

5. ANÀLISI DE LÍPIDS

5.1. Introducció

Els **lípid**s en els arqueobacteris es troben principalment com a constituents de la membrana plasmàtica. Els més abundants són els glicerolípid, és a dir els que contenen una molècula de glicerol formant part de la seva estructura. A la naturalesa, els tres grups hidroxil de la molècula de glicerol es poden trobar substituïts per diferents radicals, en el cas que un d'ells estigui substituït per un hidrat de carboni el compost s'anomena glicosilglicerolípid. En funció de la polaritat que presenten els glicerolípid poden classificar-se en lípid neutres i lípid polars (veure **figura 5.1**). Així mateix pot establir-se una segona classificació basada en la naturalesa del tipus d'enllaç del substituent apolar, de manera que si els enllaços són de tipus ester, els compostos s'anomenen acilglicerols, mentre que si els enllaços són de tipus èter s'anomenen alquilglicerols, existint també compostos mixtos anomenats alquilacilglicerols. En els **arqueobacteris** els glicerolípid són del tipus **alquilglicerols**. La seva estructura general pot veure's a la **figura 5.2**.

Els lípid arqueobacterians difereixen principalment dels de la resta d'organismes en què posseeixen **cadena**s d'**hidrocarburs isoprenoides** unides amb **enllaç èter** a la molècula de glicerol, així mateix el glicerol també presenta una **quiralitat pròpia** en els arqueobacteris diferent de la dels glicerolípid de la resta d'organismes. Un bacteri que no tingui aquestes característiques no és considerat arqueobacteri (Pond *et al*, 1986). Aquestes tres característiques tenen **rellevància filogenètica** (de Rosa *et al*, 1986; Gambacorta *et al*, 1994). Tots els enllaços èter-glicerol als arqueobacteris contenen un 2,3-*sn*-glicerol, i els grups polars, quan hi són presents, estan units al carboni 1. Aquests fets són inusuals en comparació amb els homòlegs no arqueobacterians, o diacilglicèrids, en els que el glicerol, es coneix amb una estereoquímica 1,2-*sn* mentre que els grups polars estan units al carboni 3. Per altra banda, tot i que de lípid isoprenoides amb funcions específiques se'n donen a la membrana lipídica de moltes cèl.lules, els lípid amb enllaç èter dels *Archaea* són els únics que constitueixen els components estructurals majoritaris de la membrana en

la que es troben. Els arqueobacteris també mostren una notable proporció de glicosilglicerolípid o glicolípid, també s'han analitzat els derivats fosfolípids (Nichols *et al*, 1993). Mitjançant la maduració al laboratori de bacteris metanògens s'han obtingut hidrocarburs isoprenoides (Rowland, 1990).

A la **taula 5.1** pot veure's la distribució de les diferents classes de lípids neutres, glicolípid i lípids polars) en els arqueobacteris.

Taula 5.1. Proporció de les classes de lípids en els lípids totals d'arqueobacteris (Smith, 1988)

Organisme	Lípids neutres (%)	Glicolípid	Lípids polars
Halòfils			
<i>Halobacterium salinarium</i>	7	93	
<i>Halobacterium maris-mortui</i>	14	86	
<i>Halobacterium R-4</i>	7	93	
Metanògens			
<i>Methanospirillum hungatei</i>	6	94	
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	21	79	
Termòfils			
<i>Thermodesulfobacterium commune</i>	17	13	70
Termoacidòfils			
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	10	68	22
<i>Thermoplasma acidophilum</i>	18	25	57

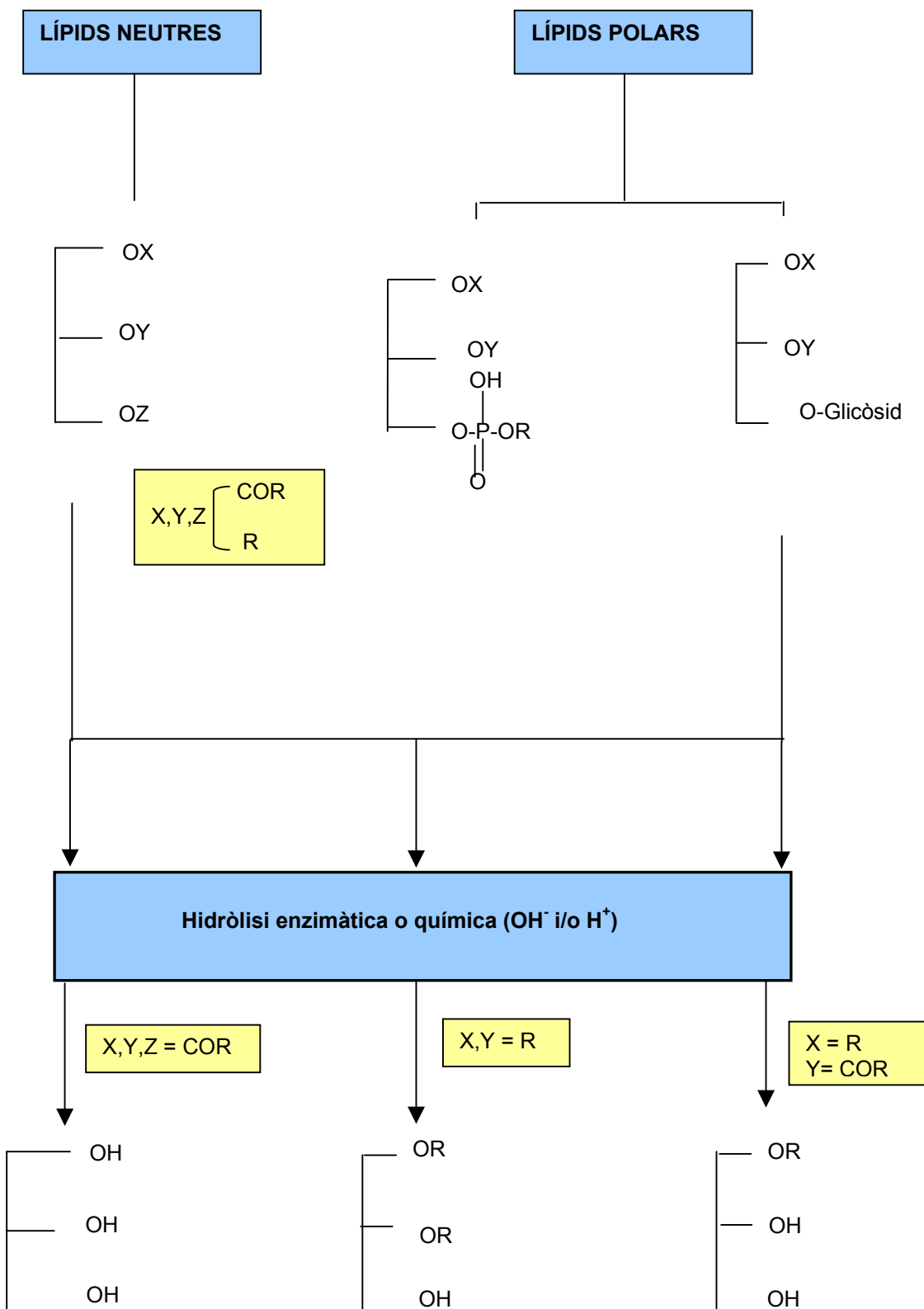
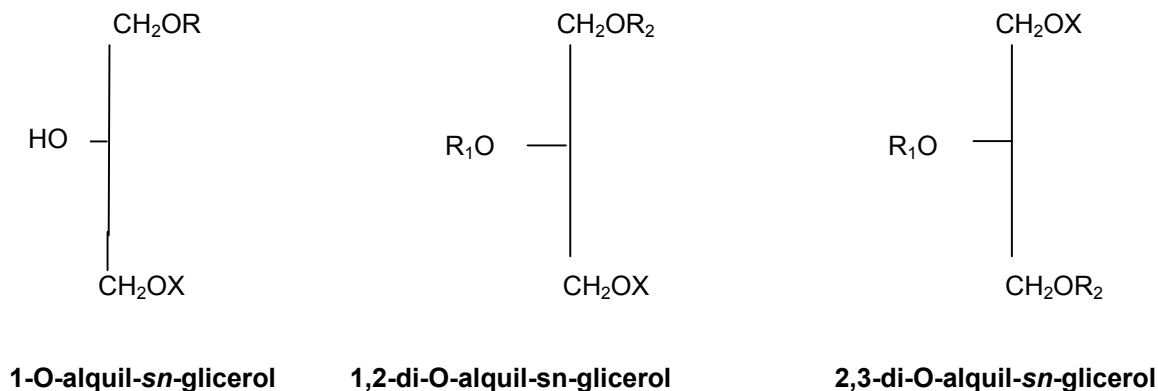


Figura 5.1. Classificació dels glicerolípid segons la polaritat dels substituents (Teixidor, 1996).

ALQUILGLICEROLS



(X = H; PO₃HR'; glicòsid)

(R_x = Cadenes alifàtiques)

Figura 5.2. Estructura general dels alquilglicerols.

Si bé els lípids es troben majoritàriament a la membrana plasmàtica, cal esmentar (König, 1988) que els arqueobacteris tenen diversitat d'envoltures cel.lulars. A diferència de la majoria d'eubacteris, no tenen a la seva paret cel.lular un mateix polímer. Sovint formen capes simples de subunitats de proteïna o glicoproteïna, força vegades amb perfils restringits únicament als arqueobacteris. Els arqueobacteris amb perfils d'envoltura cel.lular diferents mostren diferents maneres de divisió cel.lular. Les envoltures cel.lulars dels arqueobacteris estan sovint exposades directament a ambients extrems. L'elucidació estructural dels seus lípids ens permet dibuixar conclusions generals sobre la filogènia i la biosíntesi dels mateixos (Gambacorta *et al*, 1993).

Per tal d'establir la contribució arqueobacteriana en mostres de procedència diversa o en cultius bacterians mixtos, es fa necessària la utilització de **biomarcadors** específics:

- El **2,3-di-O-fitanil-*sn*-glicerol** - C₂₀,C₂₀ - que conté dues cadenes C₂₀ isoprenoides és present en **tots els arqueobacteris** dels que s'ha estudiat els lípids, anomenant-se nucli "universal" dels lípids arqueobacterians, que s'utilitza com a biomarcador d'aquests organismes.

Altres biomarcadors arqueobacterians utilitzats clàssicament són diversos hidrocarburs isoprenoides entre els que destaquen els isoprenoides cap-cap (Philp, 1985), el compost 2,6,10,15,19-pentametilicosà i l'hidrocarbur isoprenoide esqualà (Peters i Moldowan, 1993). Així mateix, una relació pristà/fità baixa que indica ambient reductor o anòxic (Cabrera, 1999) és un paràmetre que dóna suport a la presència arqueobacteriana. Per altra banda, en estudis de fang de digester anaerobi de depuradora amb substrat metanogènic s'ha vist un predomini dels àcids carboxílics de 16 i 18 àtoms de carboni (Schmidt i Ahring, 1994).

Els **arqueobacteris halòfils** comprenen dos grups principals: un d'ells està format per aquells bacteris aïllats que creixen a la neutralitat o pròxims a ella (halobacteris no alcalòfils) i l'altre grup format per bacteris que només creixen a pH elevats (arqueobacteris haloalcalòfils). La cromatografia de capa fina es va descriure (Ross, 1981) com un procediment ràpid de detecció i diferenciació respecte els lípids de lípids d'arqueobacteris halòfils.

En **arqueobacteris haloalcalòfils** (de Rosa *et al*, 1982, 1983b, 1988, Lanzotti *et al*, 1989a) s'ha trobat que el C_{20},C_{20} (2,3-di-O-fitanil-sn-glicerol) representa el 9% en pes de la fracció dièter isoprenoide, la resta comprèn un 85% en pes del dièter C_{20},C_{25} (2-O-sesterpanil-3-O-fitanil-sn-glicerol) i un 6% en pes del dièter C_{25},C_{25} (2,3-di-O-sesterpanil-sn-glicerol). Els gèneres *Nanotrobacterium* i *Nanotrococcus* tenen una composició relativament simple de lípids polars, ja que no contenen ni glicolípid ni aminolípid, tot i així presenten diferències en la distribució de fosfatidilglicerol i fosfatidilglicerofosfat en els lípids C_{20},C_{20} i C_{25},C_{20} (De Rosa *et al*, 1988). A *Nanotrococcus occultus* s'ha identificat un fosfolípid amb fosfat cíclic (2,3-di-O-fitanil-sn-glicero-1-fosforil-3'-sn-glicero-1',2'-ciclofosfat) així com la forma 2-O-sesterpanil-3-O-fitanil (C_{25}, C_{20}) del mateix dièter (**figura 5.3**)(Lanzotti *et al*, 1989 b). També a *Nc. occultus* s'ha observat l'existència d'un complex de glicina-betaïna amb fosfatidilglicerofosfat, així com un increment d'aquest complex,

al mateix temps que un increment entre la relació entre fosfatidilglicerofosfat i fosfatidilglicerol en fer créixer les cèl.lules amb diferents concentracions de sal (Nicolaus *et al*, 1989).

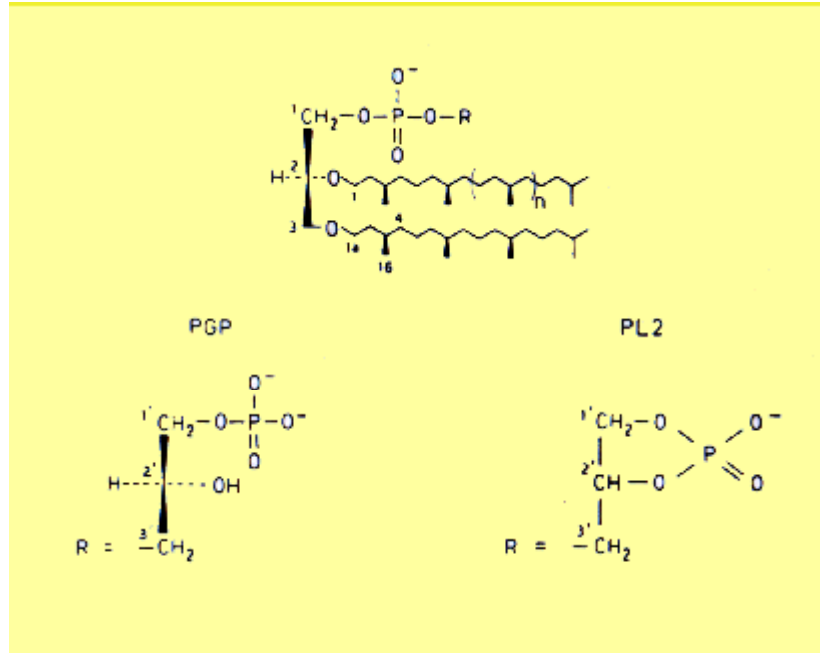


Figura 5.3. Estructures químiques de C_{20} , C_{20} ($n=1$) i C_{25} , C_{20} ($n=2$) PGP i PL2. PGP, 2,3-di-O-fitanil-*sn*-glicero-1-fosforil-3'-*sn*-glicerofosfat. PL2, 2,3-di-O-fitanil-*sn*-glicero-1-fosforil-3'-*sn*-glicero-1',2'-fosfat cíclic. La forma C_{25} , C_{20} tenen cadenes de sesterpanil en comptes de fitanil al C-2 del glicerol (segons Lanzotti *et al*, 1989 b).

