



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

ANÁLISIS DE LOS ESTERES METÍLICOS DE LOS
ÁCIDOS GRASOS CELULARES DE SEIS ESPECIES
DE LA FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE POR
CROMATOGRAFÍA GAS-LÍQUIDO

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)
P R E S E N T A
M. en C. VÍCTOR MANUEL RIVERA AGUILAR

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F. 1991





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

	Página
INTRODUCCION.....	1
OBJETIVOS.....	9
MÉTODOS.....	10
RESULTADOS.....	15
DISCUSION.....	39
CONCLUSIONES.....	44
BIBLIOGRAFIA.....	45
APENDICE.....	51

INTRODUCCION

La presente tesis, forma parte del Provento de Conservacion y Mejoramiento del Ambiente, que se desarrolló en la Unidad de Investigacion de la ENRS, Itzamal, a partir de 1988 en el área de bacteriología ambiental, con el apoyo de CONACYT y en convenio con el Instituto de Investigaciones del Agua en Praga (Checoslovaquia, bajo la asesoría del Doctor Hausler y el Doctor Richter, especialistas a nivel mundial de este tema.

El objetivo de la investigación es analizar en un inicio, los ácidos grasos saturados de 14 especies de la familia Enterobacteriaceae, para acumular un banco de datos que permita la identificación de especies de esta familia con base en el perfil lipídico de cada bacteria. En esta tesis se trabaja con 6 especies, como un medio para la instrumentación de la técnica en nuestro laboratorio, para iniciar la construcción del banco de datos.

Actualmente se trabaja con el género *Liebstella* y 5 de sus especies. En el futuro se continuará con otros generos hasta cubrir a familia enterobacterias, en la información del banco de datos, su propósito a la identificación de enterobacterias en aguas y aguas de drenaje que es el tipo de muestras problema que se caracterizan en el Provento de Conservación y Mejoramiento del Ambiente.

IDENTIFICACION TAXONOMICA EN BACTERIAS

La identificación y clasificación de los microorganismos es uno de los problemas más complejos de la microbiología moderna, que requiere además la suma total de nuestros hallazgos acerca de los microbios. Es así que el estándar de identificación es un "reflejo del nivel que han alcanzado los mismos métodos de identificación" (1) y a los que recientemente se les ha puesto un énfasis especial, pues además de dar en cuenta las propiedades de los microorganismos en relación a su morfología, cultivo y fisiología, también se han establecido pruebas bioquímicas que año con año han llegado a ser más complejas. En la actualidad, para la identificación precisa, el número de pruebas desde ya de cincuenta y deben complementarse por aplicaciones serológicas, fagocitativas y algunas otras pruebas de determinación tales como el contenido de agua en el ADN, grado de hidratación, electrolitos de proteínas y lípidos en la microestructura celular (2).

Sin embargo, el problema de la dificultad de penetración que los actuales métodos de identificación de bacterias, aún en una no son totalmente satisfactorias, además, poseen limitaciones, un tanto extensas que en muchas ocasiones no es precedida por falta de tiempo y tecnología, así no es utilizada completamente. Estas deficiencias fueron eliminadas por métodos de taxonomía numérica que ayudan a realizar el trabajo por medio de métodos convencionales para tener sus propios, aunque la información de cada unidad taxonómica se ha incrementado considerablemente ya que las tablas diagnósticas originales se han enriquecido por la

frecuencia de aparición de cepas en cada taxón. Se han utilizado y casi se han hecho clásicas las matrices de Bascom (19) o la de Farmer III et al. (26), para el manejo de la información.

Se evidencia con lo anterior que los métodos convencionales permiten una diferenciación muy satisfactoria de los distintos taxones, así como de las categorías intraespecificas. Sin embargo, estos métodos no solo representan una aguda labor, sino también consumen mucho tiempo y son poco prácticos, especialmente en la clínica, donde no son recomendable debido al tiempo que transcurre entre el momento de la obtención de resultados.

Aunque en años recientes se ha hecho un esfuerzo para acelerar y simplificar la identificación de los microorganismos, en los métodos por micropruebas, tales como el sistema de identificación comercial de bacterias API, que permite una automatización parcial de los procesos y la aplicación de métodos por computadora, la identificación aún permanece muy complicada pues está siempre basada en el tipo principal y la explotación de las propiedades bioquímicas de los microorganismos (41).

Por esta razón varios autores han tratado de eliminar la laboriosidad y desventajas de los procedimientos convencionales y tratan de encontrar una solución al reemplazarlos por un método simple que provea, al menos, la misma cantidad de información. Estos autores trataron de llevar la identificación hacia otro principio y buscar características o rasgos principalmente en la composición química de los microorganismos, por lo que centraron su atención en sustancias que están presentes en varios microorganismos en la escala más amplia posible. Estos intentos se pudieron establecer debido al desarrollo de métodos químicos de análisis de separación, nuevos y avanzados, especialmente por cromatografía líquida y de gas, espectrometría de masas, electroforesis y espectrometría en el intervalo del infrarrojo (42), el desarrollo de la instrumentación y automatización del proceso analítico, hace una perfecta separación de los posibles componentes de la muestra. La aplicación práctica de estos métodos en el campo de la taxonomía, se denomina química taxonómica en la literatura reciente (43, 47). La ventaja de lo que sucede en la mayoría de pruebas bioquímicas, cuyos resultados pueden ser expresados con signo positivo o negativo, la química taxonómica no solo sirve para la determinación de cualitativos, sino también de cantidades, lo que significa que el ámbito de información obtenida por un simple análisis es considerablemente mayor, cinco pruebas bioquímicas con respuesta positiva o negativa pueden dar al menos 32 combinaciones, mientras que cinco componentes determinados por cromatografía de gases, alcanzan 10 diferentes valores y poseen 1024 combinaciones. Por esta razón podemos hablar acerca de los métodos basados en química taxonómica, no solo como métodos rápidos, sino fundamentalmente, cuando ciertos resultados pueden ser numéricamente procesados (48).

El objeto de interés de los métodos químicos taxonómicos en muchos casos no solo la célula completa, sino también las diferentes estructuras celulares, endocitomas, exocitomas, productos metabólicos que son liberados en el medio de cultivo o bien productos volátiles o gaseosos, que nos dan información de las características del organismo en estudio (49). Sin embargo, la

mayor cantidad de información puede obtenerse por análisis de la masa celular, por un lado los lípidos y azúcares y por otro compuestos presentes en menor proporción como son los ácidos nucleicos. Las macromoléculas formadas por estos compuestos pueden ser típicas para un organismo tanto en representación cualitativa y cuantitativa como en su secuencia (199).

El análisis puede también enfocarse directamente a la presencia o composición de las moléculas de alto peso molecular en la célula o en las sustancias de bajo peso molecular producidas por hidrólisis de material celular. Las sustancias de alto peso molecular se determinan comúnmente por medio de cromatografía líquida y electrophoresis.

De principal importancia para la práctica microbiológica son en primer lugar los polímeros de los lípidos, el análisis del estado presente de los lípidos muestra que esencialmente la determinación de diferentes componentes lipídicos es principalmente de los ácidos grasos, porque son hasta ahora el método más promisorio para la determinación taxonómica de los microorganismos (50).

Los lípidos en los organismos juegan un papel de componentes estructurales de las partes celulares, membranas celulares, centros de energía y propagadores de energía. En cuanto al aspecto taxonómico los componentes lipídicos más importantes son los ácidos grasos. Estos se clasifican usualmente como no ramificados, saturados, insaturados e hidroxiácidos con un grupo dihidroxipropiónico.

La mayoría de los autores que abordan el problema de la determinación de los ácidos grasos, incorporados a las células de los microorganismos, consideran la posibilidad de identificar las marcas diferenciales de estos por este método, como un criterio principal de identificación para distinguir dos o más taxones, fácilmente diferenciables, en un cierto grupo de microorganismos.

Por otro lado, algunos investigadores consideran que la atención debe dirigirse a la determinación de ácidos orgánicos incorporados en la biomasa de los microorganismos, como la fuente de información exclusiva y definitiva, para la identificación y la verificación principal de la biomasa discriminada en tiempo (20) del proceso completo de identificación taxonómica.

Es cierto que los métodos propuestos, requieren instrumentos especiales y de una inversión económica inicial fuerte, pero por otro lado es menos el trabajo en cuanto a la preparación del material de estudio y medios de cultivo necesarios, en comparación con los métodos convencionales de identificación.

