobia	positiva
<i>globerulus</i>					6.9	3.5	25.2	1.8	0.8	7.4	3.60				aerobia	positiva
<i>rhodochrous</i>					18.7	2.7	17.2	0.9	0.9	8.7	1.20				aerobia	positiva
<i>Nocardia farcinica</i>					0.9-3.8	1.6-5.1	22.4-30.4	1.2-13.7	0.6-12.4	0-2.7	0-3.9				aerobia	positiva
<i>asteroides</i>					1.4		29.5	1.2	6.4						aerobia	positiva
<i>otitidiscaviarum</i>					0-2.8	0-4.7	11.00	0-3.2	2.8-19.7						aerobia	positiva
<i>Streptomyces</i>					0.9-1.4	2.6-3.2	28-35.9	1.6-2.8	0-5.6						aerobia	positiva
<i>Tsukamurella paurometabola</i>					0-4	1-5.1	1.4-9.6	0-1.1							aerobia	positiva
<i>Gordona</i> spp.					4.5-4.6	0.5-0.9	28-31.2	1.0-1.6	2.2-3.7						aerobia	positiva
<i>Mycobacterium</i> spp.					1.4-3.4	0-6.6	17.8-47.8	0.7-14.1	0-6	0-0.3					aerobia	positiva
<i>fort uitum</i>					tr-3		19.8-34.1	0-2.5	2.6-9.8			*3-4	*3-20	0.4-7.2	aerobia	positiva
<i>Coryneform</i>					5.4-8.8	0.4-0.9	33.3-34.0	0-0.7	0.9-3.0		3.00	4.00	25.00		aerobia	positiva
					3.1-42.1		0.7-2								aerobia	positiva

tr= Trazas (<0.01)

Tabla 2 (continuación). Ácidos grasos presentes en bacterias encontradas en sistemas de tratamiento de aguas residuales (AGC monoinsaturados)

ANAEROBIAS

	monoinsaturados														Respiración	Gram	
	12:1	14:1	14:1w7	15:1w5c	15:1w6	16:1	16:1w5	16:1w7c	16:1w9	17:1w6	17:1w8c	18:1	18:1w9	18:1w7c			18:1w9y11
<i>Bifidobacterium</i>						4.9						33.4				anaerobia	positiva
<i>Bacillus linchenformis</i>		4.2				4.7-23.6						tr-1.2				anaerobia	positiva
<i>Clostridium</i> spp	16.7	0.89-16.6				1.0-11		0-3.9	2.1-6.6			2.0-11.7				anaerobia	positiva
<i>Sarcina l utea</i>						1.3-2.7						0.22-3.6				anaerobia	positiva
<i>Bacteriodes</i>												1.4-3.6				anaerobia	negativa
<i>Coryneform</i>																anaerobia	
<i>Desulfobacter</i> spp.			0-0.4		0-4.6		1.3-2.0	1.1-7.1	0-1.4	0-8.9	0-2.0		tr-0.4	0-3.8		anaerobia	negativa
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>			0.71-2.68					1.34-2.32					0-0.03	1.43-2.42		anaerobia	negativa

FACULTATIVAS

	monoinsaturados														Respiración	Gram	
	12:1	14:1	14:1w7	15:1w5c	15:1w6	16:1	16:1w5	16:1w7c	16:1w9	17:1w6	17:1w8c	18:1	18:1w9	18:1w7c			18:1w9y11
<i>Corynebacterium</i>						1.0-2						1.0-2				facultativa	positiva
<i>Escherichia coli</i>		2.1				7.2										facultativa	negativa
<i>Aeromonas (salmonicida)</i>						43.14-43.20						8.23-10.40				facultativa	negativa
<i>Salmonella</i>								18.47					20.28			facultativa	negativa
<i>Proteus vulgaris</i>						3.6						11.2				facultativa	negativa
<i>Vibrio cholerae</i>		tr				34.2						22.9				facultativa	negativa
<i>Klebsiella</i>								5.16							14.53	facultativa	negativa
<i>Lactobacillus</i>						10.0-14						20-45				facultativa	positiva
<i>Streptococcus</i>		0-1.15				2.3-18.05						4.8-34.87				facultativa	positiva
<i>Staphylococcus</i>		0.41				0.38						0.49				facultativa	positiva