En **halobacteris no alcalòfils**, un dels gèneres inicialment més estudiats pel que fa a la seva composició lipídica és *Halobacterium*. A *H. cutirubrum* s'ha identificat (Kates *et al*, 1965) un dièter anàleg al fosfatidilglicerofostat, el 2,3-di-O-[3',7',11',15'-tetrametilhexadecil]-gliceril-1-fosforil-[1''(3'')gliceril-3''(1'')fosfat], segons la nomenclatura de Hirschmann. A la mateixa espècie s'han identificat tres glicolípid (Smallbone i Kates, 1981): un glicolípid sulfat, GL-1, (2,3-di-O-fitanil-1-O-[Galp-(3-SO₄⁻)β1->6Manp(3<-1αGalp)α1->2Glcα]-*sn*-glycerol); i dos glicolípid, GL-2 (que és el producte GL-1 desulfurilat: 2,3-di-O-fitanil-1-O-[Galpβ1->6Manp(3<-1αGalp)α1->2Glcα]-*sn*-glycerol) i GL-3 (2,3-di-O-fitanil-1-O-[Galpβ1->6Manpα1->2Glcα]-*sn*-glycerol). De la mateixa espècie, s'han fet estudis de la membrana lipídica per criofractura (Quinn *et al*, 1986), i de la biosíntesi dels lípid polars (Moldoveanu i Kates, 1988). S'han descrit els lípid d'una espècie d'aquest gènere que viu al mar Mort, *H. marismortui* (Evans *et al*, 1980). També s'ha mostrat que les bacterioruberines

disminueixen la permeabilitat aquosa i incrementen la rigidesa de la bicapa lipídica en *Halobacterium* (Lazrak *et al*, 1988).

Kushwaha *et al* (1982 a i b) van estudiar els lípids d'halòfils extrems provinents de salines d'Espanya: tots ells tenen isoprenoides C_{30} (esqualè, dihidroesqualè i tetrahidroesqualè), carotens C_{40} (β -carotè), pigments C_{50} (bacterioruberines) i vitamina MK-8. Tots els lípids polars són derivats del 2,3-di-O-fitanil-sn-glicerol. També es van trobar difitanilglicerolèters anàlegs del fosfatidilglicerol i del fosfatidilglicerofosfat a totes les soques, mentre que de sulfatoglicolípids no se'n van detectar a la totalitat de les soques. Totes contenen diglicosildifitanildièter.

Hi ha treballs que mostren que tots els halobacteris estudiats no alcalòfils del gènere *Halococcus* provinents de salines d'Espanya tenen el mateix patró de lípids polars: dièters moleculars C_{20} - C_{20} i C_{25} - C_{25} de fosfatidilglicerofosfat, fosfatidilglicerol, i àcid fosfatídic; un fosfatidilglicerofosfat isoprenoid monoinsaturat C_{20} - C_{20} (fitanil-fitenil), un sulfatodiglicosildifitanilglicerol, un fosfoglicolípide i traces de dos glicolípids no identificats (Moldoveanu *et al*, 1990).

A *Halobacterium marismortui* s'ha trobat (Evans *et al*, 1980) un 86% de lípids polars i un 14% d'apolars. Entre els polars en destaquen quatre (**figura 5.4**), tots ells derivats del 2,3-di-O-fitanil-sn-glicerol: (1) 2,3-di-O-fitanil-1-O- $[\beta$ -D-glucopiranosil-(1'-6')-O- α -D-manopiranosil-(1'-2')-O- α -D-glucopiranosil]-sn-glicerol; (2) fosfatidilglicerol; (3) fosfatidilglicerofosfat i (4) fosfatidilglicerosulfat. Els lípids no polars d'aquest microorganisme, a l'igual que a *H. cutirubrum* consisteixen principalment en esqualens, vitamina MK-8 i bacterioruberines amb traces de β -carotè, licopè i retinal. També s'han estudiat els lípids polar de *H. sodomense* (Trincon *et al*, 1990).

La composició dels lípids polars ha estat utilitzada (Torreblanca *et al*, 1986; Tindall *et al*, 1987; Tindall, 1989; Montero *et al*, 1989) com a eina per a la classificació d'halobacteris no alcalòfils.

S'han trobat àcids grassos enllaçats covalentment a proteïnes a *Halobacterium cutirubrum* i al metanogen *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Pugh i Kates, 1994).

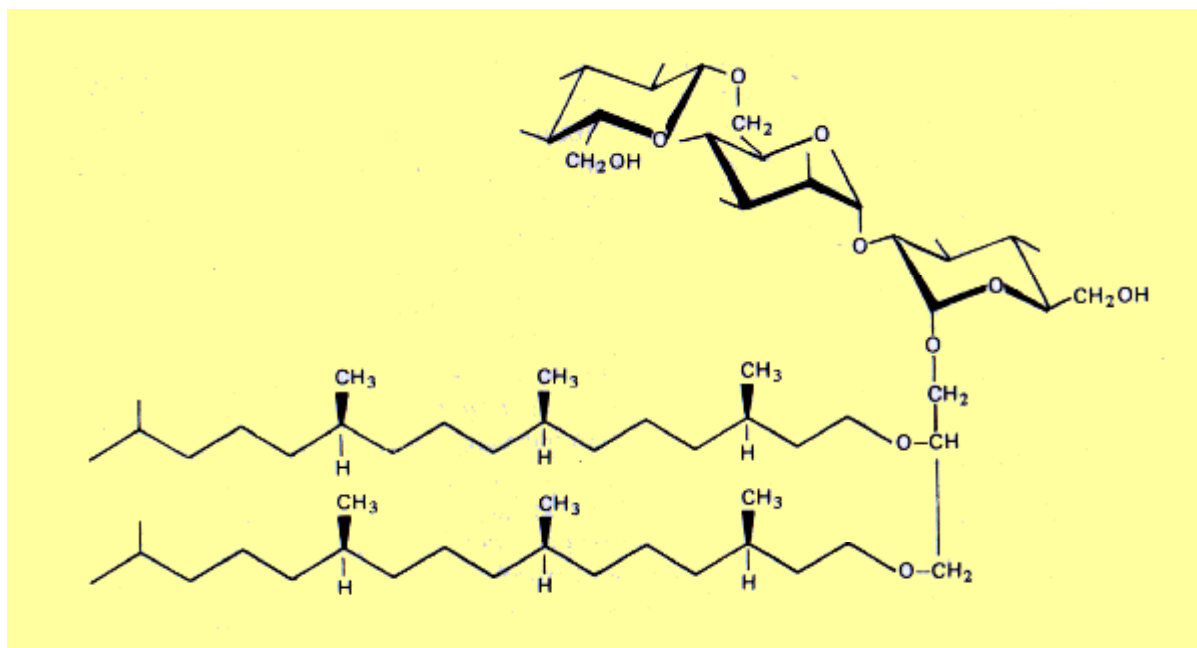
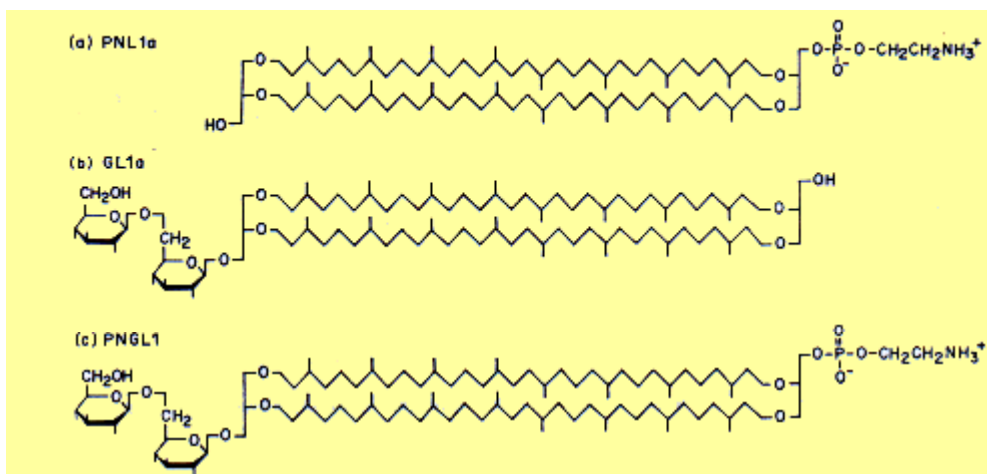


Figura 5.4. Estructura del triglicosildièter identificat a *Halobacterium marismortui* (Evans et al, 1980).

En el cas d'**arqueobacteris metanògens** també són nombrosos els estudis dels seus lípids. A l'any 1978 Tornabene i Langworthy van estudiar els lípids de nou soques de bacteris metanògens trobant que la seva estructura lipídica bàsica eren principalment isopraniilgliceroldièters i identificats com a difitanilgliceroldièters (C₂₀,C₂₀) i dibifitanildigliceroltetraèters (C₄₀,C₄₀), també van trobar que un 1% dels lípids polars consistien en àcids grassos identificats principalment com C_{18:0}, C_{18:1}, C_{17:0}, C_{16:0}, C_{15:0} i àcids ramificats

C₁₇ i C₁₅. Aquest estudi va donar suport a la llavors recent teoria que els bacteris metanògens, els halòfils i els termoacidòfils tenien una relació genealògica pròxima. L'anàlisi dels lípids permet quantificar les cèl.lules metanogèniques (Nichols *et al*, 1987; Demizu *et al*, 1992). S'han trobat anells de ciclopentà formant part de la cadena isoprenoide a diversos gèneres d'arqueobacteris metanògens (Trinconne *et al*, 1988; Gambacorta *et al*, 1994), i també s'han identificat sucres i grups polars constituents dels seus lípids (Kushwaha *et al*, 1981; Koga *et al*, 1993). Més recentment (Sinninghe Damsté *et al*, 1997) s'han caracteritzat isoprenoides C₂₅ i C₃₀ poliinsaturats en aquest grup d'arqueobacteris.

Una de les espècies que està més estudiada entre els metanògens és *Methanobacterium thermoautotrophicum*, (Koga *et al*, 1987; Aldrich *et al*, 1987; Nishihara i Koga, 1987 a Nishihara *et al*, 1987; Morii i Koga, 1994) probablement degut a que pot ser cultivada en quantitats apreciables sense que es contami. S'ha descrit un mètode per a l'extracció efectiva dels lípids tetraèter d'aquesta espècie mitjançant dissolvent acidificat amb HCl 2M i també s'ha determinat l'estructura de tetraèters derivats del dibifitanildigliceroltetraèter (**figura 5.5**) (C₄₀). Morii i Koga (1994) (**figura 5.6**) han proposat una nomenclatura alternativa a la de Hirschmann.



5.5. Estructura dels lípids polars majoritaris de *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Morii i Koga, 1994)

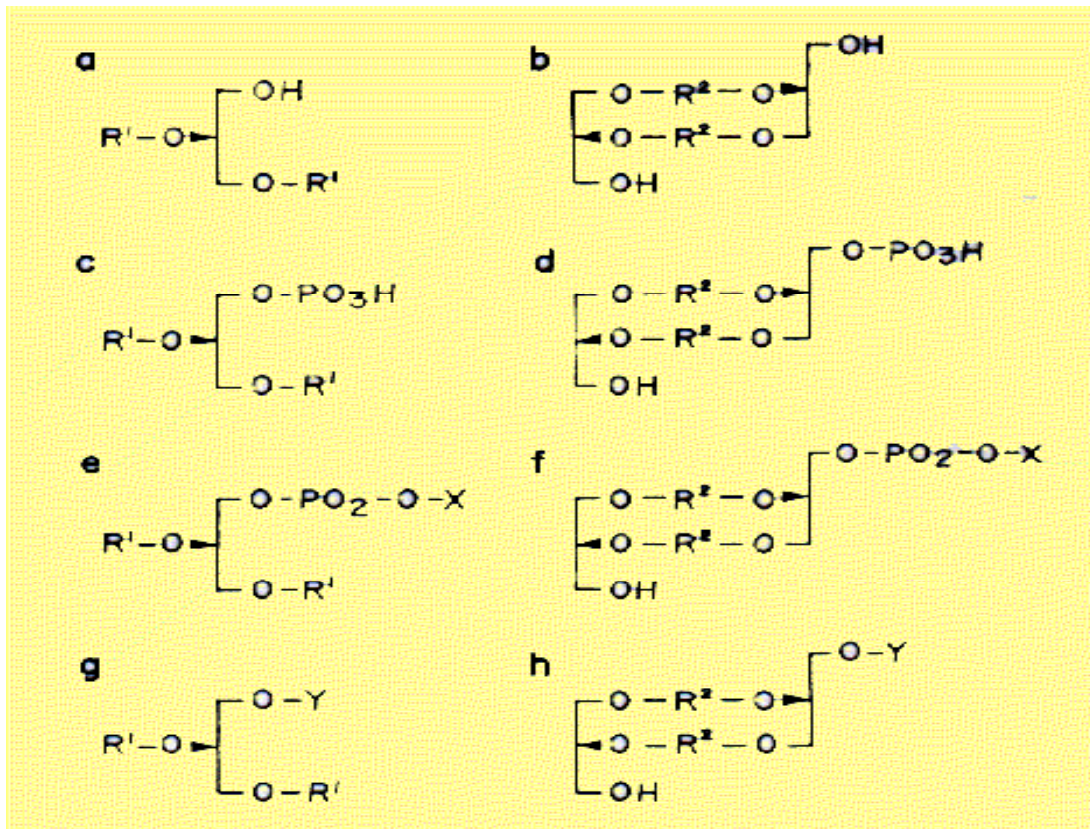


Figura 5.6. Nomenclatura proposada per lípids dièter i tetraèter arqueobacterians. R' és un grup alquil (normalment C₁₅, C₂₀ o C₂₅ isoprenoide); R² és un grup alcandiil (habitualment isoprenodiil), per exemple amb 40 carbonis amb o sense anells de ciclopentà. X representa un alcohol polar com serina, etanolamina, inositol, glicerofosfat o glicerol. Y representa la cadena glicosídica. a, arcaeol; b, caldarcaeol; c, àcid arcaetídic; d, àcid caldarcaetídic; e, arcaetidil X; f, caldarcaetidil X; g, glicosilarcaeol o glicosildialquilglicerol; h, glicosilcaldarcaeol, (Nishihara *et al*, 1987).