Los resultados que se han obtenido hasta la fecha, han llevado a considerar las ventajas del método de identificación descrito, comparado con la técnica convencional y hasta ahora comúnmente utilizado, es decir el cultivo y las pruebas bioquímicas. Otra ventaja del primero es la reducción a un mínimo de errores del personal y en el caso de contar con un equipo de laboratorio óptimo, llegar hasta a la completa automatización de consideramos

el principio del proceso mismo. llegaremos a la conclusion que "de facto" este es un esfuerzo para caracterizar a un cierto organismo por la gran posibilidad de comparar informacion. En el proceso convencional toda informacion requiere un procedimiento por separado. Para tal proceso, es tipico que la cantidad de informacion obtenida, sea directamente dependiente del numero de pruebas realizadas. Esto naturalmente incrementa la complejidad del proceso completo de identificacion (17, 22).

Por otro lado, la identificacion taxonomica, con la ayuda de la determinacion cromatografica de los esterios metilicos de los acidos organicos celulares, hace posible ganar, en una sola operacion, practicamente el mismo tipo de informacion, bajo condiciones objetivas y sin ningun trabajo extra. Aunado a esto, los resultados pueden obtenerse en corto tiempo, lo que es de excepcional importancia para analisis de muestras practicas (17).

El principio del metodo propuesto que consiste en la extraccion y analisis de los acidos grasos celulares de las enterobacterias por cromatografia gascosa, esta basado en el hecho de que esta categoria taxonomica, esta caracterizada por la presencia y relacion mutua de los acidos grasos, metilicos principalmente en los microorganismos. Estos acidos grasos metilicos, por cromatografia de gases, son esterios metilicos, despus de la hidrogenacion y esterificacion de los mismos. Los resultados obtenidos por cromatografia son una imagen caracteristica que es similar a una huella digital en quimica, que corresponde a un cierto microorganismo y no es intercambiable, segun esto, debido a la reproducibilidad de los datos obtenidos, bajo condiciones constantes, el conocimiento exacto de la composicion quimica de los acidos organicos respectivos, o sus esterios, es importante (26).

Todas las celulas bacterianas tienen una composicion quimica muy similar, el componente principal en cada caso es el agua que representa aproximadamente el 70% de la masa celular (20, 21, 27) (74). Los componentes fundamentales en las celulas, son el carbono, hidrogeno, nitrogeno, fosphoro y azufre. Otros elementos incluyen al calcio, cloro, manganeso, magnesio, potasio, sodio y zinc. La defecion de componentes unicos y la medicion de la proporcion relativa de sustancias comunes, se usa cada vez mas como una herramienta en la identificacion y clasificacion de bacterias y otros microorganismos como amibas, hongos y algas (15, 24, 27, 28).

LIPIDOS EN BACTERIAS

Los lipidos son insolubles en agua y solubles en solventes organicos se han subdividido arbitrariamente en saponificables y no saponificables. Los primeros son generalmente glicerol y esterios carbonilicos, los cuales son rapidamente hidrolizados. Los lipidos no saponificables no se hidrolizan y generalmente no son esterios. Los saponificables se subdividen en lipidos simples (grasas y cereas) y lipidos complejos (fosfolipidos, lipopolisacaridos y lipoproteinas) (75). Los lipidos, salvo pocas excepciones, no forman polimeros y no se clasifican exactamente como macromoleculas. Las grasas son quimicamente,

glicerol y esterés de ácidos grasos (42).

En los procariontes hay dos tipos de lípidos: Las Eubacterias poseen acyl lípidos (uniones éster) y las Archeobacterias poseen uniones éter. Los lípidos se encuentran en las membranas citoplasmáticas en las Eubacterias y en la pared celular a nivel de las capas complejas de las Gram negativas y de ciertas Gram positivas. En la última década, los lípidos de diferentes clases en Eubacterias han presentado un potencial en Quimiotaxonomía (20) (21) (22).