AEROBIAS

	monoinsaturados														Respiración	Gram	
	12:1	14:1	14:1w7	15:1w5c	15:1w6	16:1	16:1w5	16:1w7c	16:1w9	17:1w6	17:1w8c	18:1	18:1w9	18:1w7c			18:1w9y11
<i>Pseudomonas (fluorescentes)</i>												9.1				aerobia	negativa
<i>aeruginosa</i>						7-15.8						33-49.5				aerobia	negativa
<i>Pseudomonas</i> spp	2.9	18.3				2.3										aerobia	negativa
<i>Flavobacterium aquatile</i>		11														aerobia	negativa
<i>Micrococcus</i>						0-24						0-52				aerobia	positiva
<i>Alcaligenes</i>	8.9-10.5					2.7-15						23-82.8				aerobia	negativa
<i>Rhodococcus caprophilus</i>								0.9-8.8			1.9-13.1		2.2-25.0			aerobia	positiva
<i>equi</i>								0-6.9			0-1.2		3.6-5.1			aerobia	positiva
<i>erythropolis</i>				0.7							1.7		4.5			aerobia	positiva
<i>globerulus</i>											0.8		2.12			aerobia	positiva
<i>rhodochrous</i>				1.5-1.6							1.8-13.3		1.8-18.2			aerobia	positiva
<i>Nocardia farcinica</i>											0.6		19.6			aerobia	positiva
<i>asteroides</i>				0-0.6				0-5.2	0-0.5		0-4.9		7.5-29.1			aerobia	positiva
<i>otitidiscaviarum</i>				0.4-0.5							1.9-3.8		10.4-20.8			aerobia	positiva
<i>Streptomyces</i>											0-5.8					aerobia	positiva
<i>Tsukamurella paurometabola</i>									0.4-0.8	0-0.5			22-31.1			aerobia	positiva
<i>Gordona</i> spp.				0-1.5		17.8-47.8			0-0.5	0-12.9			7.8-29			aerobia	positiva
<i>Mycobacterium</i> spp.						2.6-10.5		t-4				6.4-29.2	16-30			aerobia	positiva
<i>fort uitum</i>								6.6	1.8-2.4		0.6-0.9	19.0	24-41.3			aerobia	positiva
<i>Coryneform</i>																aerobia	

Tabla 2 (continuación). Ácidos grasos presentes en bacterias encontradas en sistemas de tratamiento de aguas residuales (AGC ciclopropanos y con grupo hidr

ANAEROBIAS

	Ciclopropano			hidroxi								Respiración	Gram
	15:0cy	17:0cy	19:0cy	3-OH-C10	2OH14:0	3OH14:0	3-OH-C12	OH18:0	2OH18:0	OH19:0	2-OH-C12		
<i>Bifidobacterium</i>			2.8									anaerobia	positiva
<i>Bacillus</i>												anaerobia	positiva
<i>Clostridium</i>								10.9		19.6		anaerobia	positiva
<i>Sarcina lutea</i>												anaerobia	positiva
<i>Bacteriodes</i>												anaerobia	negativa
<i>Coryneform</i>												anaerobia	
<i>Desulfobacter</i> spp.												anaerobia	negativa
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>												anaerobia	negativa

FACULTATIVAS

	Ciclopropano			hidroxi								Respiración	Gram
	15:0cy	17:0cy	19:0cy	3-OH-C10	2OH14:0	3OH14:0	3-OH-C12	OH18:0	2OH18:0	OH19:0	2-OH-C12		
<i>Corynebacterium</i>												facultativa	positiva
<i>Escherichia coli</i>	20.9	18.8										facultativa	negativa
<i>Aeromonas (salmonicida)</i>		1.01-2.46	0.2-0.25									facultativa	negativa
<i>Salmonella</i>					0.58	7.93						facultativa	negativa
<i>Proteus vulgaris</i>												facultativa	negativa
<i>Vibrio cholerae</i>												facultativa	negativa
<i>Klebsiella</i>		26.58	2.08			3.61						facultativa	negativa
<i>Lactobacillus</i>			19-49									facultativa	positiva
<i>Streptococcus</i>			0-44.7									facultativa	positiva
<i>Staphylococcus</i>												facultativa	positiva