Per aquesta mateixa espècie s'ha detectat que la proporció dels lípids tipus tetraèter incrementa després de la fase de creixement logarítmic en compensació pel decreixement en lípids dièter i s'han descrit lípids dels tipus dièter i tetraèter asimètrics (Morii i Koga, 1993, 1994) (figura 5.7).

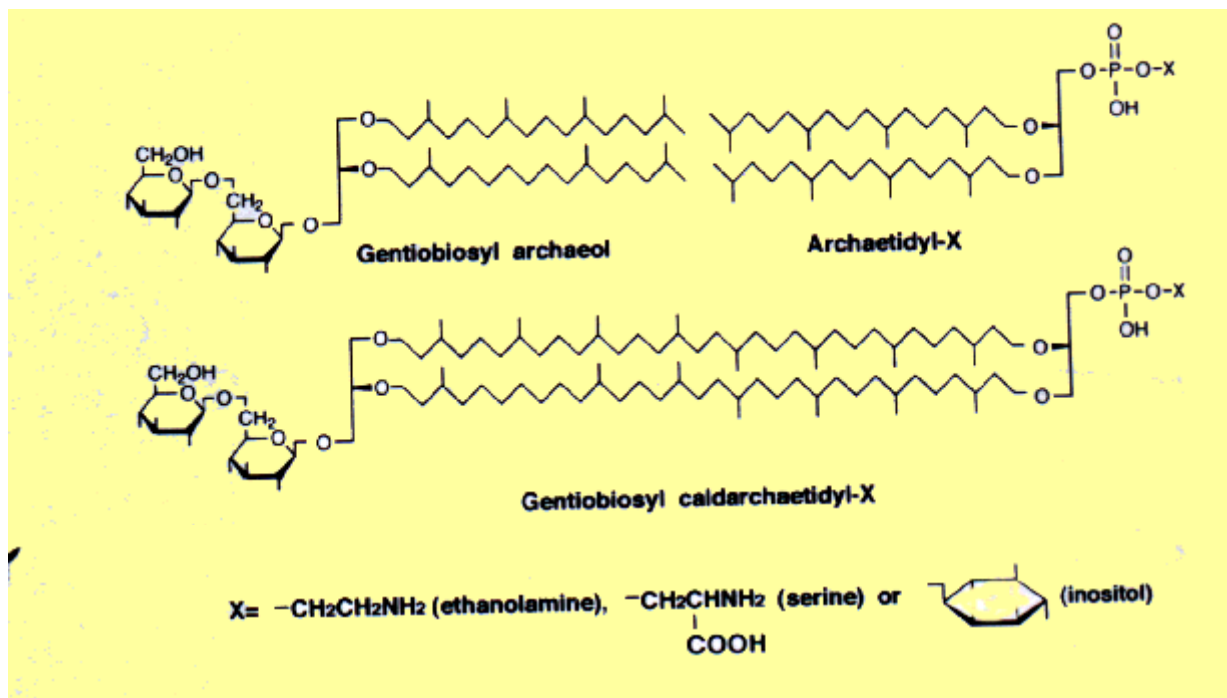


Figura 5.7. Estructures dels lípids polars majoritaris de *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Morii i Koga, 1994).

Una altra espècie de metanògens a la que s'han dedicat diversos estudis de caracterització de lípids és *Methanospirillum hungatei*. Els extractes cel·lulars d'aquesta espècie contenen fosfolípids del tipus dialquilglicerilèters i digliceroltetraèters (Sprott i McKellar, 1980). Kushwaha *et al.*, (1981) han identificat fosfoglicolípid derivats del dibifitanildigliceroltetraèter (**figura 5.8**). Ferrante *et al.*, (1987), han trobat en aquesta espècie l'estructura de lípids dièter que contenen grups N,N-dimetilamino i N,N,N-trimetilaminopentanetetrol (**figura 5.9**). Estudis posteriors caracteritzen altres fosfo i glicolípid també del tipus dialquilglicerilèters i digliceroltetraèters (Sprott *et al.*, 1994 a i b).

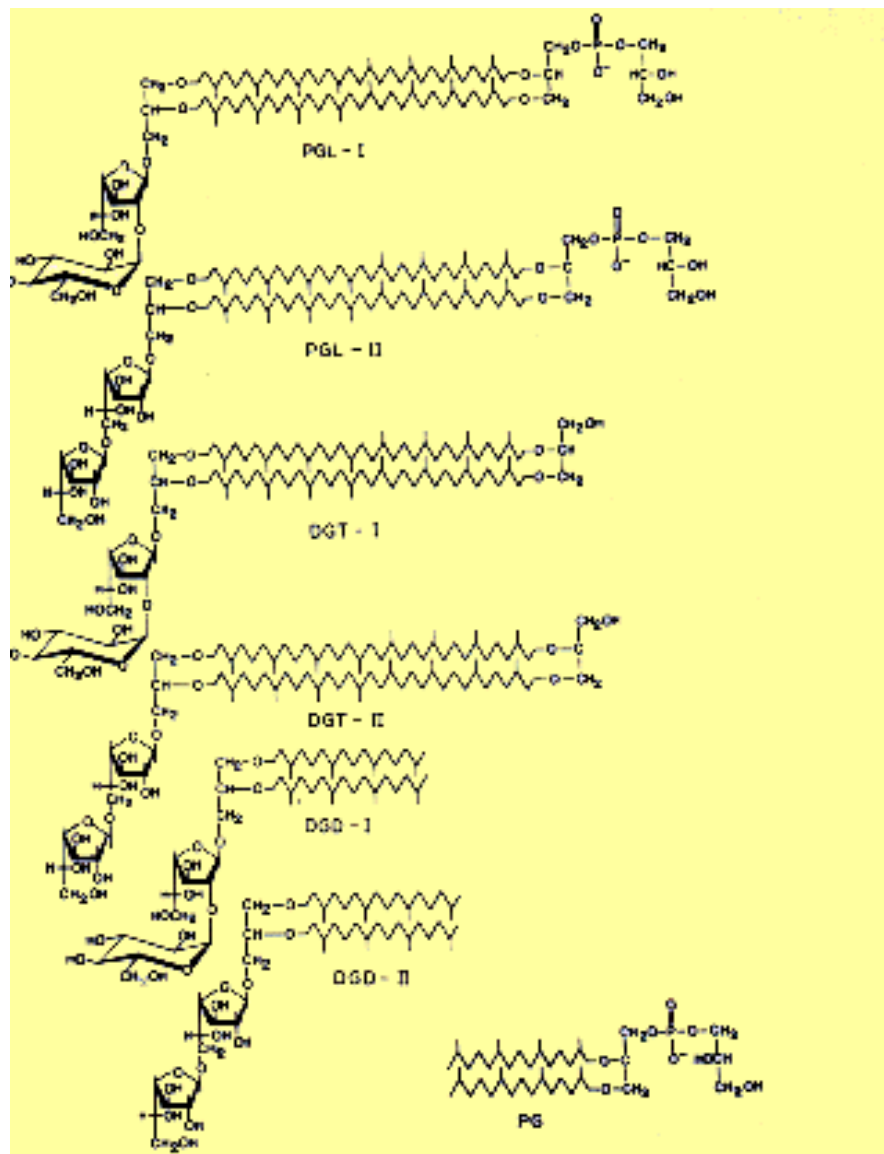


Figura 5.8. Estructures dels lípides polars de *Methanospirillum hungatei*. PGL, fosfoglicolípid; PG, fosfatidilglicerol, (Kushwaha *et al*, 1981a).

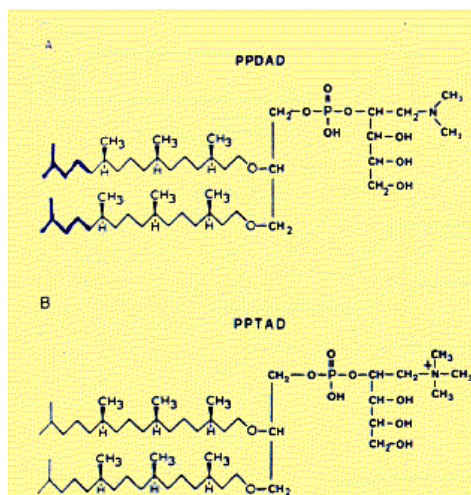


Figura 5.9. Estructures proposades pels dos fosfolípids majoritaris de *Methanospirillum hungatei* (Ferrante *et al*, 1987).

Del gènere *Methanosarcina* s'ha estudiat l'estructura química del polímer constituent de la seva paret cel·lular, o metanocondroitina (Kreisl i Kandler, 1986). Aldrich *et al* (1986) han establert l'ultraestructura de *M. mazei*. L'espècie més estudiada pel que fa a la seva composició lipídica és *Methanosarcina barkeri* (De Rosa *et al*, 1986; Nishihara i Koga, 1991, 1995), en els seus lípids hi ha un nucli de hidroxicarcaetidilserina, hidroxicarcaetidilmioinositol (**Figura 5.10**), i els fosfolípids hidroxicarcaetidilglicerol i hidroxicarcaetidiletanolamina. Hi ha un estudi (Sprott *et al*, 1994a) que mostra que hi ha una estreta relació entre els lípids polars de diferents espècies d'aquest gènere: *M.mazei*, *M.thermophila*, *M.acetivorans*, *M. barkeri* fusaro i *M. barkeri* MS. També s'han trobat (Schouten *et al*, 1998) biomarcadors comuns (2,6,10,15,19-pentametilicosens) als metanògens *Methanobrevibacter smithii* i *Methanosarcina mazei*.

A *Methanobrevibacter arboriphilus* també s'ha identificat un difitanilèter (Morii i Koga, 1986) del que s'ha determinat la configuració estereoquímica absoluta: 2,3-di-O-(3'R, 7'R, 11'R, 15'-tetrametilhexadecil)-sn-glicero-1-fosfo-L-serina.

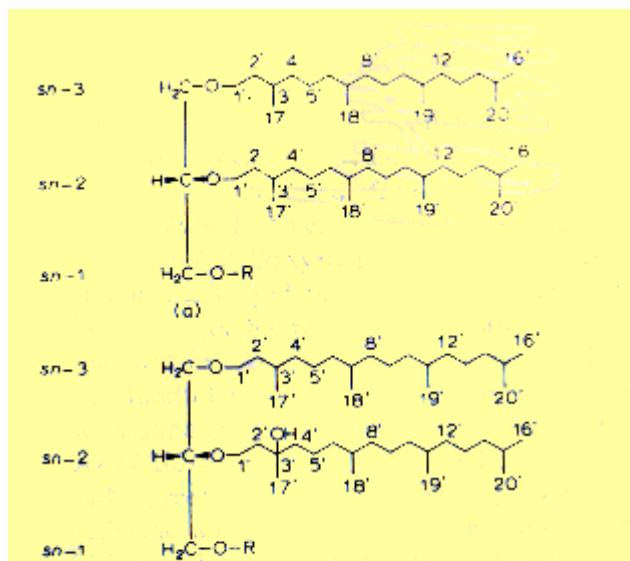


Figura 5.10. Estructures proposades desl lípids de *Methanosarcina barkeri* (Nishihara i Koga, 1991). (a) R = H (arcaeol); R = fosfoferina (arcaeitilserina); R = fosfomioinositol (arcaeitilmioinositol). (b) R = H (hidroxiarcaeol); R = fosfoferina (hidroxiarcaeitilserina); R = fosfomioinositol (arcaeitilmioinositol).

S'ha caracteritzat la membrana lipídica de *Methanococcus jannaschii* (Comita i Gagosian, 1983) trobant-hi un alquilglicerolèter macrocíclic, bis-(difitanil)digliceroltetraèter i bis-(fitanil)gliceroldièter. També s'han caracteritzat els glicolípid de *Methanococcus voltae* (Ferrante *et al*, 1986). S'han trobat hidroxidièters a diversos gèneres de metanògens (Sprott *et al*, 1990), s'ha caracteritzat (Ferrante *et al*, 1988 a i b) el nucli lipídic del metanogen aceticlàstic *Methanothrix concilii* GP6 i s'ha establert la composició dels lípids polars i neutres de *Methanosphaera stadtmanae* (Jones i Holzer, 1991), que s'ha trobat que té un isoprenoid C_{20} amb un enllaç cua-cua.

Hi ha estudis sobre els lípids d'un bacteri metanogen hidrotermal que mostren que els seus lípids neutres consisteixen en cadenes lineals d'alcans de $n-C_{22}$ a $n-C_{36}$ amb predomini de $n-C_{24}$, $n-C_{28}$, $n-C_{32}$ i $n-C_{36}$ i isoprenoides C_{25} , C_{30} i C_{35} (Holzer *et al*, 1988).

Els treballs sobre **arqueobacteris termòfils** també mostren el patró lipídic característic dels arqueobacteris, amb èters isoprenoides derivats del difitanilgliceroldièter ($C_{20,20}$). Un dels primers treballs (De Rosa *et al*, 1983a) amb *Sulfolobus solfataricus* comprova l'existència de tetraèters $C_{40,40}$

que inclouen anells de ciclopentà al mig de la cadena carbonada, així com grups hidroxil. D'aquesta espècie també s'ha estudiat l'organització i dinàmica dels lípids (Gliozzi *et al*, 1986 a i b; Gulik *et al*, 1986). L'estudi comparatiu de la composició lipídica entre el creixement aerobi i anaerobi de *Desulfurolobus ambivalens* (Trincon *et al*, 1989) revela que la principal diferència relacionada amb les condicions de creixement és el contingut i composició de quinones, mentre que el patró lipídic presenta les mateixes característiques excepte el grau de ciclització de les cadenes isoprenoides C₄₀.

Del gènere *Thermococcales* s'han estudiat (Lanzotti *et al*, 1989c) els lípids complexos de *Pyrococcus* i AN1. El complex lipídic majoritari a *Pyrococcus* és 2,3-di-O-fitanil-sn-glicero-1-fosforil-1'-mio-L-inositol, amb més d'un 90% dels lípids totals. A AN1 aquest lípid representa un 40% i un 45% correspon a 2,3-di-O-fitanil-sn-glicero-1(α -D-glucopiranosil-3-fosfat).

A *Desulfurococcus mobilis* s'ha vist (Lanzotti *et al*, 1987) que els seus lípids són majoritàriament derivats del bisdifitanildigliceroltetraèter (**figura 5.11**). A *Thermococcus celer* més d'un 80% dels lípids polars van ser identificats com un 2,3-di-O-fitanil-sn-glicerolèter del fosfatidil-mio-inositol (De Rosa *et al*, 1987).