Los lípidos y sus ácidos grasos celulares se encuentran en todos los microorganismos, excepto en cierto tipo de virus, este tipo de compuestos bioquímicos, presentes en bacterias, han sido estudiados por cromatografía de dos líquidos, más que cualquier otro tipo de componentes bioquímicos (31) (32) (33) (34). En la actualidad no existe un método universalmente aceptado para la extracción de lípidos de la célula bacteriana, como consecuencia el número de técnicas usadas en muy grande (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34) (35) (36) (37) (38) (39) (40) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) (49) (50) (51) (52) (53) (54) (55) (56) (57) (58) (59) (60) (61) (62) (63) (64) (65) (66) (67) (68) (69) (70) (71) (72) (73) (74) (75) (76) (77) (78) (79) (80) (81) (82) (83) (84) (85) (86) (87) (88) (89) (90) (91) (92) (93) (94) (95) (96) (97) (98) (99) (100) (101) (102) (103) (104) (105) (106) (107) (108) (109) (110) (111) (112) (113) (114) (115) (116) (117) (118) (119) (120) (121) (122) (123) (124) (125) (126) (127) (128) (129) (130) (131) (132) (133) (134) (135) (136) (137) (138) (139) (140) (141) (142) (143) (144) (145) (146) (147) (148) (149) (150) (151) (152) (153) (154) (155) (156) (157) (158) (159) (160) (161) (162) (163) (164) (165) (166) (167) (168) (169) (170) (171) (172) (173) (174) (175) (176) (177) (178) (179) (180) (181) (182) (183) (184) (185) (186) (187) (188) (189) (190) (191) (192) (193) (194) (195) (196) (197) (198) (199) (200) (201) (202) (203) (204) (205) (206) (207) (208) (209) (210) (211) (212) (213) (214) (215) (216) (217) (218) (219) (220) (221) (222) (223) (224) (225) (226) (227) (228) (229) (230) (231) (232) (233) (234) (235) (236) (237) (238) (239) (240) (241) (242) (243) (244) (245) (246) (247) (248) (249) (250) (251) (252) (253) (254) (255) (256) (257) (258) (259) (260) (261) (262) (263) (264) (265) (266) (267) (268) (269) (270) (271) (272) (273) (274) (275) (276) (277) (278) (279) (280) (281) (282) (283) (284) (285) (286) (287) (288) (289) (290) (291) (292) (293) (294) (295) (296) (297) (298) (299) (300) (301) (302) (303) (304) (305) (306) (307) (308) (309) (310) (311) (312) (313) (314) (315) (316) (317) (318) (319) (320) (321) (322) (323) (324) (325) (326) (327) (328) (329) (330) (331) (332) (333) (334) (335) (336) (337) (338) (339) (340) (341) (342) (343) (344) (345) (346) (347) (348) (349) (350) (351) (352) (353) (354) (355) (356) (357) (358) (359) (360) (361) (362) (363) (364) (365) (366) (367) (368) (369) (370) (371) (372) (373) (374) (375) (376) (377) (378) (379) (380) (381) (382) (383) (384) (385) (386) (387) (388) (389) (390) (391) (392) (393) (394) (395) (396) (397) (398) (399) (400) (401) (402) (403) (404) (405) (406) (407) (408) (409) (410) (411) (412) (413) (414) (415) (416) (417) (418) (419) (420) (421) (422) (423) (424) (425) (426) (427) (428) (429) (430) (431) (432) (433) (434) (435) (436) (437) (438) (439) (440) (441) (442) (443) (444) (445) (446) (447) (448) (449) (450) (451) (452) (453) (454) (455) (456) (457) (458) (459) (460) (461) (462) (463) (464) (465) (466) (467) (468) (469) (470) (471) (472) (473) (474) (475) (476) (477) (478) (479) (480) (481) (482) (483) (484) (485) (486) (487) (488) (489) (490) (491) (492) (493) (494) (495) (496) (497) (498) (499) (500) (501) (502) (503) (504) (505) (506) (507) (508) (509) (510) (511) (512) (513) (514) (515) (516) (517) (518) (519) (520) (521) (522) (523) (524) (525) (526) (527) (528) (529) (530) (531) (532) (533) (534) (535) (536) (537) (538) (539) (540) (541) (542) (543) (544) (545) (546) (547) (548) (549) (550) (551) (552) (553) (554) (555) (556) (557) (558) (559) (560) (561) (562) (563) (564) (565) (566) (567) (568) (569) (570) (571) (572) (573) (574) (575) (576) (577) (578) (579) (580) (581) (582) (583) (584) (585) (586) (587) (588) (589) (590) (591) (592) (593) (594) (595) (596) (597) (598) (599) (600) (601) (602) (603) (604) (605) (606) (607) (608) (609) (610) (611) (612) (613) (614) (615) (616) (617) (618) (619) (620) (621) (622) (623) (624) (625) (626) (627) (628) (629) (630) (631) (632) (633) (634) (635) (636) (637) (638) (639) (640) (641) (642) (643) (644) (645) (646) (647) (648) (649) (650) (651) (652) (653) (654) (655) (656) (657) (658) (659) (660) (661) (662) (663) (664) (665) (666) (667) (668) (669) (670) (671) (672) (673) (674) (675) (676) (677) (678) (679) (680) (681) (682) (683) (684) (685) (686) (687) (688) (689) (690) (691) (692) (693) (694) (695) (696) (697) (698) (699) (700) (701) (702) (703) (704) (705) (706) (707) (708) (709) (710) (711) (712) (713) (714) (715) (716) (717) (718) (719) (720) (721) (722) (723) (724) (725) (726) (727) (728) (729) (730) (731) (732) (733) (734) (735) (736) (737) (738) (739) (740) (741) (742) (743) (744) (745) (746) (747) (748) (749) (750) (751) (752) (753) (754) (755) (756) (757) (758) (759) (760) (761) (762) (763) (764) (765) (766) (767) (768) (769) (770) (771) (772) (773) (774) (775) (776) (777) (778) (779) (780) (781) (782) (783) (784) (785) (786) (787) (788) (789) (790) (791) (792) (793) (794) (795) (796) (797) (798) (799) (800) (801) (802) (803) (804) (805) (806) (807) (808) (809) (810) (811) (812) (813) (814) (815) (816) (817) (818) (819) (820) (821) (822) (823) (824) (825) (826) (827) (828) (829) (830) (831) (832) (833) (834) (835) (836) (837) (838) (839) (840) (841) (842) (843) (844) (845) (846) (847) (848) (849) (850) (851) (852) (853) (854) (855) (856) (857) (858) (859) (860) (861) (862) (863) (864) (865) (866) (867) (868) (869) (870) (871) (872) (873) (874) (875) (876) (877) (878) (879) (880) (881) (882) (883) (884) (885) (886) (887) (888) (889) (890) (891) (892) (893) (894) (895) (896) (897) (898) (899) (900) (901) (902) (903) (904) (905) (906) (907) (908) (909) (910) (911) (912) (913) (914) (915) (916) (917) (918) (919) (920) (921) (922) (923) (924) (925) (926) (927) (928) (929) (930) (931) (932) (933) (934) (935) (936) (937) (938) (939) (940) (941) (942) (943) (944) (945) (946) (947) (948) (949) (950) (951) (952) (953) (954) (955) (956) (957) (958) (959) (960) (961) (962) (963) (964) (965) (966) (967) (968) (969) (970) (971) (972) (973) (974) (975) (976) (977) (978) (979) (980) (981) (982) (983) (984) (985) (986) (987) (988) (989) (990) (991) (992) (993) (994) (995) (996) (997) (998) (999) (1000) (1001) (1002) (1003) (1004) (1005) (1006) (1007) (1008) (1009) (1010) (1011) (1012) (1013) (1014) (1015) (1016) (1017) (1018) (1019) (1020) (1021) (1022) (1023) (1024) (1025) (1026) (1027) (1028) (1029) (1030) (1031) (1032) (1033) (1034) (1035) (1036) (1037) (1038) (1039) (1040) (1041) (1042) (1043) (1044) (1045) (1046) (1047) (1048) (1049) (1050) (1051) (1052) (1053) (1054) (1055) (1056) (1057) (1058) (1059) (1060) (1061) (1062) (1063) (1064) (1065) (1066) (1067) (1068) (1069) (1070) (1071) (1072) (1073) (1074) (1075) (1076) (1077) (1078) (1079) (1080) (1081) (1082) (1083) (1084) (1085) (1086) (1087) (1088) (1089) (1090) (1091) (1092) (1093) (1094) (1095) (1096) (1097) (1098) (1099) (1100) (1101) (1102) (1103) (1104) (1105) (1106) (1107) (1108) (1109) (1110) (1111) (1112) (1113) (1114) (1115) (1116) (1117) (1118) (1119) (1120) (1121) (1122) (1123) (1124) (1125) (1126) (1127) (1128) (1129) (1130) (1131) (1132) (1133) (1134) (1135) (1136) (1137) (1138) (1139) (1140) (1141) (1142) (1143) (1144) (1145) (1146) (1147) (1148) (1149) (1150) (1151) (1152) (1153) (1154) (1155) (1156) (1157) (1158) (1159) (1160) (1161) (1162) (1163) (1164) (1165) (1166) (1167) (1168) (1169) (1170) (1171) (1172) (1173) (1174) (1175) (1176) (1177) (1178) (1179) (1180) (1181) (1182) (1183) (1184) (1185) (1186) (1187) (1188) (1189) (1190) (1191) (1192) (1193) (1194) (1195) (1196) (1197) (1198) (1199) (1200) (1201) (1202) (1203) (1204) (1205) (1206) (1207) (1208) (1209) (1210) (1211) (1212) (1213) (1214) (1215) (1216) (1217) (1218) (1219) (1220) (1221) (1222) (1223) (1224) (1225) (1226) (1227) (1228) (1229) (1230) (1231) (1232) (1233) (1234) (1235) (1236) (1237) (1238) (1239) (1240) (1241) (1242) (1243) (1244) (1245) (1246) (1247) (1248) (1249) (1250) (1251) (1252) (1253) (1254) (1255) (1256) (1257) (1258) (1259) (1260) (1261) (1262) (1263) (1264) (1265) (1266) (1267) (1268) (1269) (1270) (1271) (1272) (1273) (1274) (1275) (1276) (1277) (1278) (1279) (1280) (1281) (1282) (1283) (1284) (1285) (1286) (1287) (1288) (1289) (1290) (1291) (1292) (1293) (1294) (1295) (1296) (1297) (1298) (1299) (1300) (1301) (1302) (1303) (1304) (1305) (1306) (1307) (1308) (1309) (1310) (1311) (1312) (1313) (1314) (1315) (1316) (1317) (1318) (1319) (1320) (1321) (1322) (1323) (1324) (1325) (1326) (1327) (1328) (1329) (1330) (1331) (1332) (1333) (1334) (1335) (1336) (1337) (1338) (1339) (1340) (1341) (1342) (1343) (1344) (1345) (1346) (1347) (1348) (1349) (1350) (1351) (1352) (1353) (1354) (1355) (1356) (1357) (1358) (1359) (1360) (1361) (1362) (1363) (1364) (1365) (1366) (1367) (1368) (1369) (1370) (1371) (1372) (1373) (1374) (1375) (1376) (1377) (1378) (1379) (1380) (1381) (1382) (1383) (1384) (1385) (1386) (1387) (1388) (1389) (1390) (1391) (1392) (1393) (1394) (1395) (1396) (1397) (1398) (1399) (1400) (1401) (1402) (1403) (1404) (1405) (1406) (1407) (1408) (1409) (1410) (1411) (1412) (1413) (1414) (1415) (1416) (1417) (1418) (1419) (1420) (1421) (1422) (1423) (1424) (1425) (1426) (1427) (1428) (1429) (1430) (1431) (1432) (1433) (1434) (1435) (1436) (1437) (1438) (1439) (1440) (1441) (1442) (1443) (1444) (1445) (1446) (1447) (1448) (1449) (1450) (1451) (1452) (1453) (1454) (1455) (1456) (1457) (1458) (1459) (1460) (1461) (1462) (1463) (1464) (1465) (1466) (1467) (1468) (1469) (1470) (1471) (1472) (1473) (1474) (1475) (1476) (1477) (1478) (1479) (1480) (1481) (1482) (1483) (1484) (1485) (1486) (1487) (1488) (1489) (1490) (1491) (1492) (1493) (1494) (1495) (1496) (1497) (1498) (1499) (1500) (1501) (1502) (1503) (1504) (1505) (1506) (1507) (1508) (1509) (1510) (1511) (1512) (1513) (1514) (1515) (1516) (1517) (1518) (1519) (1520) (1521) (1522) (1523) (1524) (1525) (1526) (1527) (1528) (1529) (1530) (1531) (1532) (1533) (1534) (1535) (1536) (1537) (1538) (1539) (1540) (1541) (1542) (1543) (1544) (1545) (1546) (1547) (1548) (1549) (1550) (1551) (1552) (1553) (1554) (1555) (1556) (1557) (1558) (1559) (1560) (1561) (1562) (1563) (1564) (1565) (1566) (1567) (1568) (1569) (1570) (1571) (1572) (1573) (1574) (1575) (1576) (1577) (1578) (1579) (1580) (1581) (1582) (1583) (1584) (1585) (1586) (1587) (1588) (1589) (1590) (1591) (1592) (1593) (1594) (1595) (1596) (1597) (1598) (1599) (1600) (1601) (1602) (1603) (1604) (1605) (1606) (1607) (1608) (1609) (1610) (1611) (1612) (1613) (1614) (1615) (1616) (1617) (1618) (1619) (1620) (1621) (1622) (1623) (1624) (1625) (1626) (1627) (1628) (1629) (1630) (1631) (1632) (1633) (1634) (1635) (1636) (1637) (1638) (1639) (1640) (1641) (1642) (1643) (1644) (1645) (1646) (1647) (1648) (1649) (1650) (1651) (1652) (1653) (1654) (1655) (1656) (1657) (1658) (1659) (1660) (1661) (1662) (1663) (1664) (1665) (1666) (1667) (1668) (1669) (1670) (1671) (1672) (1673) (1674) (1675) (1676) (1677) (1678) (1679) (1680) (1681) (1682) (1683) (1684) (1685) (1686) (1687) (1688) (1689) (1690) (1691) (1692) (1693) (1694) (1695) (1696) (1697) (1698) (1699) (1700) (1701) (1702) (1703) (1704) (1705) (1706) (1707) (1708) (1709) (1710) (1711) (1712) (1713) (1714) (1715) (1716) (1717) (1718) (1719) (1720) (1721) (1722) (1723) (1724) (1725) (1726) (1727) (1728) (1729) (1730) (1731) (1732) (1733) (1734) (1735) (1736) (1737) (1738) (1739) (1740) (1741) (1742) (1743) (1744) (1745) (1746) (1747) (1748) (1749) (1750) (1751) (1752) (1753) (1754) (1755) (1756) (1757) (1758) (1759) (1760) (1761) (1762) (1763) (1764) (1765) (1766) (1767) (1768) (1769) (1770) (1771) (1772) (1773) (1774) (1775) (1776) (1777) (1778) (1779) (1780) (1781) (1782) (1783) (1784) (1785) (1786) (1787) (1788) (1789) (1790) (1791) (1792) (1793) (1794) (1795) (1796) (1797) (1798) (1799) (1800) (1801) (1802) (1803) (1804) (1805) (1806) (1807) (1808) (1809) (1810) (1811) (1812) (1813) (1814) (1815) (1816) (1817) (1818) (1819) (1820) (1821) (1822) (1823) (1824) (1825) (1826) (1827) (1828) (1829) (1830) (1831) (1832) (1833) (1834) (1835) (1836) (1837) (1838) (1839) (1840) (1841) (1842) (1843) (1844) (1845) (1846) (1847) (1848) (1849) (1850) (1851) (1852) (1853) (1854) (1855) (1856) (1857) (1858) (1859) (1860) (1861) (1862) (1863) (1864) (1865) (1866) (1867) (1868) (1869) (1870) (1871) (1872) (1873) (1874) (1875) (1876) (1877) (1878) (1879) (1880) (1881) (1882) (1883) (1884) (1885) (1886) (1887) (1888) (1889) (1890) (1891) (1892) (1893) (1894) (1895) (1896) (1897) (1898) (1899) (1900) (1901) (1902) (1903) (1904) (1905) (1906) (1907) (1908) (1909) (1910) (1911) (1912) (1913) (1914) (1915) (1916) (1917) (1918) (1919) (1920) (1921) (1922) (1923) (1924) (1925) (1926) (1927) (1928) (1929) (1930) (1931) (1932) (1933) (1934) (1935) (1936) (1937) (1938) (1939) (1940) (1941) (1942) (1943) (1944) (1945) (1946) (1947) (1948) (1949) (1950) (1951) (1952) (1953) (1954) (1955) (1956) (1957) (1958) (1959) (1960) (1961) (1962) (1963) (1964) (1965) (1966) (1967) (1968) (1969) (1970) (1971) (1972) (1973) (1974) (1975) (1976) (1977) (1978) (1979) (1980) (1981) (1982) (1983) (1984) (1985) (1986) (1987) (1988) (1989) (1990) (1991) (1992) (1993) (1994) (1995) (1996) (1997) (1998) (1999) (2000) (2001) (2002) (2003) (2004) (2005) (2006) (2007) (2008) (2009) (2010) (2011) (2012) (2013) (2014) (2015) (2016) (2017) (2018) (2019) (2020) (2021) (2022) (2023) (2024) (2025) (2026) (2027) (2028) (2029) (2030) (2031) (2032) (2033) (2034) (2035) (2036) (2037) (2038) (2039) (2040) (2041) (2042) (2043) (2044) (2045) (2046) (2047) (2048) (2049) (2050) (2051) (2052) (2053) (2054) (2055) (2056) (2057) (2058) (2059) (2060) (2061) (2062) (2063) (2064) (2065) (2066) (2067) (2068) (2069) (2070) (2071) (2072) (2073) (2074) (2075) (2076) (2077) (2078) (2079) (2080) (2081) (2082) (2083) (2084) (2085) (2086) (2087) (2088) (2089) (2090) (2091) (2092) (2093) (2094) (2095) (2096) (2097) (2098) (2099) (2100) (2101) (2102) (2103) (2104) (2105) (2106) (2107) (2108) (2109) (2110) (2111) (2112) (2113) (2114) (2115) (2116) (2117) (2118) (2119) (2120) (2121) (2122) (2123) (2124) (2125) (2126) (2127) (2128) (2129) (2130) (2131) (2132) (2133) (2134) (2135) (2136) (2137) (2138) (2139) (2140) (2141) (2142) (2143) (2144) (2145) (2146) (2147) (2148) (2149) (2150) (2151) (2152) (2153) (2154) (2155) (2156) (2157) (2158) (2159) (2160) (2161) (2162) (2163) (2164) (2165) (2166) (2167) (2168) (2169) (2170) (2171) (2172) (2173) (2174) (2175) (2176) (2177) (2178) (2179) (2180) (2181) (2182) (2183) (2184) (2185) (2186) (2187)