AEROBIAS

	Ciclopropano			hidroxi								Respiración	Gram
	15:0cy	17:0cy	19:0cy	3-OH-C10	2OH14:0	3OH14:0	3-OH-C12	OH18:0	2OH18:0	OH19:0	2-OH-C12		
<i>Pseudomonas (fluorescentes)</i>												aerobia	negativa
<i>aeruginosa</i>		5		14.6			35.2				18.5	aerobia	negativa
<i>Flavobacterium aquatile</i>												aerobia	negativa
<i>Micrococcus</i>												aerobia	positiva
<i>Alcaligenes</i>				18.9-20.3			32.6-34.2					aerobia	negativa
<i>Rhodococcus caprophilus</i>												aerobia	positiva
<i>equi</i>												aerobia	positiva
<i>erythropolis</i>												aerobia	positiva
<i>globerulus</i>												aerobia	positiva
<i>rhodochrous</i>												aerobia	positiva
<i>Nocardia farcinica</i>												aerobia	positiva
<i>asteroides</i>												aerobia	positiva
<i>otitidiscaviarum</i>												aerobia	positiva
<i>Streptomycetes</i>		0-3.0										aerobia	positiva
<i>Tsukamurella paurometabola</i>												aerobia	positiva
<i>Gordona</i> spp.												aerobia	positiva
<i>Mycobacterium</i> spp.									0-3.8			aerobia	positiva
<i>fort uitum</i>												aerobia	positiva
<i>Coryneform</i>												aerobia	