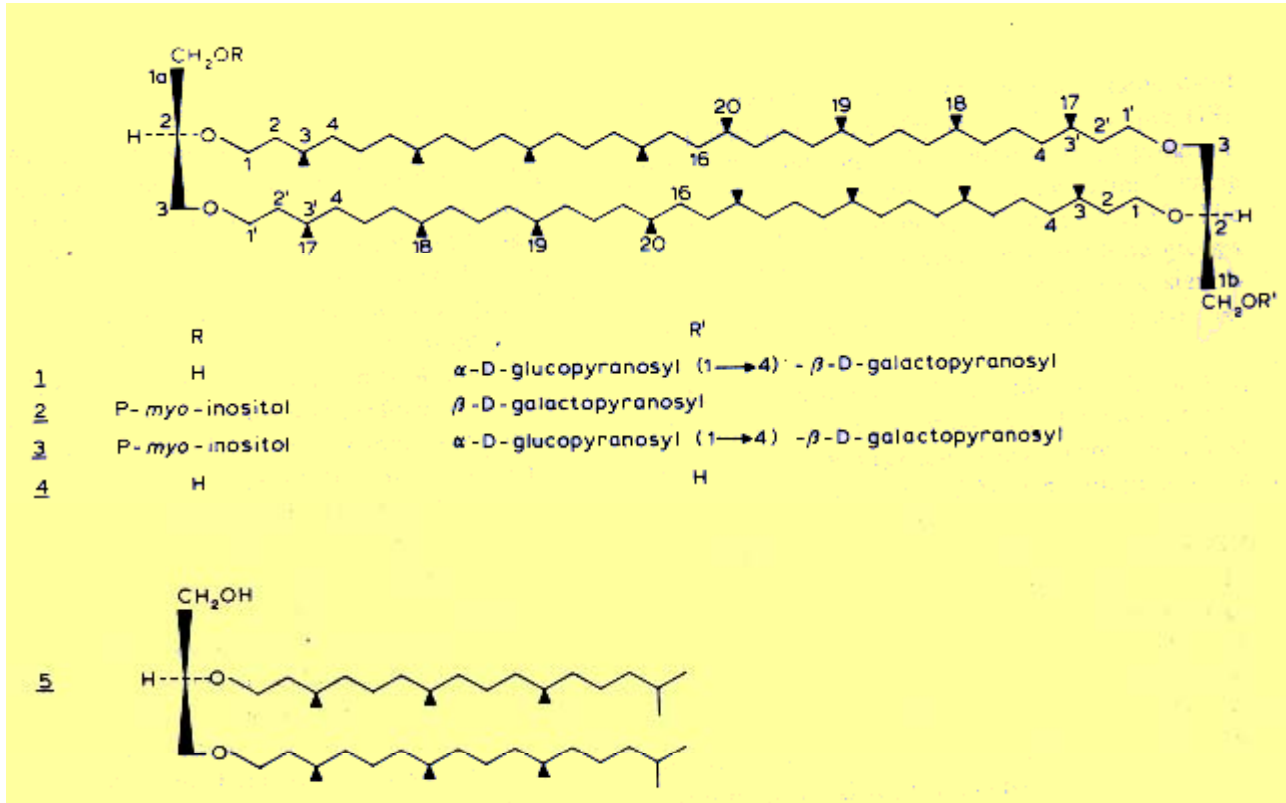


Figura 5.11. Lípids de *Desulfurococcus mobilis* (Lanzotti *et al*, 1987)

La composició lipídica de *Pyrococcus furiosus* consta majoritàriament de derivats de l'arcaeol (fosfatidilgliceroldièter, fosfatidil inositoldièter i diglicosildièter) i del caldarcaeol (diglicosilfosfatidilgliceroltetraèter i diglicosilfosfatidilinositoltetraèter). Els lípids polars de *Methanopyrus kandleri* són bàsicament sèries de glicolípid derivats de l'arcaeol amb una i fins a sis unitats d'hexosa, sobretot manosa (relació manosa:glucosa 9:1); fosfolípids derivats de l'arcaeol (fosfatidilinositoldièter, fosfatidilcolina dièter) i minoritàriament fosfoglicolípid derivats del caldarcaeol (principalment diglicosilfosfatidilgliceroltetraèter). Els extractes lipídics de *Methanothermus fervidus* contenen derivats de l'arcaeol (fosfatidilinositoldièter, diglicosildièter i acetildiglicosildièter) i del caldarcaeol (glicosilfosfatidilinositoltetraèter, diglicosilfosfatidilinositoltetraèter i acetildiglicosilfosfatidilinositoltetraèter; l'acetilació del sucre es donava de manera comú en aquest termòfil i s'incrementava quan les cèl.lules entraven a la fase estacionària de creixement. L'extracte lipídic de *Sulfolobus acidocaldarius* conté majoritàriament

lípidis derivats del caldarcaol i quantitats detectables de arcaeol i hidroxiarcaeol anàlegs de fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol i fosfatidiletanolamina. L'anàlisi lipídica d'aquestes quatre darreres espècies ha estat duta a terme amb espectrometria de masses amb bombardeig atòmic ràpid de ions negatius que permet detectar m/z des de valors petits fins de l'ordre de 2000 (Sprott *et al*, 1997).

Per a **analitzar els lípidis** s'han descrit diversos **mètodes** després de l'extracció. Entre ells destaquen la **cromatografia de gasos acoblada a l'espectrometria de masses (GC-MS)** descrita en nombrosos treballs a la bibliografia citada i que s'ha utilitzat en l'execució del treball experimental que es presenta en aquesta memòria.

5.2. Material i mètodes

L'extracció de lípids s'ha efectuar a la fase estacionària, el mètode d'extracció està descrit al capítol 4 de la present memòria (apartat 4.2).

En el moment abans d'injectar les mostres al cromatògraf, s'ha procedit a la derivatització amb N,O-bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA) de Fluka Chemie AG, per tal d'obtenir els trimetilsililèters.

S'han realitzat anàlisis utilitzant dues columnes cromatogràfiques diferents, a temperatura estàndard i a alta temperatura, ja que treballs previs (Teixidor, 1996) mostren que l'ús de columnes capil.lars d'alta temperatura permeten una millor identificació d'èters isoprenoides que la columna capil.lar estàndard. Les característiques de les columnes i els programes de temperatura es detallen tot seguit:

Columna capil.lar estàndard

Fase estacionària: DB-5MS

Espessor del recobriments: 0,1-15 µm.

Longitud de la columna: 30 m

Diàmetre interior: 0,25 mm.

Pressió del gas portador (Heli): 2 ml/min.

La temperatura de l'injector ha estat 60°C; el forn ha tingut un primer pendent de 15°C/min fins assolir la temperatura de 150°C; en aquest moment la velocitat de canvi de temperatura ha estat de 4°C/min fins els 310 °C, que s'han mantingut 45 minuts. S'han començat a enregistrar els resultats a partir dels 6 minuts per tal de no enregistrar els dissolvents. Les masses detectades van de 50 a 800 Daltons.

Columna capil.lar d'alta temperatura

Fase estacionària: OV-1

Espessor del recobriment: 0,15 μm .

Longitud de la columna: 10 m

Diàmetre interior: 0,25 mm.

Pressió del gas portador (Heli): 2 ml/min.

En aquest cas la temperatura de l'injector fou de 60°C, seguit d'un canvi de temperatura de 8°C/min fins a la temperatura de 340°C, que es mantingué durant 30 minuts (temperatura de l'injector 340°C i temperatura del detector 340°C)

El cromatògraf de gasos i l'espectròmetre de masses es controlaren amb un PC que disposa un software de tractament de dades MassLab 2.13

5.3 Resultats

Al present apartat es mostren els resultats obtinguts per als alcans lineals, identificats a partir dels corresponents fragmentogrames $m/z = 85$, per als àcids carboxílics identificats a partir dels fragmentogrames $m/z = 74$ corresponents als metilèsters o $m/z = 117$ corresponents als trimetilsililoxiderivats, i pels glicerolèters isoprenoides identificats en les mostres estudiades.

La identificació d'èters isoprenoides s'ha fet en base als seus pics característics. Treballs previs (Teixidor, 1996) mostren que els espectres de masses dels derivats sililats d'aquests compostos presenten intensitat molt baixa tant al pic molecular M^+ com als fragments $M^+ - CH_3$ i $M^+ - CH_2OSiMe_3$. Els ions més prominents corresponen als fragments $M^+ - C_nH_{2n+1}OH$, $M^+ - C_nH_{2n+1}OCH_3$, i $C_nH_{2n+1}O + SiMe_3 - H$.

En el present estudi s'han buscat els fragmentogrames corresponents als tres fragments esmentats donant a n els valors enters des de $n=15$ fins a $n=30$ per tal de detectar els èters isoprenoides des de C_{15} a C_{30} . A la **taula 5.2** es mostren les masses corresponents a cadascun dels tres fragments per a les cadenes carbonades de 15, 20, 25 i 30 àtoms de carboni.

Taula 5.2 Masses corresponents als fragments més prominents en èters isoprenoides

	M^+	$M^+ - C_nH_{2n+1}OH$	$M^+ - C_nH_{2n+1}OCH_3$	$C_nH_{2n+1}O + SiMe_3 - H$
C_{15}	584	356	342	299
C_{20}	724	426	412	369
C_{25}	864	496	482	439
C_{30}	1004	566	552	509

5.3.1. Cultius a partir de tapet microbià crescuts en dimetilsulfur

5.3.1.1. Alcans lineals

El fragmentograma dels n-alcans ($m/z=85$) en aquestes mostres dóna un predomini de compostos de cadena més curta que en les altres mostres estudiades (**figura 5.3.1**). Hi ha un predomini clar dels n-alcans de C_{16} a C_{24} i s'aprecien els pics corresponents al pristà i el fità com pot veure's a la **figura 5.3.2**. Al final dels fragmentogrames es detecten dos pics prominents en les dues mostres estudiades. El primer correspon al dièter isoprenoide C_{20},C_{20} (difitanilgliceroldièter) característic dels arqueobacteris. El segon pic (X), l'espectre del qual es mostra a la **figura 5.3.3**, pot tractar-se del compost dioctadecildisulfur (coeluit amb una silicona que explica el fragment $m/z = 207$), en ell s'observen els fragments $m/z=285$ ($C_{18}H_{37}S$), $m/z = 253$ ($C_{18}H_{37}$) i el fragment $m/z = 571$ ($M^+ + H$) que podria haver-se format a partir del substrat dimetilsulfur i cadenes alifàtiques presents a la mostra.

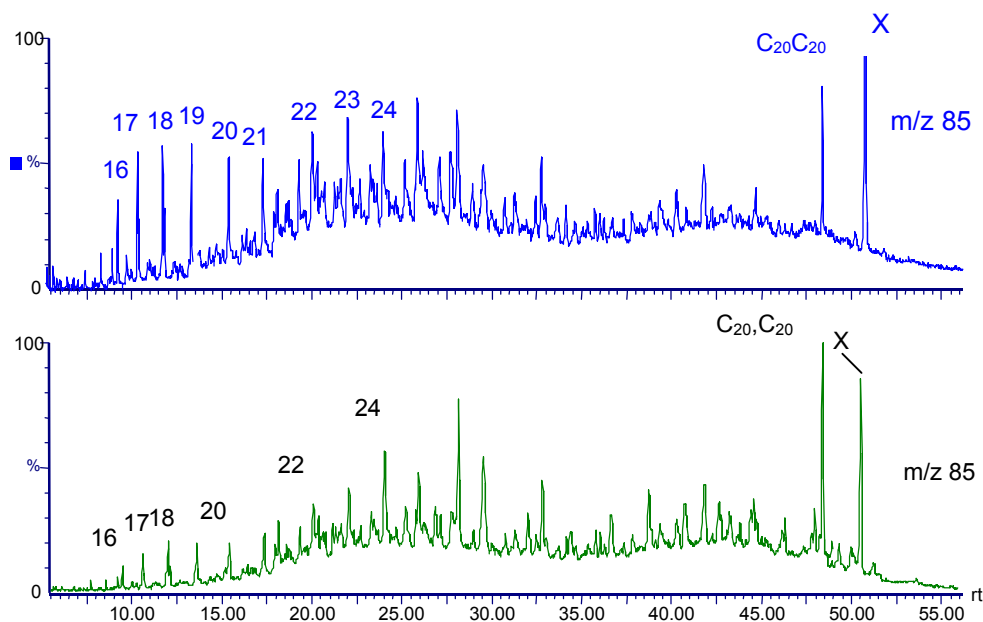


Figura 5.3.1 Cromatograma de masses dels alcans lineals ($m/z=85$) de les mostres dels cultius obtinguts a partir de tapet microbià de salines, amb dimetilsulfur. Els hidrocarburs lineals alifàtics s'indiquen amb el

nombre d'àtoms de carboni de l'alcà. $C_{20,20}$ = difitanilgliceroldièter. L'espectre del compost X es mostra a la figura 5.3.3.

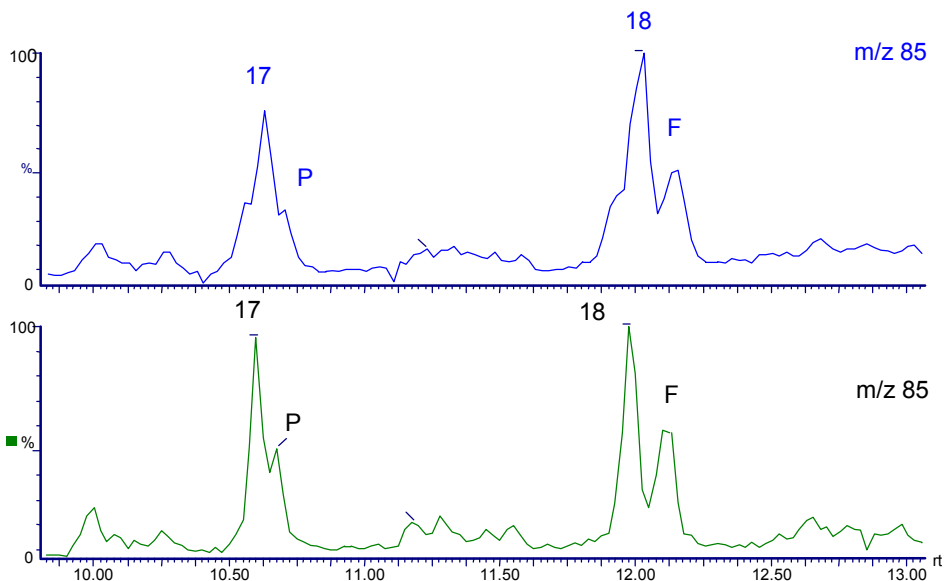


Figura 5.3.2 Pics del pristà (P) i del fità (F) a les mostres dels cultius obtinguts a partir de tapet microbià de salines i substrat dimetilsulfur. 17 : heptadecà; 18 : octadecà. En ambdós cultius la relació pristà /fità és inferior a 1, d'acord amb l'ambient reductor del medi.