d) La composición de los ácidos grasos celulares es una característica muy estable genéticamente, la cual está altamente conservada. Los resultados de un análisis cromatográfico son muy similares a los que produce la homología del ADN. Las mutaciones simples, pérdida o ganancia de plásmidos, no alteran la composición de los ácidos grasos celulares (40, 419, 430, 441, 447, 469).

El primer análisis por cromatografía de gas licuado, para determinar ácidos grasos bacterianos, lo realizaron Janes y Martin en 1966 (42), al esterilizar un extracto de *Escherichia aerogenosa*. Mas tarde, la clasificación de bacterias por medio del análisis de cromatografía de gas licuado fue sugerida por Abel y colaboradores en 1969 (43), quienes se consideraron los fundadores de una nueva dirección en la bacteriología moderna. Al introducir esta técnica para clasificar especies de la familia Enterobacteriaceae. En forma similar y en un intento de taxonomía para la familia Enterobacteriaceae, Roe y Herde en 1969 (44), Brian y Gardner en 1969 (45), Gorman en 1975 (44), Schrie y Goeritz en 1969 (47), Harsler y Richter en 1969 (48), y Veys y colaboradores en 1969 (49), utilizan la cromatografía de gases para identificar y esclarecer la posición taxonómica de diversos géneros y especies de enterobacterias.