Tabla 1. Bacterias presentes en los sistemas de tratamiento de aguas residuales

	Mc Kinney,1962	Blackall y Burrell, 1999	Bitton , 1994	White et. al. , 1997	
Más comunes			<i>Bacillus</i>		<i>Bacillus</i>
			<i>Nocardia</i>		<i>Nocardia</i>
			<i>Pseudomonas</i>		<i>Pseudomonas</i>
			<i>Streptomyces</i>		<i>Streptomyces</i>
Flóculos			<i>Acinetobacter</i>		<i>Acinetobacter</i>
			<i>Achromobacter</i>		<i>Achromobacter</i>
			<i>Alcaligenes</i>		<i>Alcaligenes</i>
			<i>Bacillus</i>		<i>Bacillus</i>
			<i>Beggiatoa</i>		<i>Beggiatoa</i>
			<i>Brevibacterium</i>		<i>Brevibacterium</i>
			<i>Comomonas</i>		<i>Comomonas</i>
			<i>Corynebacterium</i>		<i>Corynebacterium</i>
			<i>Flavobacterium</i>		<i>Flavobacterium</i>
			<i>Pseudomonas</i>		<i>Pseudomonas</i>
			<i>Sphaerotilus</i>		<i>Sphaerotilus</i>
			<i>Vitreoscilla</i>		<i>Vitreoscilla</i>
			<i>Zoogloea</i>		<i>Zoogloea</i>
Lodos activados		<i>Acinetobacter</i>			<i>Acinetobacter</i>
				<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
				<i>Achromobacter</i>	<i>Achromobacter</i>
				<i>Achromobacter</i> spp.	<i>Achromobacter</i> spp.
			<i>Aeromonas</i>		<i>Aeromonas</i>
				<i>Aeromonas punctata</i>	<i>Aeromonas punctata</i>
			<i>Alcaligenes</i>	<i>Alcaligenes</i>	<i>Alcaligenes</i>
			<i>Arthrobacter</i>	<i>Arthrobacter</i>	<i>Arthrobacter</i>
			<i>Aureobacterium</i>		<i>Aureobacterium</i>
			<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>
			<i>Bacteroides</i>		<i>Bacteroides</i>
			<i>Beggiatoa</i>	<i>Beggiatoa</i>	<i>Beggiatoa</i>
			<i>Comomonas</i>		<i>Comomonas</i>
			<i>Caulobacter</i>		<i>Caulobacter</i>
					<i>Coryneform</i>
			<i>Cytophaga</i>		<i>Cytophaga</i>
					<i>Flavobacter-Cytophaga</i>
	<i>Flavobacterium</i>			<i>Flavobacterium</i>	<i>Flavobacterium</i>
		<i>Flexibacter</i>			<i>Flexibacter</i>
		<i>Haliscomenobacter hydrossis</i>			<i>Haliscomenobacter hydrossis</i>
		<i>Herpetosiphon</i> spp.			<i>Herpetosiphon</i> spp.
		<i>Hypomicrobium</i>		<i>Hypomicrobium</i>	<i>Hypomicrobium</i>
				<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella</i>
		<i>Miclothrix parvicella</i>			<i>Miclothrix parvicella</i>
		<i>Microlunatus phosphovorus</i>			<i>Microlunatus phosphovorus</i>
		<i>Microsphaera multipara</i>			<i>Microsphaera multipara</i>
			<i>Micrococcus</i>		<i>Micrococcus</i>
				<i>Moraxella</i>	<i>Moraxella</i>
	<i>Nitrobacter</i>			<i>Nitrobacter</i>	<i>Nitrobacter</i>
				<i>Nitrococcus</i>	<i>Nitrococcus</i>
				<i>Nitrocystis</i>	<i>Nitrocystis</i>
				<i>Nitrosococcus</i>	<i>Nitrosococcus</i>
	<i>Nitrosomonas</i>			<i>Nitrosomonas</i>	<i>Nitrosomonas</i>
				<i>Nitrospira</i>	<i>Nitrospira</i>
				<i>Nitrospira</i>	<i>Nitrospira</i>
		<i>Nocardia</i> spp.			<i>Nocardia</i> spp.
		<i>Nostocoida limicola</i>			<i>Nostocoida limicola</i>
				<i>Pasteurella</i>	<i>Pasteurella</i>
				<i>Proteus</i> spp.	<i>Proteus</i> spp.
			<i>Paracoccus</i>		<i>Paracoccus</i>
		<i>Pseudomonas</i>		<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>
			<i>Pseudomonas (fluorescentes)</i>		<i>Pseudomonas (fluorescentes)</i>
		<i>Sphaerotilus natans</i>			<i>Sphaerotilus natans</i>
		<i>Thiothrix</i> spp.		<i>Thiothrix</i>	<i>Thiothrix</i> spp.
	<i>Zoogloea</i>	<i>Zoogloea ramigera</i>		<i>Zoogloea</i> spp.	<i>Zoogloea ramigera</i>
Filtro percolador			<i>Achromobacter</i>		<i>Achromobacter</i>
			<i>Alcaligenes</i>		<i>Alcaligenes</i>
	<i>Bacillus</i>				<i>Bacillus</i>
	<i>Desulfovibrio</i>				<i>Desulfovibrio</i>
			<i>Flavobacterium</i>		<i>Flavobacterium</i>
			<i>Nitrobacter</i>		<i>Nitrobacter</i>
			<i>Nitrosomonas</i>		<i>Nitrosomonas</i>
			<i>Pseudomonas</i>		<i>Pseudomonas</i>
			<i>Sphaerotilus</i>		<i>Sphaerotilus</i>
			<i>Zoogloea</i>		<i>Zoogloea</i>

Tabla 1 (continuación). Bacterias presentes en los sistemas de tratamiento de aguas residuales