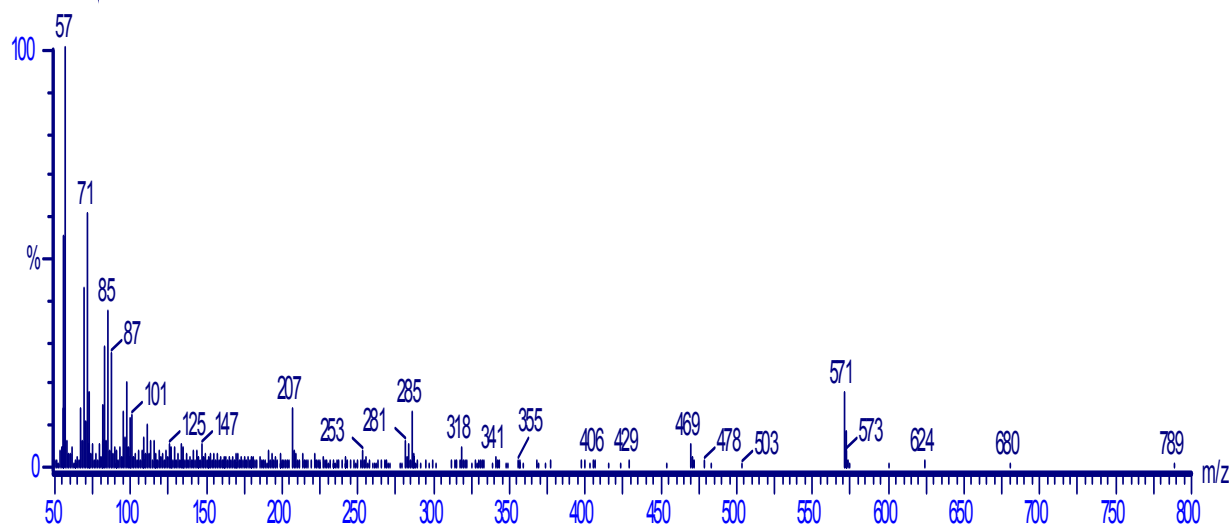


Figura 5.3.3. Espectre de masses d'un compost identificat com a dioctadecildisulfur corresponent a l'últim pic dels fragmentogrames dels alcans (**figura 5.3.1.**) a les mostres de cultius obtinguts a partir de tapet microbià de salines amb substrat dimetilsulfur.

5.3.1.2. Àcids carboxílics

Els àcids carboxílics saturats en aquestes mostres s'han establert amb el fragmentograma corresponent als àcids siliats, formats en la derivatització de les mostres. En els espectres destaquen el pic M-15, degut a la pèrdua d'un metil del grup trimetilsilil, el pic m/z 117 (COOSiMe_3), juntament amb el pic m/z 132 de transposició de McLafferty, el m/z 145 del trencament en γ del carbonil, i els pics m/z 73 i 75, propis dels trimetilsililoxiderivats (de las Heras, 1991).

Els resultats es mostren a la **figura 5.3.4** on pot observar-se un clar predomini dels àcids de cadena curta des de C_9 a C_{23} , els dos compostos més abundants d'aquest grup són l'àcid hexadecanoic i l'octadecanoic, l'espectre de masses del qual pot veure's a la **figura 5.3.5**.

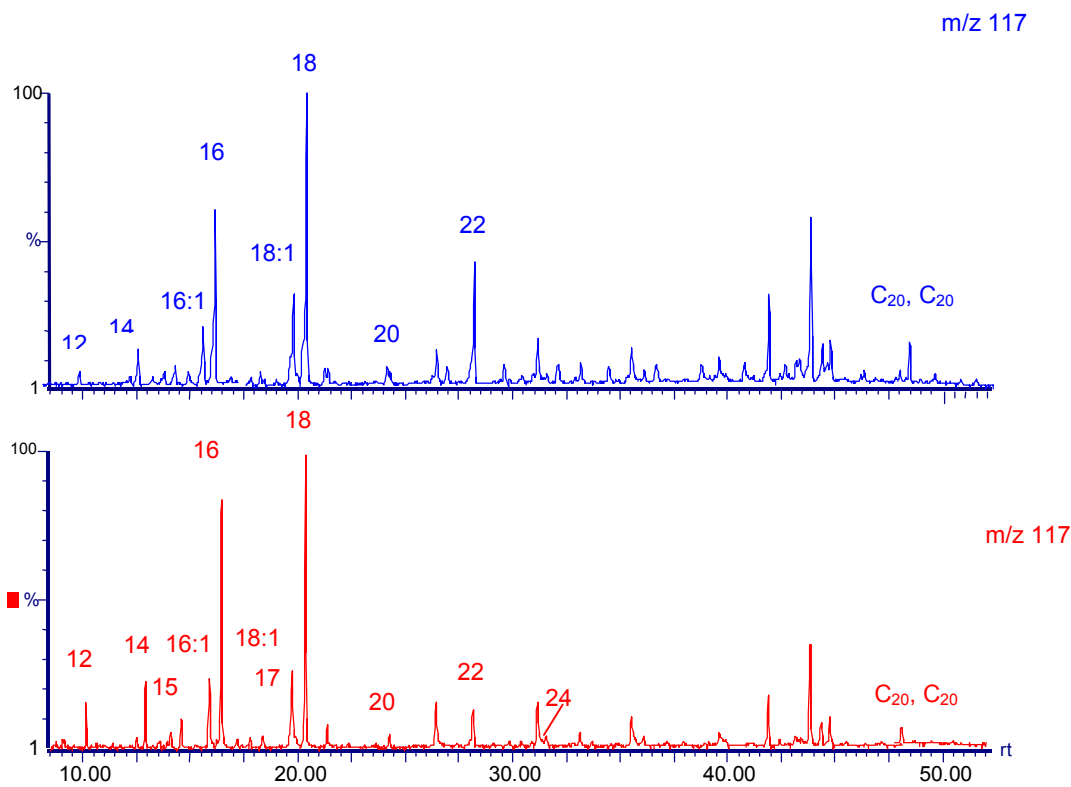


Figura 5.3.4 Fragmentograma de masses (m/z 117) dels trimetilsililoxiderivats dels àcids carboxílics lineals en cultius obtinguts a partir de tapet microbià de salines, amb substrat dimetilsulfur. Els nombres indiquen els número d'àtoms de carboni del compost. C₂₀, C₂₀ = difitanilgliceroldièter. 16:1 hexadecenoic; 18:1 octadecenoic.

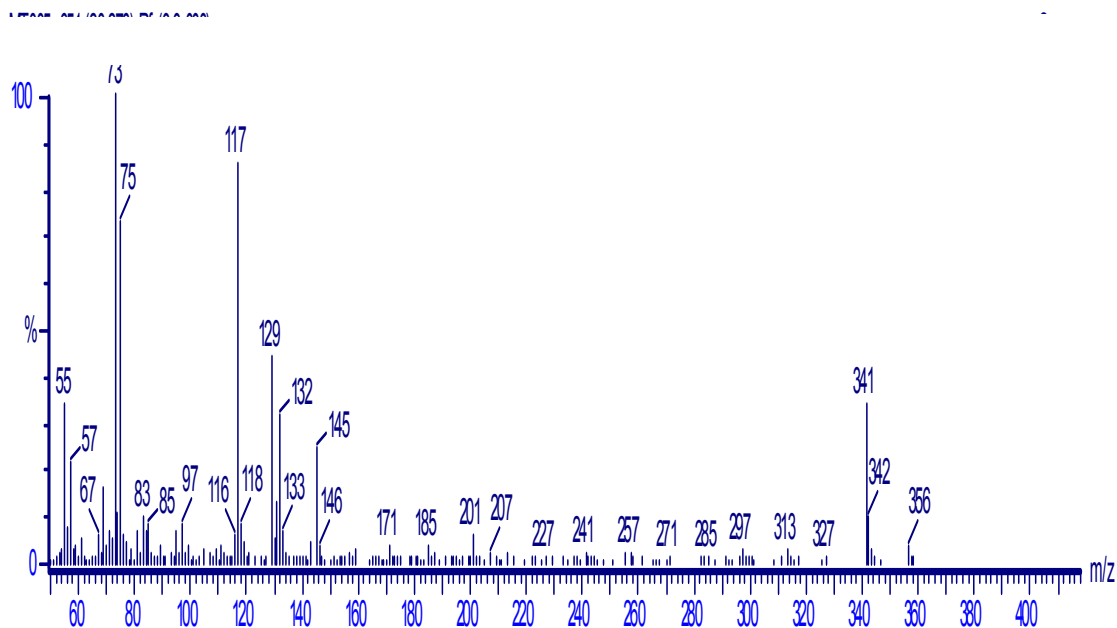


Figura 5.3.5. Espectre de masses del trimetilsililester de l'àcid octadecanoic, compost majoritari entre els àcids als cultius amb substrat dimetilsulfur inoculats a partir de tapet microbià de salines.

5.3.1.3. Èters isoprenoides

El difitanilgliceroldièter ha estat identificat en aquests cultius, a partir del cromatograma de masses $m/z = 426$, com es mostra a les **figures 5.3.6 i 5.3.7**. Pels dos cultius es detecta una major quantitat de difitanilglicerolèter en les anàlisis efectuades en columna capil·lar d'alta temperatura i en

una de les mostres les anàlisis amb columna capil·lar estàndard no detecten la presència d'aquest compost de manera significativa.

La monitorització del fragmentograma de m/z 412 (**figura 5.3.8**) també s'ha mostrat efectiva en aquestes mostres per a la detecció del fitanilglicerolmonoèter, el difitanilgliceroldièter i el fitanilsesterpanilgliceroldièter; en la identificació dels seus espectres de masses, estudis anteriors (Teixidor, 1996) conclouen que per a la identificació dels dièters isoprenoides és significatiu el fragment m/z 130 ($\text{CH}_2\text{CHCH}_2\text{OSiMe}_3$), tot i que és el pic base en els espectres d'altres grups com els 1-alkuil-2-acilmetilsililglicerol i alguns cetoalcanols (Cabrera, 1999), i el fragment m/z 133 ($\text{OCHCH}_2\text{OSiMe}_3 + \text{H}$). En el present treball s'han utilitzat ambdós fragments com a suport de la identificació.

A la **figura 5.3.9** es mostra l'espectre de masses del difitanilgliceroldièter, on destaquen els pics m/z 426, 412 i 369 (detallats a la **taula 5.2**), i el fragment m/z 130, corresponent a $\text{CH}_2\text{CHCH}_2\text{OSi}(\text{CH}_3)_3$.

A la **figura 5.3.10** Es mostra l'espectre de masses del 3-O-fitanilglicerolmonoèter $\text{C}_{20}, \text{C}_0$. En ell destaquen els fragments: m/z 501 ($\text{M}^+ - \text{CH}_3$); m/z 426 ($\text{M}^+ - \text{OSi}(\text{CH}_3)_3 - \text{H}$); m/z 205 ($\text{CH}_2\text{OSiMe}_3)_2 - \text{H}$; m/z 147 ($\text{CH}_2\text{CH}(\text{O})\text{CH}_2\text{OSi}(\text{CH}_3)_3$); i m/z 130 ($\text{CH}_2\text{CHCH}_2\text{OSi}(\text{CH}_3)_3$). El fitanilglicerolmonoèter ha estat proposat com a precursor per a la biosíntesi de difitanilglicerolèters arqueobacterians (de Rosa i Gambacorta, 1986).

A la **figura 5.3.11**. es mostren els fragmentogrames de masses de fragments representatius del 3-fitanil-2-sesterpanilgliceroldièter ($\text{C}_{25}, \text{C}_{20}$), l'espectre del qual es mostra a la **figura 5.3.12** en el que s'aprecien els pics m/z 496 i 482, característics de l'èter isoprenoide C_{25} i els m/z 369 i 412 que denoten el corresponent èter isoprenoide C_{20} (**taula 5.2**). Així mateix s'observen els fragments m/z 779 ($\text{M}^+ - \text{CH}_3$), 351 ($\text{C}_{25}\text{H}_{51}$), 454 ($\text{CH}_2\text{OSiMeCH}_2\text{OC}_{25}\text{H}_{51}$) 381 ($\text{CH}_2\text{OC}_{25}\text{H}_{51} + \text{H}$) i 470 ($\text{CH}_2\text{OC}_{25}\text{H}_{51} + \text{OSiMe}_3$) i 133 ($\text{OCHCH}_2\text{OSi}(\text{CH}_3)_3 + \text{H}$). Cal esmentar que aquest compost s'ha trobat en concentracions molt baixes i en coelució amb una silicona, que explica els fragments m/z 207 i 281.

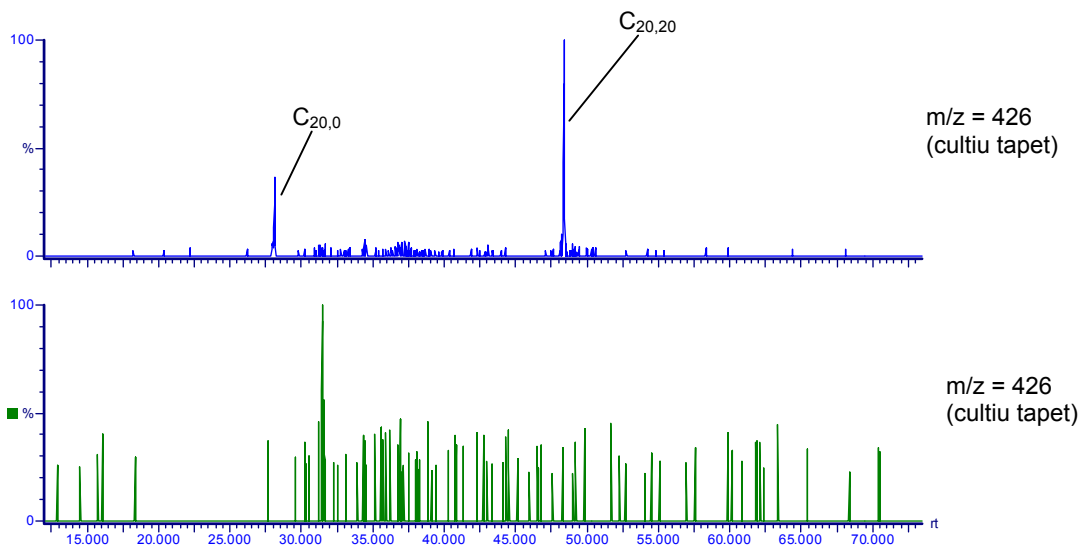


Figura 5.3.6. Cromatograma de masses $m/z = 426$ de dos cultius inoculats a partir de tapet microbià de salines i substrat dimetilsulfur, analitzats amb columna capil.lar estàndard.