El estudio de la composición de ácidos grasos de lípidos bacterianos, para cada grupo taxonómico, es una de las líneas de investigación que mas desarrollo en este momento, diversos autores (50, 51, 52, 49, 54), definen las diferencias mas importantes entre las bacterias Gram positivas y Gram negativas de ha encontrado que en las secundas se presentan principalmente ácidos oleicos, palmíticos y palmíticos, varios esteres metilos no se han identificado aun, para las Gram positivas, la temperatura es el principal sitio de los diversos lípidos, el 98% de los total lípidos, están en la membrana y el resto (2%) en la fracción protoplasmática, la composición química efectiva. Mas et al. en 1969 (55) descubren que las Gram negativas poseen un alto grado de uniformidad, ya que 14 de 16 especies poseen cadenas lineales saturadas de 16 carbonos (C₁₆), mientras que las Gram positivas exhiben gran variación en su composición, la ausencia de ácidos con cadenas ramificadas en la mayoría de las Gram negativas Gram negativas poseen las cadenas positivas se caracterizan por ácidos con cadenas ramificadas, especialmente por ácidos grasos de cadena lineal, saturada de 16 carbonos (C₁₆).

Actualmente diversos trabajos (56, 54, 55) se han discutido la variación en los valores de los ácidos grasos, como producto de los cambios que ocurren en los parámetros experimentales, los perfiles cromatográficos pueden variar con cambios asociados a la edad del cultivo (54), sustrato utilizado, la temperatura de incubación, la dilución usada en los cultivos (56), aeración (23%), concentración de microorganismos y vitaminas (23) y pH (56).

De todo esto, ha surgido la propuesta de varios laboratorios (60) (13) (24) de que el trabajo debe estandarizarse y con esto automatizarse, al menos la identificación de patógenos bacterianos, lo que a pesar de que la cromatografía de gas licuado de ácidos grasos celulares en bacterias, tiene casi treinta años

de desarrollo, aun prevalece la inexperiencia para operar e interpretar los datos del cromatograma, lo que limita la técnica, es así que a finales de los setenta y durante la década de los ochenta, para obtener la máxima información de los perfiles cromatográficos, se aplicaron diversos métodos estadísticos multivariados (5) (37) (42). El análisis de las condiciones en el análisis cromatográfico son necesarias, para ayudar a disminuir el impacto de la diversidad debida a condiciones de cada variable en la marcha cromatográfica (34).

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE Silicobacter, Enterobacter Y Escherichia

La familia Enterobacteriaceae (Pann) consiste de bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos y aerobios, no forman esporas y crecen bien en medios artificiales. Algunas especies son atípicas también ocurren variantes no móviles de especies móviles. Las formas móviles son peritricas. Los nitratos son reducidos a nitritos y la glucosa es utilizada fermentativamente con la formación de ácido o de ácido y gas. La prueba de la indofenol oxidasa es negativa y el alginato no es utilizado.

El género Escherichia se compone de bacterias móviles y no móviles que conforman la definición de la familia Enterobacteriaceae y la tribu Escherichieae. Forman ácido y gas de una amplia variedad de carbohidratos fermentables, el adonitol y el inositol son poco utilizados. La lactosa es fermentada pero algunas cepas la utilizan lentamente y algunas no la fermentan. La lisina, arginina y ornitina son descarboxiladas por la mayoría de los cultivos, se forma ácido del sulfato de sodio y el acetato de sodio es utilizado como una sola fuente de carbono. La especie tipo es Escherichia coli. Mycopla Castellani y Chaibero.

El género Silicobacter está compuesto de bacterias móviles que conforman la definición de la familia Enterobacteriaceae y de la tribu Salmonelleae. La lisina no es descarboxilada y menos del 20% de cepas poseen ornitina descarboxilasa. La ureasa es poco producida por la mayoría de los cultivos, la leucina es débil. El crecimiento ocurre en medio que contiene jarugo de papaya y el ácido es producido en medio de jarugo de jarugo. La gelatina no licua en medio nutriente. El dulcitol y la celobiosa son fermentados rápidamente por la mayoría de los cultivos. La lactosa es utilizada pero la reacción frecuentemente es tardada. La especie tipo es Silicobacter leuconii. Braun, Worham y Grillen.

El género Enterobacter está compuesto de bacterias móviles que conforman la definición de la familia Enterobacteriaceae y de la tribu Klebsielleae. La reacción Voges-Proskauer es positiva, la gelatina se licua lentamente por la forma más común Enterobacter cloacae. La lisina descarboxilasa no se produce en E. cloacae, pero otras especies del género poseen este sistema enzimático, produce ornitina descarboxilasa. El alginato de sodio no es utilizado como única fuente de carbono. El gas no se forma del inositol y glicerol en cultivos de E. cloacae. El ácido se produce del sorbitol y ramnosa, celobiosa y celulosa por la mayoría de las especies. La especie tipo es Enterobacter aerogenes (Grillen) Hormaeche y Fleury (34) (35).

La clasificación de la familia Enterobacteriaceae ha sido motivo de gran controversia. La clasificación más utilizada es la de Edwards y Ewing de 1962. (19) (21). A pesar de su tendencia reduccionista, ha sido aceptada debido a su utilidad para el diagnóstico y para los estudios epidemiológicos. Este esquema se ha complicado con el correr del tiempo, en 1972 (22), se reportaban 11 géneros y 25 especies de la familia, en el año de 1985 (23), se reportan 22 géneros, 84 especies y 23 biotipos. Lo que ha complicado aún más la sistematización de la familia, de ahí que es necesario incorporar nuevos criterios de clasificación e identificación a los ya existentes, como es la serotipología y en especial, el análisis de lipidos por cromatografía de gases, sobre todo a nivel de cepas atípicas de México, ya que brinda la oportunidad de separar, aislar y cuantificar compuestos hasta hoy no tratados en la familia Enterobacteriaceae.

Tradicionalmente para determinar a los miembros de la familia Enterobacteriaceae se han utilizado una serie de medios de preparación ingeridos, con azúcares que dan una identificación preliminar de los bacilos entericos. Aunque la fermentación y reacciones metabólicas en medios diferenciales, permiten la probable identificación, su identificación final a nivel de especie, se basa generalmente en su estructura antigénica, sin embargo, ciertas cepas que poseen la misma actividad antigénica pueden dar lugar a reacciones metabólicas distintas, variantes fermentativas o biotipos.

El conducto gastrointestinal, constituye un ambiente ideal para el desarrollo de una amplia variedad de cepas de E. coli, Citrobacter y Enterobacter, de otras bacterias y virus bacterianos entericos. La población posee una densidad elevada, el crecimiento es continuo, las condiciones nutritivas varían y los genes pueden ser transferidos de una cepa a otra por transducción, conjugación y transformación. El resultado de esta situación consiste en el número de una amplia variedad de recombinantes, que presentan patrones superpuestos de metabolitos de antigénicidad.

Basar la clasificación e identificación en solo pruebas bioquímicas, serológicas y taxidípicas puede conducir a errores como los que hoy sufren los sistemas taxonómicos para esta familia. Es incorporar el análisis cromatográfico de gases, en los lipidos de enterobacterias puede representar una herramienta de gran utilidad, en un nuevo enfoque de la sistematización tradicional, y esclarecer posibles relaciones taxonómicas más naturales (24, 25).

OBJETIVOS

9

- Instrumentar en México la técnica de cromatografía gas-liquido para el análisis de ácidos grasos celulares en enterobacterias
- Determinar la composición de los ácidos grasos celulares en las siguientes especies de la Familia Enterobacteriaceae: Citrobacter amalonaticus, Citrobacter freundii, Enterobacter aerogenes, Enterobacter adhaerens, Enterobacter silvaceus y Escherichia coli
- Proponer los perfiles cromatográficos de los ácidos grasos en las seis especies bacterianas, como el inicio de la construcción de un banco de datos, para la identificación-clasificación de enterobacterias de interés clínico y sanitario en México.

MÉTODOS

ORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

Las cepas de bacterias usadas en este trabajo se muestran en la tabla I, todas ellas provenientes directamente de la American Type Culture Collection (ATCC). Para garantizar la viabilidad y estabilidad genética de las cepas, durante el estudio, se depositaron en sus bidas, en el Laboratorio de Cultivos Microbianos del INVESTAV. Las cepas fueron identificadas por prácticas microbiológicas estándar (18). Investigaciones microbiológicas adicionales y revalidación de Gram, se efectuaron únicamente a las cepas positivas y pruebas bioquímicas por el sistema de identificación comercial API 20E (API System, Analytab Products, Plainfield, N. J.).