Digestión ana	Mc Kinney, 1962	Stronach, 1997	Bitton, 1994	
Hidrólisis				
	<i>Acetobacterium aceticum</i>			
		<i>Acetovibrio celluliticus</i>		<i>Acetobacterium aceticum</i>
	<i>Acetobacterium wieringae</i>			<i>Acetovibrio celluliticus</i>
	<i>Acetobacterium wodii</i>			<i>Acetobacterium wieringae</i>
	<i>Aerobacter</i>			<i>Acetobacterium wodii</i>
	<i>Alcaligenes</i>			<i>Aerobacter</i>
		<i>Bacteroides</i>	<i>Bacteriodes</i>	<i>Alcaligenes</i>
		<i>Bacillus</i>		<i>Bacillus</i>
			<i>Bifidobacterium</i>	<i>Bifidobacterium</i>
		<i>Clostridium</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Clostridium</i>
	<i>Clostridium formicoaceticum</i>			<i>Clostridium</i>
		<i>Desulfobacter</i>		<i>Desulfobacter</i>
		<i>Desulfomonas</i>		<i>Desulfomonas</i>
		<i>Desulfovibrio</i>		<i>Desulfovibrio</i>
		<i>Escherichia</i>		<i>Escherichia</i>
		<i>Eubacter limosum</i>		<i>Eubacter limosum</i>
	<i>Flavobacterium</i>			<i>Flavobacterium</i>
		<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus</i>
		<i>Micrococcus</i>		<i>Micrococcus</i>
	<i>Pelobacter</i>			<i>Pelobacter</i>
		<i>Peptococcus</i>		<i>Peptococcus</i>
		<i>Pseudomonas</i>		<i>Pseudomonas</i>
		<i>Proteus vulgaris</i>		<i>Proteus vulgaris</i>
		<i>Sarcina</i>		<i>Sarcina</i>
		<i>Selenomonas</i>		<i>Selenomonas</i>
		<i>Staphylococcus</i>		<i>Staphylococcus</i>
		<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus</i>
		<i>Syntrobacter wolinii</i>		<i>Syntrobacter wolinii</i>
		<i>Syntrophomonas wolfei</i>		<i>Syntrophomonas wolfei</i>
		<i>Vellionella</i>		<i>Vellionella</i>
		<i>Vibrio</i>		<i>Vibrio</i>
		<i>Zymomonas mobilis</i>		<i>Zymomonas mobilis</i>
			<i>Syntrobacter wolinii</i>	<i>Flavobacterium</i>
			<i>Syntrophomonas wolfei</i>	<i>Alcaligenes</i>
Metanogénicas				
			<i>Methanobacterium formicicum</i>	<i>Methanobacterium formicicum</i>
			<i>M. Bryanti</i>	<i>M. Bryanti</i>
			<i>M. Thermoautotrophicum</i>	<i>M. Thermoautotrophicum</i>
			<i>M. Ruminantium</i>	<i>M. Ruminantium</i>
		<i>Methanobrevibacter</i>	<i>Methanobrevibacter arboriphilus</i>	<i>Methanobrevibacter arboriphilus</i>
			<i>M. Smighii</i>	<i>M. Smighii</i>
			<i>M. Vannielli</i>	<i>M. Vannielli</i>
		<i>Methanococcus</i>	<i>Methanococcus voltae</i>	<i>Methanococcus voltae</i>
			<i>Methanogenium cariaci</i>	<i>Methanogenium cariaci</i>
			<i>M. Morisnigri</i>	<i>M. Morisnigri</i>
			<i>Methanospirillum hungatei</i>	<i>Methanospirillum hungatei</i>
			<i>M. Barkei</i>	<i>M. Barkei</i>
		<i>Methanosarcina</i>	<i>Methanosarcina mazei</i>	<i>Methanosarcina mazei</i>
		<i>Methanotrix</i>	<i>Methanotrix</i>	<i>Methanotrix</i>
		<i>Methanomicrobium</i>		<i>Methanomicrobium</i>

NOMENCLATURA

a: Forma anteiso de un Ácido Graso

ADH: arginina

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ACP: Análisis de Componentes Principales

AG: Ácidos Grasos

AGC: Ácidos Grasos Celulares

AGF: Ácidos Grasos Fosfolipídicos

AMY: amigdalina

ARA: arabinosa

ARDRA: Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (Análisis de restricción de AND ribosomal amplificado)

API: Analytical Profile Index

ARNr: Ácido Ribonucleico Ribosómico

BHI: Bread Heart Infusion (Caldo infusión cerebro-corazón)

BBL system: Sistema de Identificación para bacterias anaerobias

c: Forma cis de un ácido graso

CIT: Citrato sódico

CHP: Cuenta Heterótrofa en Placa

CDA: Convertidor Análogo Digital

COT: Carbono Orgánico Total

cy: Forma ciclopropánica de un ácido graso

DAF: Diacetato de Fluoresceína

DGGE: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (Electroforesis en gradiente de gel desnaturalizante)