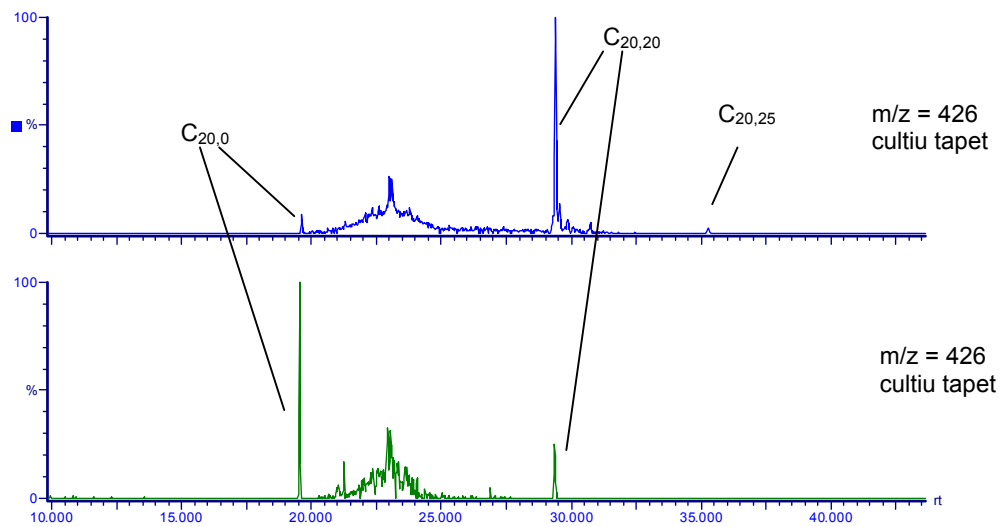


Figura 5.3.7. Cromatograma de masses $m/z = 426$ dels dos mateixos cultius que a la figura anterior 5.3.6. inoculats a partir de tapet microbià de salines i substrat dimetilsulfur, analitzats amb columna capil.lar d'alta temperatura.

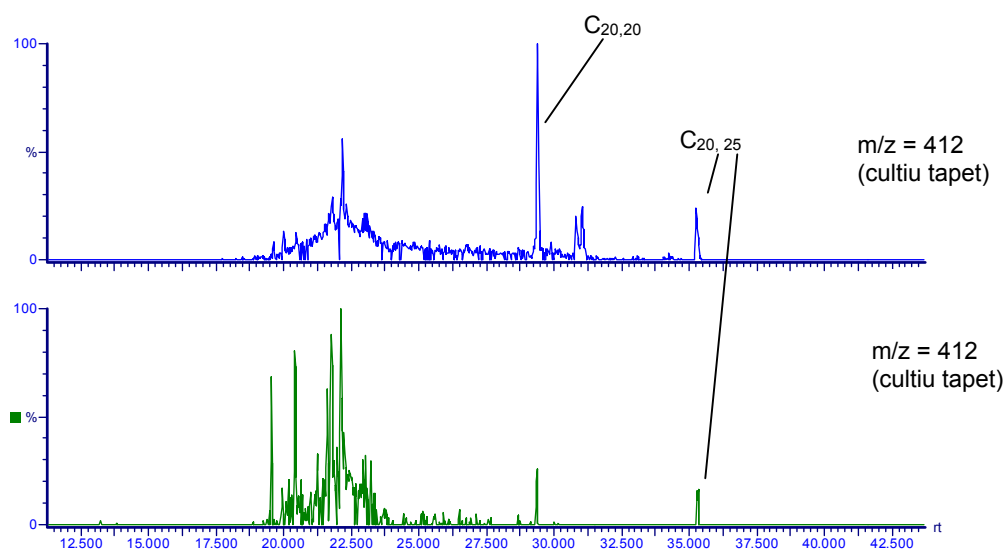
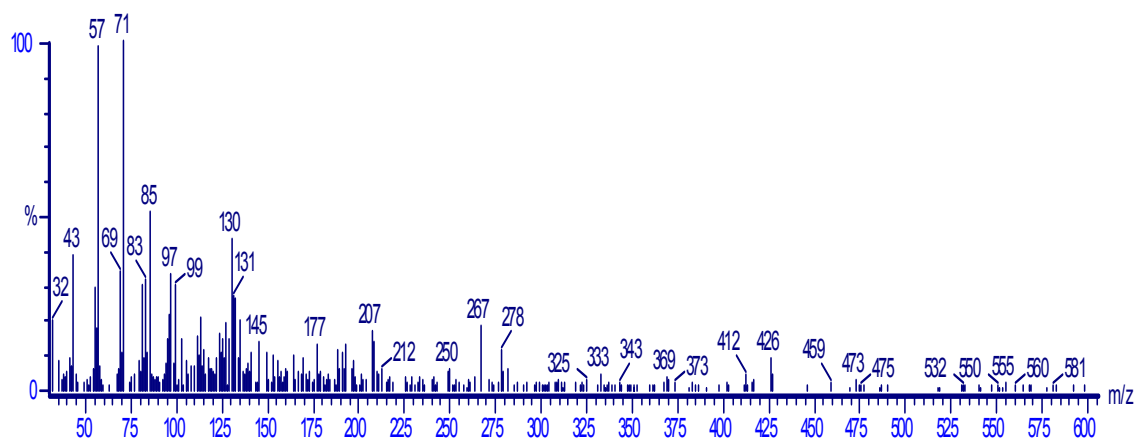


Figura 5.3.8. Fragmentograma de masses $m/z = 412$ de cultius inoculats a partir de tapet microbià de salines i substrat dimetilsulfur, analitzat amb columna capil.lar d'alta temperatura.



Espectre de masses del difitanilgliceroldièter (C_{20}, C_{20}) identificat en cultius inoculats a partir de tapet microbià de salines amb substrat dimetilsulfur.

F
igur
a
5.3.
9.
Esp

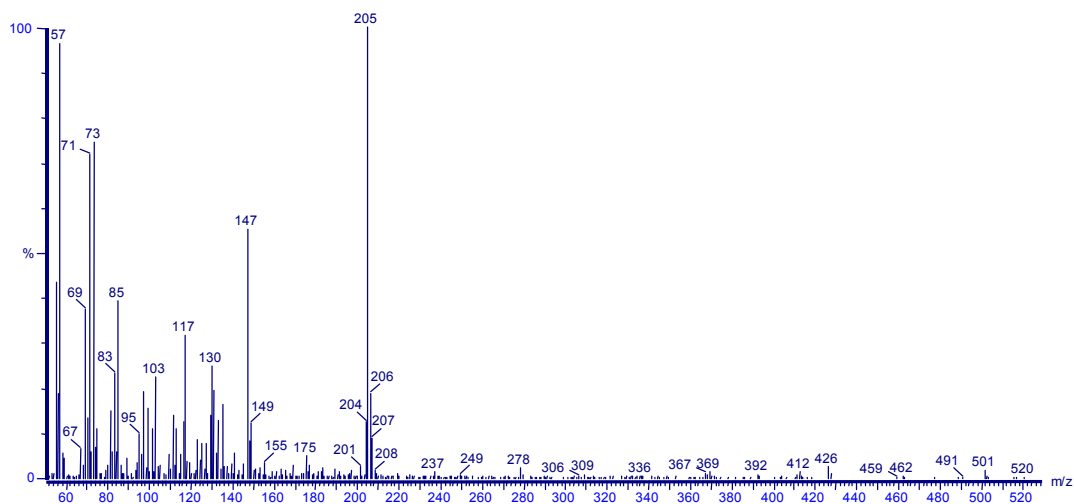


Figura 5.3.10. Espectre de masses del fitanilglicerolmonoèter (C_{20}, C_0) identificat en un cultiu inoculat a partir de tapet microbià de salines i substrat dimetilsulfur.

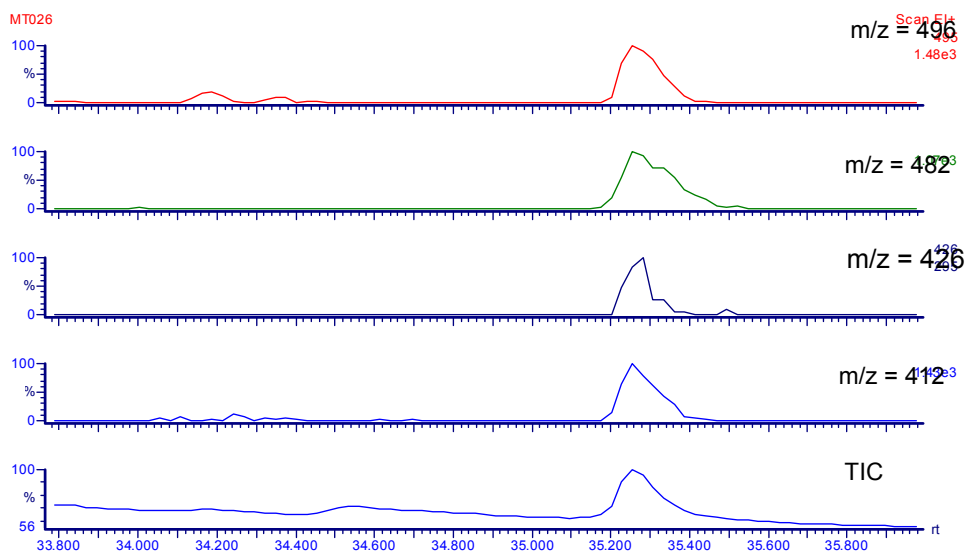


Figura 5.3.11. Fragmentogrames de masses d'un cultiu inoculat a partir de tapet microbià de salines que mostra un pic en els fragments característics del fitanilsesterpanilgliceroldièter (C_{25} , C_{20}).

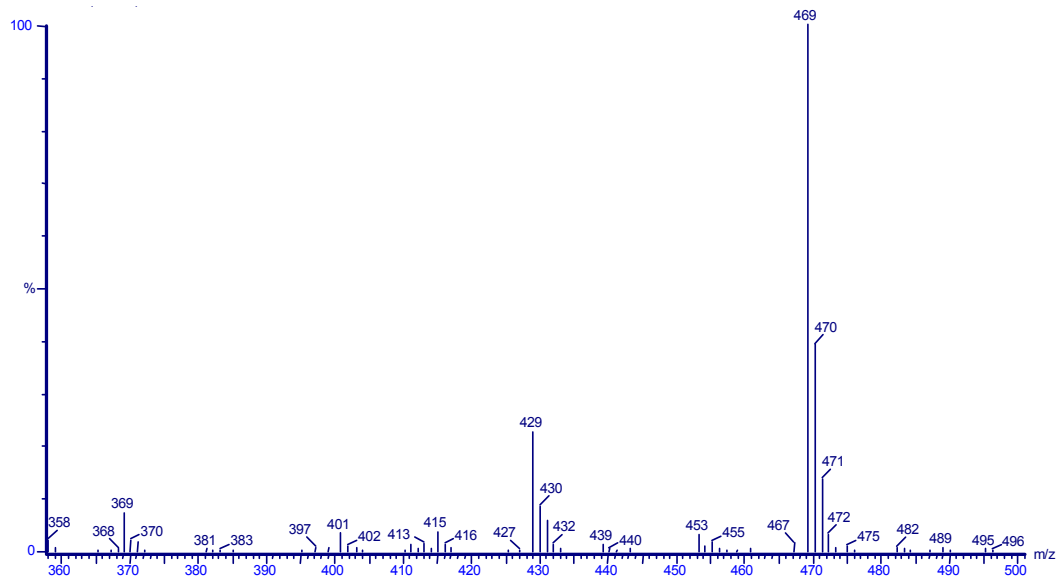
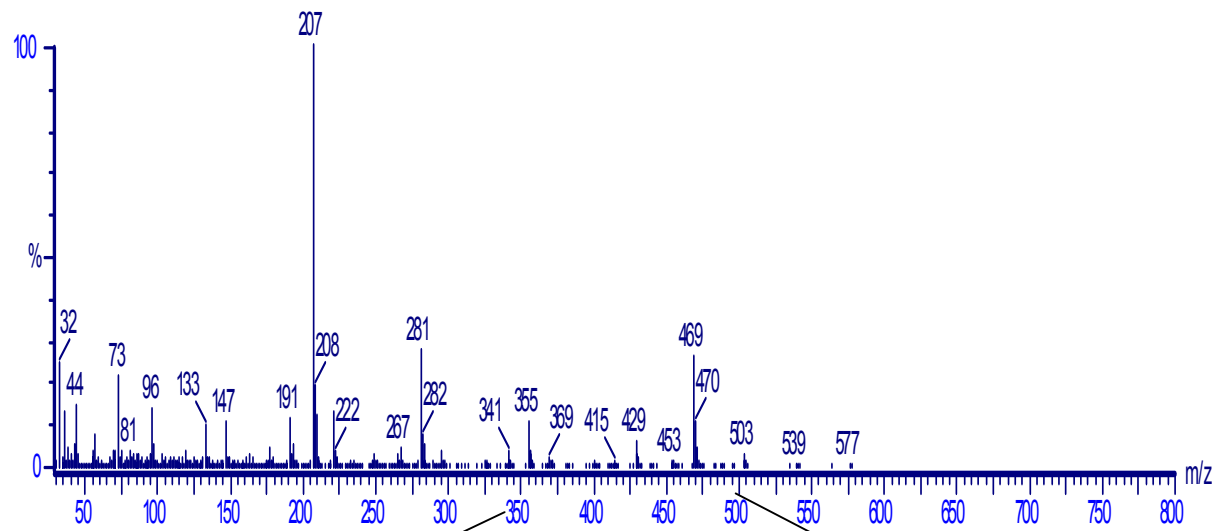


Figura 5.3.12. (a) Espectre de masses del fitanilsesterpanilgliceroldièter(C₂₅,C₂₀) identificat en cultius inoculats a partir de tapet microbià de salines amb substrat dimetilsulfur. (b) Ampliació del mateix.

5.3.2. Cultius inoculats amb fang de digestor anaerobi de depuradora

5.3.2.1. Alcans lineals

5.3.2.1.1. Cultius que utilitzen acetat com a substrat

A la figura 5.3.13 es mostren els fragmentogrames corresponents als alcans lineals ($m/z = 85$) on pot veure's que en aquests cultius es troben n-alcans de C_{20} a C_{36} àtoms de carboni.