Las cepulas se crecieron en agar nutritivo Merck (1902), se prepararon los tubos de ensayo de 1 cm de diámetro por cepa bacteriana, cada uno con 1 ml de agar. La inoculación de las cepas es a partir de un tubo con agar inclinado con la cepa bacteriana; al final del período experimental de crecimiento se hace crecer la bacteria a 37°C hasta que alcance el fin de dicho período.

Posteriormente se recoge 2 mg de biomasa, los cuales se pesan en tubos de ensayo en la balanza analítica. Para obtener esta cantidad de biomasa la inoculación debe hacerse por estiramiento que cubra totalmente la capa.

La cosecha celular se obtiene por lavado de la superficie del medio del cultivo bacteriano. Para cepas no patógenas la solución de lavado es solución fisiológica isotónica 0.9% de NaCl con ayuda de una pastilla de celulosa se respinde perfectamente todo el crecimiento celular de la capa de cultivo y se vierte la suspensión que se forma, directamente a un tubo de ensayo; se pesa la biomasa y se pasa a un tubo de centrifuga; se centrifuga a 2000 g 10 minutos 12,000 r.p.m. se desecha el sobrenadante para agregar nuevamente solución salina para lavar y centrifugar una vez más.

Con las cepas patógenas es posible utilizar varios métodos para los tres lavados de la superficie del medio de cultivo, sin peligro de incluir en los resultados de los cromatogramas a obtener. Un método práctico es aquel que además del lavado, incluye la fijación, para este propósito se puede utilizar una solución de formaldehído al 10%.

De los 2 mg de biomasa obtenida se prepara la materia seca. Al transferir la pastilla del tubo de centrifuga a viales, previamente lavados con hexano y secados en estufa, la transferencia se realiza por medio de una cucharilla de metal previamente lavada con hexano, se reparte perfectamente la biomasa sobre las paredes de los viales, con la finalidad de obtener un secado más rápido y eficiente durante la liofilización.

TABLA 1. DEPAS DE MAS EN ESTE ESTADO

EFFECTO	DEPAS DE PASSE-PASSE
EFFECTO PASSE-PASSE	ATTO 274-6
EFFECTO PASSE-PASSE	ATTO 274-6
EFFECTO PASSE-PASSE	ATTO 180-9
EFFECTO PASSE-PASSE	ATTO 271-85
EFFECTO PASSE-PASSE	ATTO 180-47
EFFECTO PASSE-PASSE	ATTO 11000

Los viales permanecen cerrados en todo momento para evitar cualquier contaminación, hidratación y destrucción de ácidos grasos.

LIOFILIZACIÓN

El paquete celular obtenido se acondiciona previamente, se coloca el vial en una mezcla de hielo seco y acetona para alcanzar aproximadamente -70°C , posteriormente se liofiliza en un aparato Labconco LPH-100K 4.5 litro con un sistema de enfriamiento en seco -75°C a -85°C , por una hora aproximadamente, previamente se acondiciona la liofilizadora a -85°C y un vacío de 0.5 milímetros de mercurio a 0.5 litro. No es recomendable almacenar el liofilizado, por que al pasar el tiempo se presentan problemas de hidratación y destrucción de ácidos grasos, si fuese muy necesario, se coloca a -20°C en un congelador.

ESTERIFICACIÓN Y EXTRACCIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS

El proceso, consiste en agregar a la muestra liofilizada 120 mil. 1 ml de una solución de metilato de sodio (solución A) Metolide de sodio y después de agitación por 5 minutos, adicionar otra solución de metanol saturado con HCl gas (solución B). Hasta alcanzar un pH de 1.0 a 2.0 y agitar 30 minutos. Transcurrido este tiempo adicionar 1 ml de NaCl 0.6% .

El proceso de extracción de ésteres metílicos con hexano, se realiza al agregar 1 ml de hexano, se agita la muestra y se separa la capa de hexano con los ésteres metílicos (capa superior transparente) con una pipeta Pasteur, se pasa a un tubo de ensayo que contiene sulfato de sodio anhidro para extraer el agua. Se repiten los lavados por dos veces para cada uno de las muestras, la evaporación del hexano se realiza con N_2 gas hasta un volumen de 10 ul para tomar 1 ul que se inyecta al cromatograma de gases (62).

ANÁLISIS DE LOS ÁCIDOS GRASOS ESTERIFICADOS

La muestra de 1 ul de la fracción obtenida de los ésteres metílicos se analiza en un cromatograma de gases (62) en un Packard Instrument Tooling, Rockville, Md., equipado con un inyector sólido (Inyectora 660), un horno y detector de ionización de flama hidrogeno 0.5 ul, en una columna capilar de sílice fundida FFAPMS 4 m por 0.25 mm diámetro interno, altura 100 pies y 0.25 um de capa como fase estacionaria. En principio, la mezcla de ésteres de ácidos grasos puede separarse tanto en columna normal, como en columna capilar, sin embargo, los resultados en columna capilar son más satisfactorios, debido a la mejor separación que puede obtenerse de ella y en la que desde luego interviene su longitud y su tipo de fase empleada (61). Se puede sin embargo, utilizar una columna normal, por ejemplo con empaque de una fase no polar SE-30 , Chromatone MS-Super , la cual no da una perfecta separación de los ésteres de ácidos grasos de baja ligadura, sin embargo, es convenientemente estable a altas temperaturas (partida de 240°C), esto permite trabajar sin una

columna de compensación y por lo tanto analizar dos muestras simultáneamente. La suficiente estabilidad térmica es también una ventaja, si la muestra tiene componentes donde la longitud de la cadena de carbono es de más de 20 unidades (29) (30)

Las condiciones de operación fueron las siguientes:

Temperatura del inyector 250°C

Temperatura del detector 250°C

Presión del nitrógeno 80 p.p.s.

Temperatura de la columna programada de 120°C a 250°C a 4°C/minuto

El gas acarreador fue nitrógeno con un flujo aproximado de

5 ml/minuto al puerto de inyección. Bajo estas condiciones los

ésteres metílicos de los ácidos grasos de 10 a 20 carbonos de

longitud, eluvieron de la columna en 35 minutos en promedio. La

cuantificación de los perfiles cromatográficos en el área de

los picos fue efectuada con un integrador electrónico Hewlett Packard 4290A.

Los picos de los ésteres metílicos de los ácidos grasos, fueron identificados primariamente por la comparación de los tiempos de retención de cada cepa, con los tiempos de retención de una mezcla estándar de ésteres metílicos de los ácidos grasos bacterianos de referencia 4-7060. La mezcla contiene un total de 10 mg/ml de ésteres metílicos en metil caproato: capelco (Cinc. Beilafonte, Pa.) Todos los organismos fueron procesados entre 5 y 8 veces.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

De los picos de los ácidos grasos obtenidos en el cromatograma el punto de interés, son los ácidos con el número de átomos de carbono en el intervalo de la a eb. Los ácidos con una cadena más corta que la, aparecen como productos intermedios y entonces no se toman en consideración. Una vez determinados los picos de importancia en el cromatograma del estándar seleccionado, se procede a procesar la información de la siguiente manera: se normaliza con este es el primer paso de manipulación numérica a efectuarse con los datos obtenidos, con el fin de estandarizar las unidades de medición en porcentajes de las áreas dadas por el cromatograma, así se preparan los datos de las 5 especies bacteriológicas, que serán analizados por los métodos estadísticos descriptivos en los puntos subsiguientes.

El proceso de normalización se efectúa mediante la transformación de los datos numéricos de área y tiempo, a partes proporcionales en porcentajes, en relación a un dato de área o tiempo, como retención que se considera el 100%, el criterio para obtener el dato de área y tiempo referente es el siguiente de los datos originales arrojados por el cromatograma, se elige como dato referente para la normalización, aquel que provenga del pico o área más alta y se le asocia el tiempo por una conversión basada en un estándar seleccionado previamente. Ya que se tienen los datos normalizados se procede a tabularlos y graficarlos por las repeticiones efectuadas en cada cepa (22).

Por Medidas estadísticas descriptivas. La media aritmética, desviación estándar y coeficiente de variación, para las áreas de los picos y tiempos de retención normalizados, fueron calculados

para cada especie. Los valores se calcularon como porcentajes del total del área del pico para eliminar el efecto de la variación por el tamaño del insecto.