DIOC: Dihexilaxacarbocianina

FISH: Fluorescence *In Situ* Hybridization (Hibridación in situ fluorescente)

FMP: Fotomultiplexor

G-C: Guanina- Citosina

GEL: Gelatina de Kohn

GLU: Glucosa

HCl: Ácido clorhídrico

Ho: Hipótesis nula

H₁: Hipótesis alterna
H₂S: Tiosulfato sódico
i: Forma iso de un Ácido Graso
IND: Indol
INO: Inositol
IP: Yoduro de Propidio
LDC: Lisina
MAN: Manitol
ME: Grupo metilo en un ácido graso
MEL: melobiosa
µm: Micrómetros
NaCl: Cloruro de Sodio
NADH: Forma reducida de la nicotinamida
nm: Nanómetro
NMP: Número Más Probable
NTU: Nephelometric Units (unidades nefelométricas)
ODC: ornitina
OH: Grupo hidroxilo presente en un ácido graso
OHPA: Bacterias acetogénicas productoras de hidrógeno
OHPAb: Bacteria Acetoclástica Butirótrofas
OHPAp: Bacteria Acetoclástica Propionótrofas
ONPG: o-nitrofenol-b-D-galactósido
OX : Oxidasa
PCR: Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
RAPD: Random Amplified Polymorphism DNA (ADN Polimórfico Amplificado al Azar)
RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism (Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción)
RHA: Ramnosa
RISA: Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (Análisis del Espacio Intergénico Ribosomal)
SAC: Sacarosa
SSCP: Single Strand Conformation Polymorphism (Polimorfismo de Conformación de Hebra Simple)
SBR: Sequencing Batch Reactor (Reactor en lote)
SSI: Sólución Salina Isotónica

SSV: Sólidos Suspendidos Volátiles

t: Forma trans de un ácido graso

TDA: Triptofano

TGGE: Temperature Gradient Gel Electrophoresis (Electroforesis en gradiente de gel térmico)

trans/cis: Relación de un ácido graso en su forma trans y cis

TRH: Tiempo de Retención Hidráulico

T-FRLP: Terminal-restriction fragment length polymorphism (Polimorfismo de longitud del fragmento de restricción terminal)

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

URE: Urea

VP: Piruvato sódico

w: Grupo alifático al final de un ácido graso

Δ : Carboxilo final de un ácido graso

PUBLICACIONES DERIVADAS DEL DOCTORADO

En revistas indexadas de circulación internacional

Maribel Quezada, Germán Buitrón, Iván Moreno-Andrade, Gloria Moreno and Luz M. López-Marín. (2007). The use of fatty acid methyl esters as biomarkers to determine aerobic, facultatively aerobic and anaerobic communities in wastewater treatment systems. *FEMS Microbiol. Lett.* 266. Págs. 75-82.

Artículos en extenso en Congresos Internacionales

Maribel Quezada y Germán Buitrón. (2004). Cellular fatty acids biomarkers for bacteria community structure determination in wastewater treatment systems. *10th International Symposium on Microbial Ecology.* (ISME). 22-27/08/2004. Cancún, México.

Artículos en Congresos Nacionales

Maribel Quezada, Rafael Machado y Germán Buitrón. (2003). Influencia del ayuno en el perfil cromatográfico de ácidos grasos celulares de *P. aeruginosa*. *X Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.* 8-12/09/2003. Puerto Vallarta, Jalisco.

Maribel Quezada y Germán Buitrón. (2004). Ácidos Grasos Celulares biomarcadores de estrés por ayuno en *P. aeruginosa* ATCC 10145. *XIV Congreso Nacional de Ingeniería Sanitaria y Ciencias Ambientales.* 12-14/05/2004. Mazatlán, Sinaloa.

Iván Moreno Andrade, Maribel Quezada Cruz, Luz María López Marín y Germán Buitrón. (2007). Análisis del perfil de ácidos grasos celulares como biomarcadores para determinar comunidades microbianas en plantas de tratamiento. *XII Congresos Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.* 25-29/06/2007. Morelia, Michoacán.