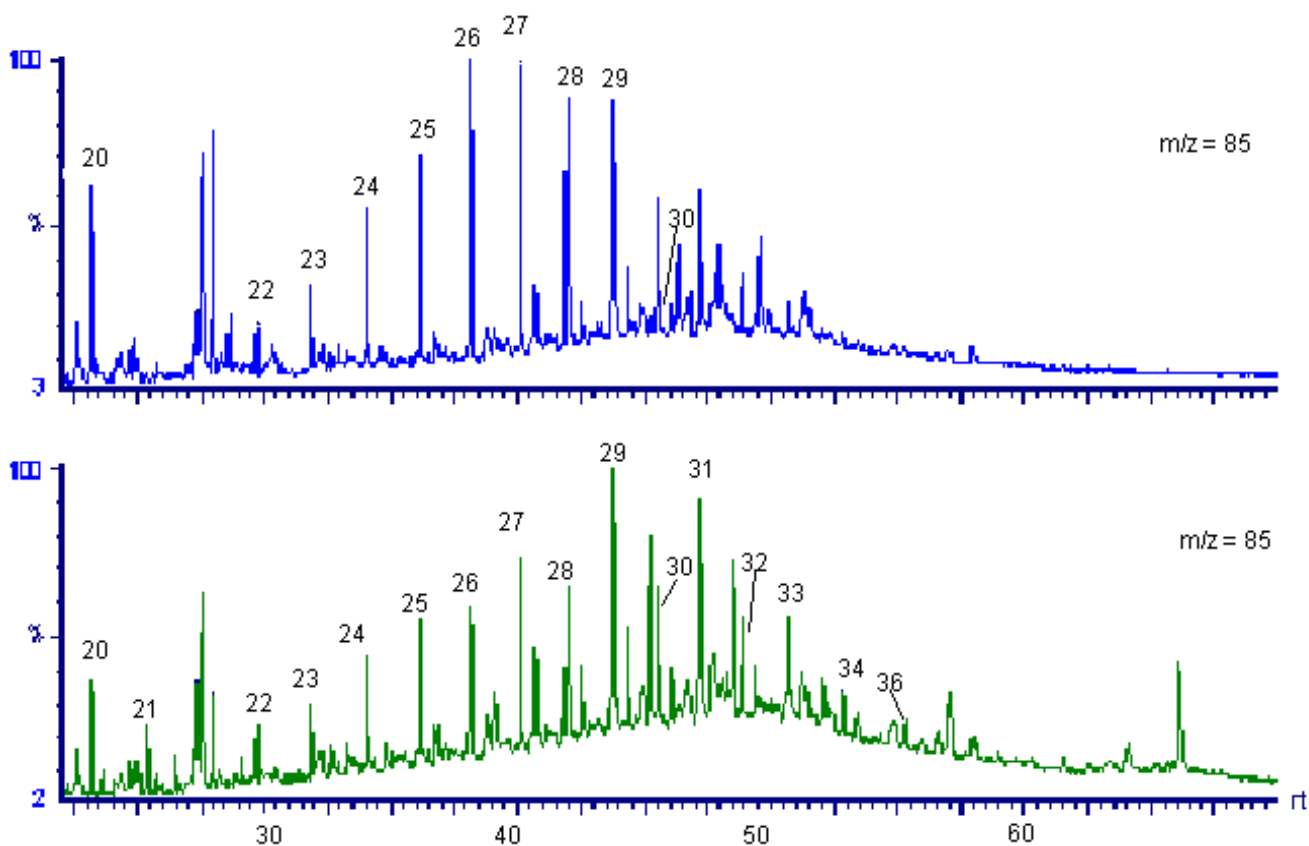


Figura 5.3.13. Fragmentograma de masses dels alcans ($m/z = 85$) de cultius inoculats amb fang de depuradora i substrat acetat.

5.3.2.1.2. Cultius que han crescut amb substrat dimetilsulfur

El perfil d'alcans de les mostres de cultius que han crescut utilitzant dimetilsulfur com a substrat mostra una distribució contínua que va de C₁₉ a C₃₂, el fragmentograma corresponent (m/z 85) pot veure's a la **figura 5.3.14**.

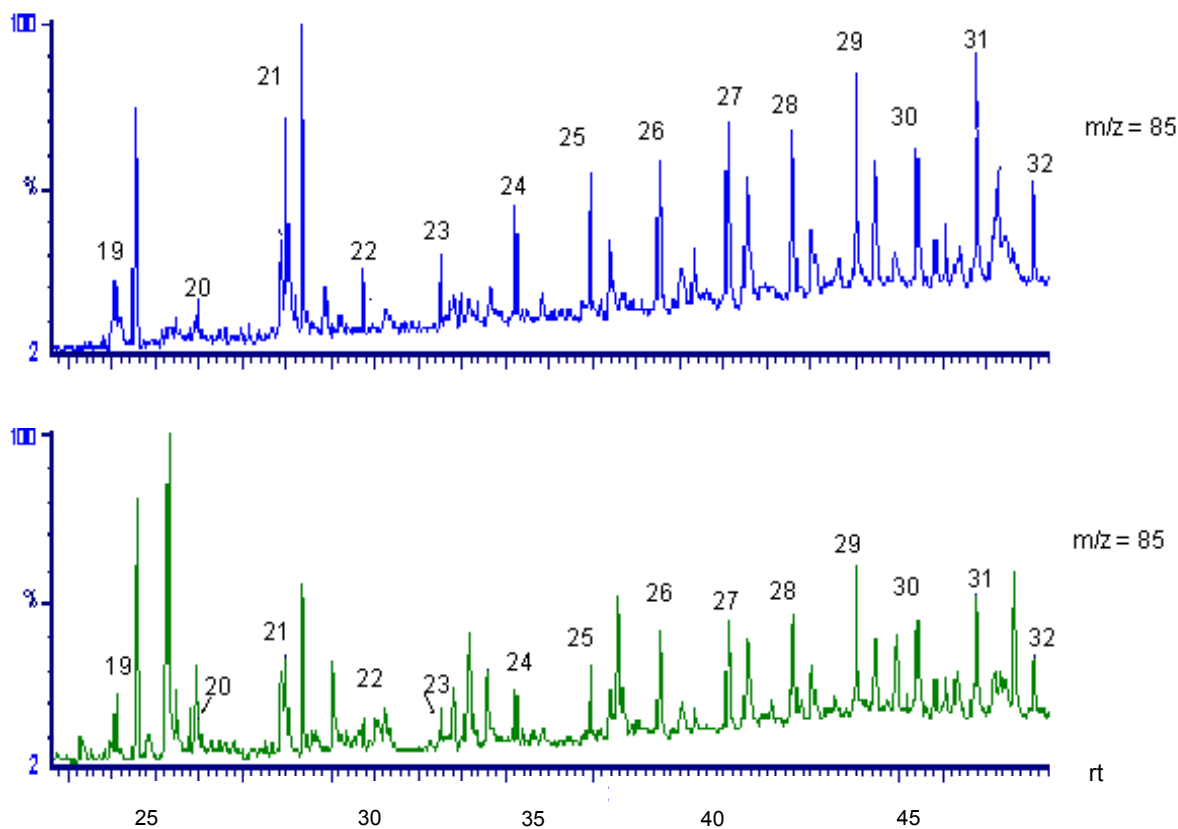


Figura 5.3.14. Fragmentograma de masses dels alkanes lineals (m/z = 85) de les mostres de cultius cres

cuts en dimetilsulfur. Els hidrocarburs alifàtics lineals s'indiquen amb un nombre n que és el nombre d'àtoms de carboni de l'alcà.

5.3.2.2. Àcids carboxílics

5.3.2.2.1. Cultius amb substrat acetat

El perfil d'àcids, establert a partir del fragmentograma de metilèsters (m/z 74) (**figura 5.3.15**), dona una distribució d'àcids lineals monocarboxílics que va de C₁₄ a C₃₄. En ella s'observa un clar predomini dels àcids carboxílics amb un nombre parell d'àtoms de carboni, destacant sobre la resta els àcids de 16 i 18 carbonis. També s'observen els derivats iso i anteiso C₁₅ i C₁₇.

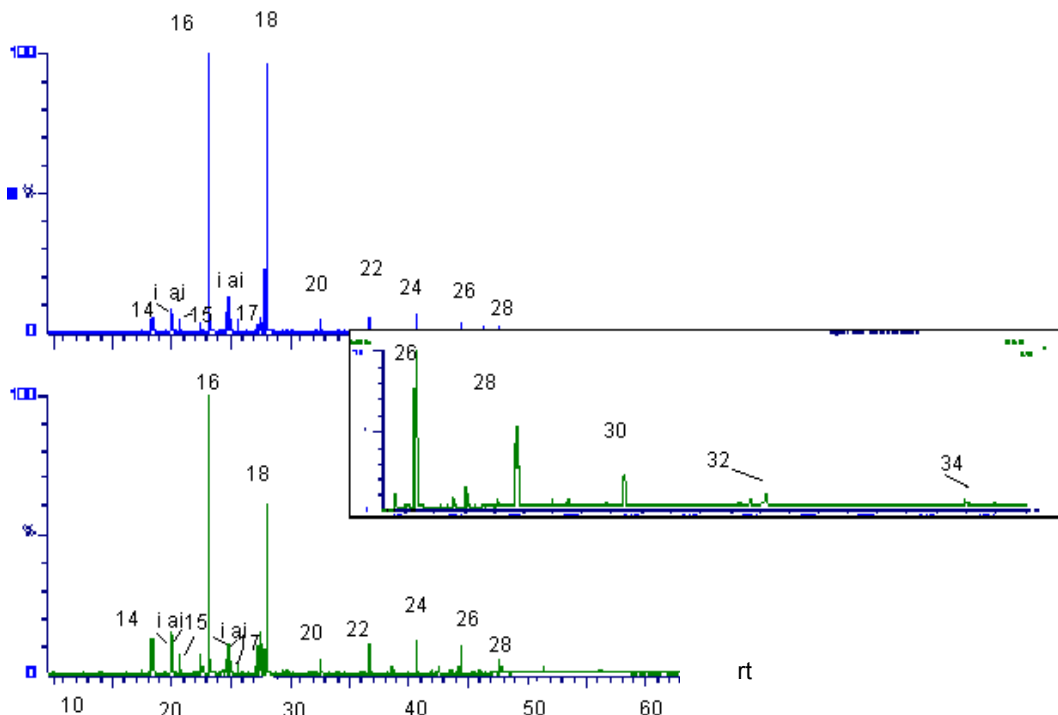


Figura 5.3.15: Fragmentograma de masses dels esters metílics dels àcids carboxílics (m/z 74) de les mostres extremes a partir dels cultius crescut

s amb acetat utilitzant com a inòcul fang de depuradora; n indica el nombre d'àtoms de carboni.

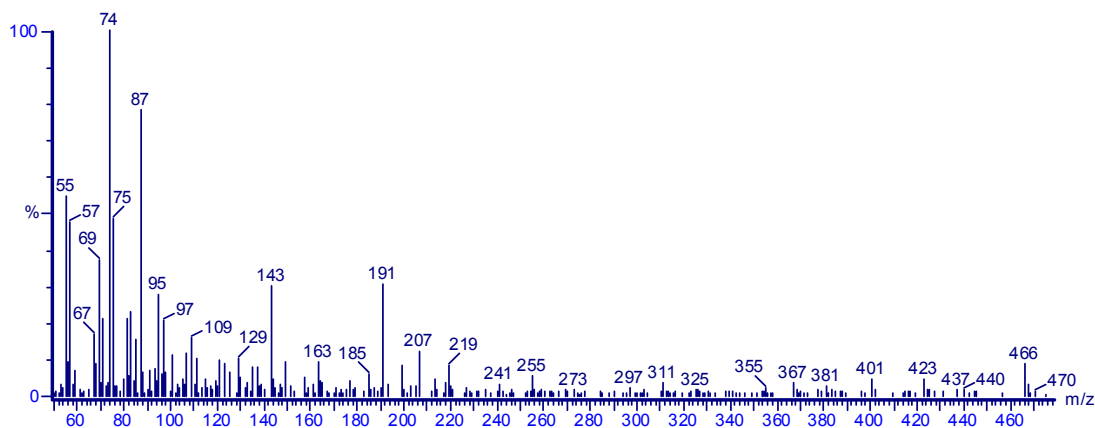


Figura 5.3.16. Espectre de masses de l'ester metílic de l'àcid triacontanoic identificat als cultius inoculats amb fang de

digestor anaerobi que han crescut amb acetat.

5.3.2.2.2. Cultius amb substrat dimetilsulfur

En els cultius que han crescut en dimetilsulfur utilitzant com a inòcul fang de depuradora s'han trobat àcids carboxílics que van de C_{14} a C_{32} . En el fragmentograma de masses dels esters metílics corresponents (m/z 74), a la **figura 5.3.17** s'observa una distribució unimodal amb predomini dels àcids amb nombre parell d'àtoms de carboni; els àcids de 16 i 18 àtoms de carboni destaquen per la seva abundància sobre la resta.

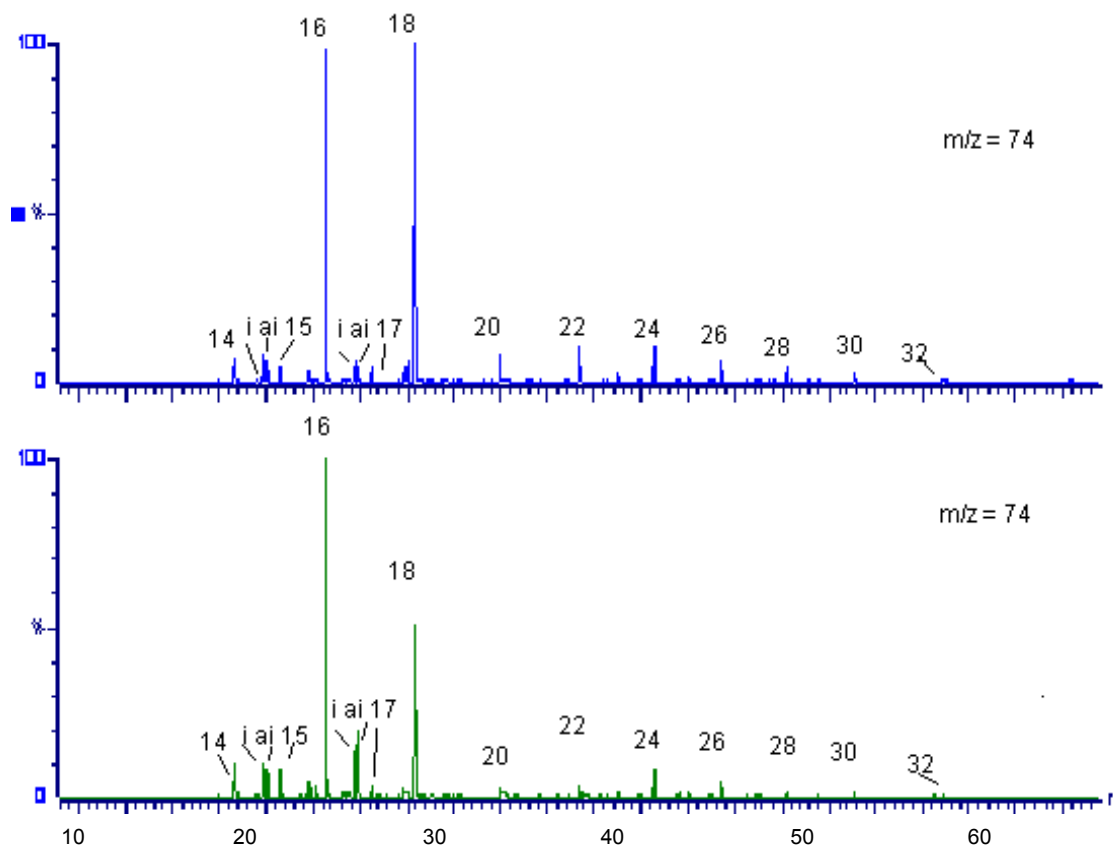


Figura 5.3.17. Fragmentograma de masses dels ésters metílics (m/z 74) corresponents a mostres de dos cultius inoculats a partir de fang de depuradora, amb dimetilsulfur com a font de carboni. Els nombres indiquen els àtoms de carboni de l'àcid.