El análisis de conglomerados. El método de clasificación utilizado en este estudio es el de unión simple, y se utilizó primero para formar grupos en términos de presencia o ausencia de los carbonos, en segundo término para formar los grupos de acuerdo a su área normalizada. Para el primer caso se utilizó como medida de similitud el coeficiente de correlación para variables dicotómicas (76), en el segundo caso se usó como medida de similitud el coeficiente de correlación de Pearson y la distancia Euclidiana.

TABLA 3. PRINCIPALES ACIDOS GRASOS AISLADOS ^a

CINCO	IDENTIFICACION	
	ABREVIATURA	NOMBRE
1	C 11:0	UNDÉCANOICO
3	C 12:0	DODECANOICO (CLAUPEICO)
7	C 14:0	TETRADECANOICO (MIRISTICO)
8	1-OH-15:0 + 15-Ne	15-METILTETRADECANOICO
10	C 15:0	PENTADECANOICO
12	3-OH-C 14:0	3-HIDROXI TETRADECANOICO
14	C 16:1 ^{cis}	16:1- <i>cis</i> -HEXADECANOICO
15	C 16:0	HEXADECANOICO (PALMITICO)
18	C 17:0	HEPTADECANOICO
19	2-OH-C 16:0	2-HIDROXIHEXADECANOICO
22	C 18:1 ^{cis} + ^{trans} C 18:1 ^{cis}	Trans-18-OCTADECANOICO CIS-18-OCTADECANOICO
23	C 18:0	18-TADECANOICO (ESTEARICO)
24	C 19:1 (CICLICO) 9:10	CIS-9-METILENO- 19-TADECANOICO
25	C 19:0	NONADECANOICO

^a LOS ACIDOS GRASOS SON ENTERAMENTE DE AGUERO AL OLEN DE ELUCION DE LA COLUMNA DE CROMATOGRAFIA GASEOSA.

TABLA 3. COMPOSICION DE LOS ACIDOS GRASOS CELULARES EN LAS SEIS ESPECIES

	INVESTIGADAS														
	PRESENCIA DEL PICO NUMERO ^a														
	1	3	7	8	10	12	14	15	18	19	22	23	24	25	
<u>Citrobacter salmonaticus</u>	0	●	●	0	●	●	●	●	●	●	●	●	●	0	
<u>Citrobacter freundii</u>	●	●	●	0	●	0	●	●	●	●	●	●	●	●	
<u>Enterobacter aerogenes</u>	0	0	●	0	●	●	●	●	●	●	0	●	●	0	
<u>Enterobacter agglomerans</u>	0	●	●	●	0	●	●	●	●	0	0	●	●	●	
<u>Enterobacter cloacae</u>	0	●	●	0	●	0	●	●	●	●	●	0	●	0	
<u>Escherichia coli</u>	●	●	●	0	●	●	●	●	●	●	●	●	●	0	

^a EL NUMERO DEL PICO SE REFIERE A LOS PICOS LISTADOS EN LA TABLA 2. LOS PRINCIPALES ACIDOS GRASOS PARA CADA ESPECIE SE INDICA POR 0=AUSENCIA ●=PRESENCIA, DE POR LO MENOS 5 DETERMINACIONES.

TABLA. 4

Citrobacter amalonaticus

111

CROM 42 7-4-89		
N	AN	TN
3	4.24	34.00
7	16.60	66.66
10	4.73	82.85
12	7.46	88.92
14	28.89	95.22
15	100.00	100.00
18	46.57	113.43
19	3.79	116.62
22	5.19	127.92
23	46.49	129.05
24	8.73	133.30

CROM 37 3-12-87		
N	AN	TN
3	2.36	37.70
7	16.58	66.09
10	3.30	82.05
12	1.24	89.43
14	13.79	95.32
15	100.00	100.00
18	52.05	113.75
19	2.23	117.45
22	1.32	128.92
23	22.55	129.76
24	3.87	134.44

CROM 35 18-11-87		
N	AN	TN
3	4.93	44.51
7	21.38	71.31
10	5.09	85.54
12	7.70	90.47
14	32.00	96.22
15	100.00	100.00
18	39.40	111.33
19	2.41	113.75
22	3.11	124.83
23	29.59	125.20
24	3.78	127.3

CROM 41 7-4-89		
N	AN	TN
3	5.73	39.12
7	21.06	66.82
10	2.91	83.19
12	4.34	89.50
14	26.59	95.42
15	100.00	100.00
18	37.82	113.62
19	3.40	116.00
22	5.58	128.31
23	36.73	129.30
24	13.22	133.70

CROM 36 3-12-87		
N	AN	TN
3	2.28	37.99
7	27.31	66.31
10	2.59	83.31
12	3.82	88.67
14	7.46	95.54
15	100.00	100.00
18	43.79	113.90
19	0.59	116.69
22	2.01	128.92
23	15.76	129.90
24	2.95	134.59

CROM 34 18-11-87		
N	AN	TN
3	1.99	44.40
7	17.38	71.27
10	6.82	85.49
12	6.55	90.62
14	31.72	96.17
15	100.00	100.00
18	38.52	111.27
19	2.44	113.75
22	1.33	123.19
23	24.66	123.95
24	1.85	127.32

N: NUMERO DE PLANTAS DEL AREA DE MUESTRA; AN: AREA NORMALIZADA; TN: TIEMPO NORMALIZADO.

Citrobacter freundii

CROM 9 28-10-87		
N	AN	TN
1	4.9	73.82
3	7.86	45.38
7	7.49	74.41
10	4.99	91.17
14	25.28	74.47
15	100.00	100.00
18	29.90	100.11
19	5.69	110.33
22	2.36	121.11
23	78.12	122.23
24	3.91	124.94
25	4.67	137.68

CROM 12 2-12-87		
N	AN	TN
1	7.40	76.51
3	6.17	76.66
7	19.18	86.14
10	4.95	92.88
14	42.77	94.32
15	100.00	100.00
18	12.62	113.94
19	4.15	117.65
22	4.45	129.15
23	36.33	129.92
24	10.41	134.62
25	3.94	140.11

CROM 13 3-12-87		
N	AN	TN
1	9.20	26.62
3	5.40	36.87
7	10.50	66.29
10	5.60	81.27
14	44.83	95.49
15	100.00	100.00
18	33.41	113.37
19	6.45	115.76
22	7.02	129.34
23	40.89	129.86
24	5.45	134.69
25	7.13	144.32

CROM 21 24-02-89		
N	AN	TN
1	9.15	25.22
3	6.74	36.83
7	13.43	65.89
10	5.11	92.63
14	23.94	95.27
15	100.00	100.00
18	56.78	114.04
19	5.26	117.77
22	3.97	129.54
23	43.63	130.50
24	10.72	135.23
25	6.91	149.16

CROM 28 3-03-89		
N	AN	TN
1	9.67	29.06
3	4.79	39.40
7	19.24	67.89
10	8.00	83.32
14	26.87	95.55
15	100.00	100.00
19	51.49	113.66
19	4.82	117.13
22	11.50	129.28
23	73.56	129.36
24	9.32	133.80
25	4.20	147.89

N= NUMERO DE PICO DEL ACIDO GRASO AN= AREA NORMALIZADA
TN= TIEMPO NORMALIZADO

Enterobacter aerogenes

CROM 3 3-02-89		
N	AN	TN
-	15.67	67.88
10	20.13	83.57
12	5.46	89.94
14	36.89	95.59
15	100.00	100.00
18	46.34	113.82
19	5.68	116.28
23	34.87	126.15
24	2.63	132.24

CROM 22 24-02-89		
N	AN	TN
7	19.32	65.85
10	19.20	82.58
12	7.45	88.94
14	34.98	95.18
15	100.00	100.00
18	47.51	112.68
19	18.98	117.66
23	36.77	130.57
24	4.25	135.31

CROM 43 2-12-87		
N	AN	TN
7	24.21	65.96
10	8.61	82.61
12	7.91	88.78
14	38.28	95.11
15	100.00	100.00
18	47.31	113.67
19	4.61	117.89
23	38.82	129.59
24	1.75	124.84

CROM 9 10-02-89		
N	AN	TN
7	19.49	64.85
10	19.41	81.69
12	9.19	87.38
14	34.88	94.71
15	100.00	100.00
18	47.81	114.08
19	5.91	117.33
23	38.87	130.59
24	6.81	134.99