5.3.2.3. Èters isoprenoides

A totes les mostres analitzades de cultius inoculats amb fang de depuradora s'han detectat només petites quantitats de difitanilglicerolèter, no detectant-se altres glicerolèters isoprenoides, el que mostra que la concentració d'arqueobacteris és molt petita, o que aquests èters coelueixen amb altres productes del fang, ja que tots aquests cultius (capítols 3 i 4) han produït metà.

5.3.3. Fang de digestor anaerobi de depuradora

En aquest apartat s'estudien les famílies de compostos que són presents en el fang a partir del qual s'ha fet l'inòcul dels cultius corresponents presentats en aquest estudi. En ell es detallen els resultats obtinguts per als n-alcans, els alcans isoprenoides i els glicerolèters trobats en el fang,

5.3.3.1. Alcans lineals

A la **figura 5.3.18** es mostra el cromatograma de masses m/z 85 del fang de depuradora, que no mostra pics diferenciats per aquests compostos, sino una coelució de molts compostos diferents deguts a la complexa composició del propi fang.

5.3.3.2. Àcids carboxílics

En el fang s'han identificat àcids carboxílics lineals des de C_{14} a C_{30} àtoms de carboni, amb un clar predomini dels àcids de nombre parell d'àtoms de carboni, entre els que destaquen l'hexadecanoic i l'octadecanoic (**figura 5.3.19**)

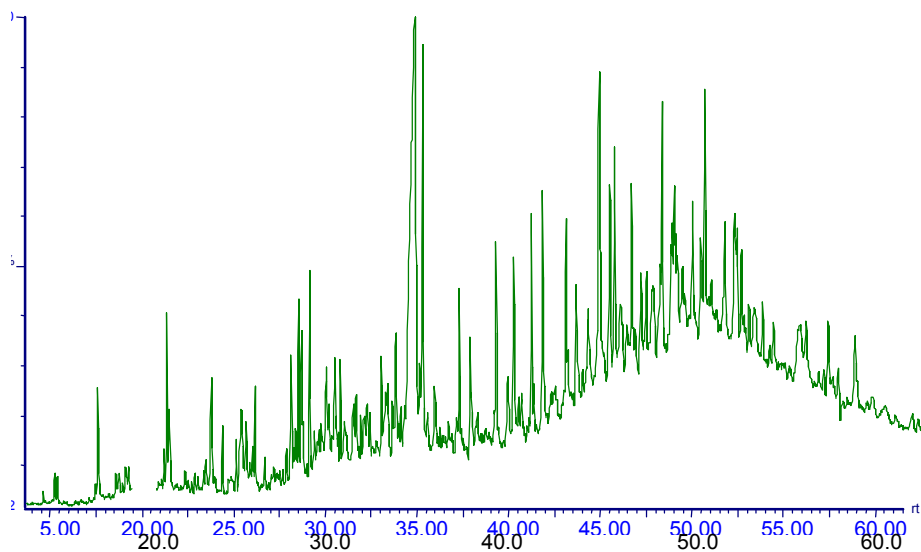


Figura 5.3.18. Fragmentograma de masses dels alcans ($m/z85$) del fang de depuradora a partir del qual s'han inoculat cultius descrits a la present memòria.

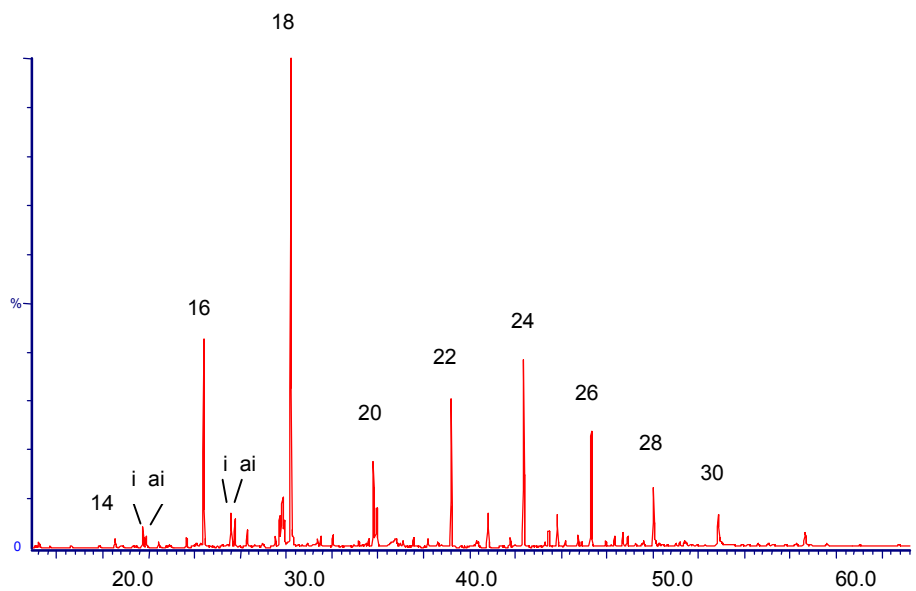


Figura 5.3.19. Fragmentograma de masses dels àcids lineals trobats al fang de depuradora a partir del qual s'han fet els cultius descrits en la present memòria

5.3.3.3. Èters isoprenoides

Les anàlisis dels èters isoprenoides del fang de depuradora han revelat presència de difitanilglicerolèter (**figura 5.3.20**)

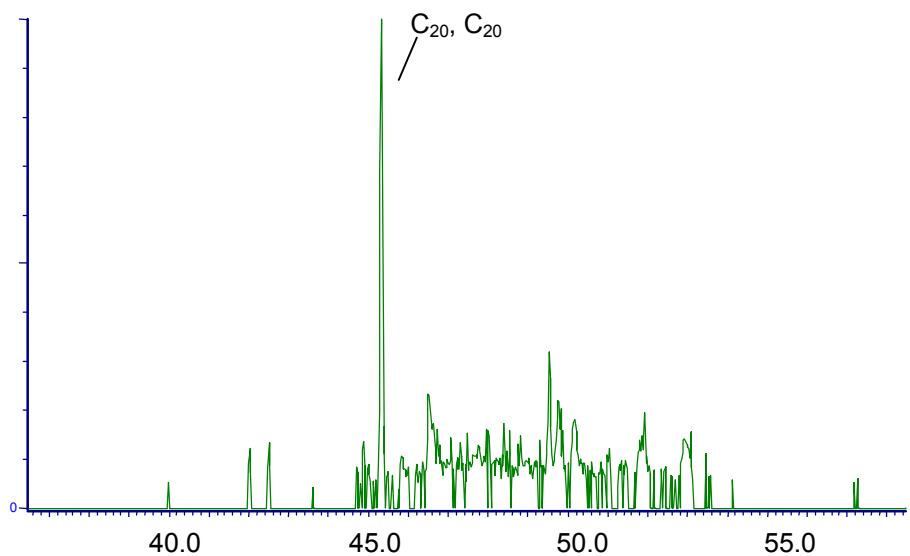


Figura 5.3.20. Fragmentograma de masses $m/z = 426$ per al fang de depuradora on destaca el pic del bis-O-fitaniilglicerol.

5.4. Discussió

A partir dels resultats obtinguts s'observa que les **diferències entre els perfils** dels compostos estudiats – n-alcans, àcids grassos i èters isoprenoides- es donen sobretot **en funció de l'inòcul** i no del substrat. Així els **cultius inoculats amb fang de depuradora** tenen **perfils molt semblants** entre sí independentment del substrat (acetat, dimetilsulfur, 1-hexadecè i n-hexadecantiol), però les distribucions **són diferents pels cultius inoculats amb tapet microbià de salines** (substrat dimetilsulfur). Aquest fet és degut que aquests cultius d'enriquiment presenten una **concentració encara baixa en bacteris metanògens**, i per tant, les diferències observades no són atribuïbles a ells, amb excepció dels èters isoprenoides, que tenen origen exclusivament arqueobacterià.

La **distribució d'alcans lineals** trobada en els cultius d'enriquiment a partir de tapet microbià de salines consta dels n-alcans que van de C_{16} a C_{24} sense predomini parell-senar. Les mostres que es presenten en aquest treball corresponen a subcultius, els cultius inicials foren inoculats per M.Vila (1993) amb tapet mostrejat a 2 cm de fondària (més detalls al capítol 3). En un treball previ, P. Teixidor (1996) va caracteritzar els lípids del tapís de *Phormidium valderianum* a partir del qual es va obtenir l'inòcul inicial. En el tapís hi ha predomini d'alcans de cadena llarga de més de 20 àtoms de carboni, per tant pot considerar-se que la distribució que es troba en els cultius és deguda al creixement bacterià.

En els cultius inoculats amb fang de depuradora en canvi, s'han trobat alcans de cadena més llarga, de C_{20} a C_{36} àtoms. L'origen dels alcans de cadena llarga s'atribueix a plantes superiors, en un ambient terrestre, les restes de les quals poden trobar-se en el fang de depuradora utilitzat per a l'inòcul, o bé d'origen petrogènic, degut a aportacions antropogèniques.

El **perfil d'àcids carboxílics** també presenta àcids de cadena més curta en els cultius inoculats a partir de tapet microbià (de C₉ a C₂₃) que en els cultius inoculats a partir de fang (de C₁₄ a C₃₄). Per altra banda cal destacar que a totes les mostres estudiades hi ha un clar predomini parell i en concret dels àcids carboxílics lineals saturats de 16 i 18 àtoms de carboni. Aquests resultats concorden amb estudis previs amb fang de digestor anaerobi en condicions metanogèniques (Schmidt i Ahring, 1994) i en cultius purs de bacteris metanògens (Pugh i Kates, 1994) on també s'obtingueren aquests àcids carboxílics predominants.

Pel que fa als **èters isoprenoides**, s'ha estudiat la seva detecció en columna capil.lar de temperatura estàndard i d'alta temperatura, segons procediments descrits anteriorment per Teixidor (1996). En tots els cultius s'ha detectat el **bis-O-fitanyllicerol** (C₂₀C₂₀), que és l'anomenat lípid "universal" dels arqueobacteris i és l'únic que s'ha identificat en tots els cultius inoculats a partir de fang de digestor anaerobi depuradora i també en el mateix fang. Cal remarcar que el pic del fragmentograma m/z = 426, que detecta aquest compost, és més prominent en les mostres analitzades amb CG-EM utilitzant columna capil.lar d'alta temperatura que en les analitzades a temperatura estàndard, fet que concorda amb els treballs d'aquesta autora.

En els cultius inoculats a partir de **tapet microbià** de salines, a més a més del bis-O-fitanyllicerol s'ha identificat el **fitanyllicerolmonoèter** (C₂₀,C₀), que ha estat descrit com a precursor per a la biosíntesi de difitanyllicerolèters arqueobacterians (de Rosa i Gambacorta, 1986). També s'hi han trobat traces d'**O-fitanyl-O-sesterpanillicerol** (C₂₅,C₂₀). Probablement s'han trobat més èters isoprenoides en aquests cultius que en els inoculats a partir de fang degut a què en aquests darrers la varietat i concentració de compostos en l'inòcul era major, fet que provoca que la seva separació sigui més difícil i es doni una coelució major que dificulta la identificació.

5.5. Conclusions

1. S'observen diferències en la distribució dels lípids estudiats (alcans lineals, àcids grassos i èters isoprenoides) entre els cultius inoculats a partir de fang de digestor anaeròbic de depuradora i els inoculats a partir de tapet microbià de salines, fins i tot en el cas de tenir el mateix substrat.
2. El perfil d'alcans detectat en els cultius d'enriquiment a partir de tapet microbià de salines va de C₁₆ a C₂₄ àtoms de carboni, sense predomini parell-senar. Aquests resultats poden atribuir-se al creixement bacterià perquè són diferents als obtinguts en l'estudi de lípids del mateix tapet de *Phormidium valderianum* a la mateixa profunditat (2 cm) de la que es va obtenir l'inòcul, ja que en aquest cas hi havia predomini d'alcans de cadena més llarga (Teixidor, 1996).
3. El perfil d'àcids grassos en els cultius d'enriquiment a partir de tapet microbià de salines va de C₉ a C₂₃, amb predomini parell, i amb una abundància sobre la resta dels àcids hexadecanoic i octadecanoic. Aquests resultats concorden amb estudis en cultius purs de bacteris metanògens (Pugh *et al*, 1994) on també s'obtingué que aquests eren els àcids carboxílics predominants. En aquest cas també es dona diferència amb el tapís (Teixidor, 1996) on els àcids més abundants són l'n-hexadecanoic i n-ocadec-11-enoic.
4. Als cultius inoculats amb tapís microbià de salines s'han identificat el bis-O-fitanylglicerol, l'O-fitanylglicerolmonoèter i traces d'O-fitanyl-O-sesterpanilgliceroldièter. Aquests tres compostos tenen origen arqueobacterià, els dos últims no han estat descrits en el tapís, ni en anàlisis del primer cultiu d'enriquiment (Teixidor, 1996).

5. Els perfils d'alcans no difereixen significativament entre els cultius inoculats a partir de fang de depuradora amb els substrats acetat, dimetilsulfur, 1-hexadecè i n-hexadecantiol. Els mateixos alcans han estat també identificats en el fang que actua, ell mateix, com un consorci metanogènic.

6. Els perfils d'àcids carboxílics no difereixen entre els cultius inoculats a partir del fang de digestor anaerobi amb substrats acetat i dimetilsulfur i el propi fang.

7. Ha estat identificat el bis-O-fitaniilglicerolèter al fang i a tots els cultius inoculats a partir del mateix fang de digestor anaerobi de depuradora.