CROM 48 7-04-89		
N	AN	TN
7	24.24	66.84
10	8.88	83.12
12	9.49	89.15
14	46.82	95.44
15	100.00	100.00
18	48.91	113.65
19	9.98	116.96
23	61.84	129.28
24	9.81	133.69

CROM 44 2-12-87		
N	AN	TN
7	22.57	65.81
10	9.29	82.45
12	7.18	88.48
14	28.77	95.83
15	100.00	100.00
18	47.15	113.55
19	4.78	116.94
23	24.28	129.44
24	4.35	123.89

NI: NUMERO DE PICO DEL ACIDO ORICO AN: AREA NORMALIZADA
TN: TIEMPO NORMALIZADO

Enterobacter agglomerans

CROM 27 11-11-87		
N	AN	TN
3	7.53	44.62
7	21.63	71.42
8	2.38	88.81
12	7.20	98.89
14	9.10	96.33
15	100.00	100.00
18	47.58	111.42
23	18.00	124.28
24	12.98	127.28
25	19.52	138.52

CROM 28 11-11-87		
N	AN	TN
3	5.14	44.56
7	18.25	71.42
8	2.38	88.59
12	6.18	98.84
14	9.38	96.33
15	100.00	100.00
18	68.68	111.48
23	11.77	124.28
24	5.56	127.57
25	23.96	138.52

CROM 32 17-03-89		
N	AN	TN
3	5.87	38.79
7	28.55	66.49
8	3.64	76.51
12	7.56	88.91
14	4.98	95.18
15	100.00	100.00
18	41.79	113.74
23	12.68	129.22
24	21.18	133.66
25	27.56	147.13

CROM 46 28-04-89		
N	AN	TN
3	11.21	37.86
7	29.29	65.24
8	3.85	75.62
12	1.23	88.47
14	1.68	94.65
15	100.00	100.00
18	68.18	114.42
23	16.71	131.38
24	1.32	136.08
25	92.22	158.25

CROM 47 28-04-89		
N	AN	TN
3	9.81	38.22
7	31.45	65.24
8	3.49	75.62
12	1.21	88.78
14	6.88	95.22
15	100.00	100.00
18	71.13	114.42
23	17.48	131.22
24	4.21	136.08
25	58.58	158.25

N= NUMERO DE PICO DEL ACIDO GRASO AN= AREA NORMALIZADA
 TN= TIEMPO NORMALIZADO

Enterobacter cloacae

CROM 23 23-11-87		
N	AN	TN
3	1.74	41.4
7	1.74	70.4
17	1.8	34.9
14	19.23	35.2
15	100.00	100.00
18	51.44	111.4
19	1.63	113.6
22	4.25	123.2
24	4.7	127.4

CROM 24 23-11-87		
N	AN	TN
3	1.27	17.3
7	1.12	70.1
17	2.11	25.12
14	13.64	36.05
15	100.00	100.00
18	47.61	111.45
19	1.36	113.46
22	2.35	123.00
24	4.17	127.9

CROM 25 25-11-87		
N	AN	TN
3	2.34	43.3
7	8.63	70.3
10	2.23	54.3
14	37.09	35.2
15	100.00	100.00
18	48.5	111.4
19	1.6	113.7
22	5.70	137.2
24	9.56	127.6

CROM 45 28-04-89		
N	AN	TN
3	1.23	17.0
7	19.48	65.38
10	2.9	32.4
14	48.23	35.2
15	100.00	100.00
18	24.33	114.5
19	4.39	113.2
22	2.9	130.0
24	11.64	136.11

CROM 28 24-02-89		
N	AN	TN
3	2.24	37.9
7	1.67	65.7
10	4.0	82.54
14	27.24	35.16
15	100.00	100.00
18	52.4	114.11
19	5.5	117.7
22	6.56	129.7
24	8.35	135.2

CROM 44 28-04-89		
N	AN	TN
3	1.1	37.2
7	19.4	65.74
10	3.1	33.2
14	41.1	35.3
15	100.00	100.00
18	27.44	114.5
19	5.0	117.7
22	2.3	129.0
24	13.5	136.11

AN: NUMERO DE PICO DEL ACIDO URICO ANI AREA NORMALIZADA
TN: TIEMPO NORMALIZADO

Escherichia coli

CROM 1 14-10-87		
N	AN	TN
1	8.81	33.22
3	4.35	44.64
7	15.07	71.32
10	28.33	85.35
12	9.00	98.5
14	53.49	96.27
15	100.00	100.00
18	23.8	111.00
19	15.5	113.46
22	2.18	122.72
23	50.05	123.78
24	5.45	126.86

CROM 2 14-10-87		
N	AN	TN
1	1.25	32.12
3	6.92	44.57
7	21.62	71.24
10	34.00	85.50
12	11.00	90.40
14	55.25	96.22
15	100.00	100.00
18	24.7	110.87
19	15.8	113.30
22	2.79	122.43
23	52.90	123.65
24	4.55	126.55

CROM 5 25-11-87		
N	AN	TN
1	5.43	32.14
3	5.09	43.56
7	16.48	70.60
10	22.59	85.18
12	17.17	90.34
14	61.94	96.15
15	100.00	100.00
18	14.02	111.42
19	17.39	114.03
22	9.63	123.69
23	53.74	124.60
24	9.43	127.95

CROM 6 25-11-87		
N	AN	TN
1	2.78	32.14
3	4.67	43.56
7	14.23	70.60
10	22.07	85.18
12	13.27	90.34
14	62.47	96.15
15	100.00	100.00
18	17.07	111.42
19	18.13	114.03
22	4.43	123.63
23	56.21	124.67
24	6.74	127.95

CROM 7 25-11-87		
N	AN	TN
1	2.67	32.08
3	6.39	43.46
7	16.51	70.46
10	27.88	85.05
12	11.03	90.07
14	48.49	96.07
15	100.00	100.00
18	15.67	111.00
19	17.37	113.74
22	4.38	123.31
23	59.39	124.46
24	5.65	127.54

CROM 8 25-11-87		
N	AN	TN
1	3.75	32.14
3	5.06	43.56
7	15.22	70.60
10	21.35	85.18
12	16.62	90.34
14	62.65	96.17
15	100.00	100.00
18	15.79	111.42
19	16.52	114.03
22	5.40	123.69
23	51.54	124.61
24	5.07	127.95

N= NUMERO DE PICO DEL ACIDO ORAZO AN= AREA NORMALIZADA
 TN= TIEMPO NORMALIZADO

TABLE 1. - ANALYSIS OF VARIATION IN THE NUMBER OF BACTERIAL COLONIES PER UNIT OF AREA IN THE TISSUE OF THE GILLS OF THE FISHES OF THE TROPICAL OCEAN. - ANALISIS DE LA VARIACION EN EL NUMERO DE COLONIAS BACTERIANAS POR UNIDAD DE AREA EN EL TISSUE DE LAS BRANQUIAS DE LOS PECES DEL OCEANO TROPICAL.

ESCHERICHIA COLI				
M	AN	CV	TN	CV
1	2.28 1.64	84 541	2.4	.915
3	5.49 1.97	187 554	4.9	.912
7	17.9 2.87	153 537	7.8	.907
10	26.9 4.31	189 168	85.2	.901
12	13.9 3.27	752 108	21.7	.931
14	61.5 4.41	979 972	96.1	.909
15	100 0	0	100 0	0
18	18.6 4.41	236 248	111 248	.902
19	16.7 1.92	969 132	113	.902
22	5.46 3.26	585 379	123	.901
23	51.9 3.37	962 456	124	.903
24	6.81 2.81	295 418	127	.904

CITROBACTER AMBLOBATICUS				
M	AN	CV	TN	CV
3	3.04 1.87	462 327	41.0	.975
7	20.7 4.21	202 352	68.1	.974
10	4.23 1.30	106 129	84.1	.953
12	2.48 0.84	481 812	89.7	.993
14	23.1 7.61	268 347	95.7	.963
15	100 0	0	100 0	0
18	31.5 6.28	171 171	112	.915
19	2.84 1.95	421 125	115	.959
22	3.26 1.89	552 556	126	.921
23	28.5 19.2	357 301	127	.925
24	5.13 4.00	723 326	131	.927

CITROBACTER FREUNDI				
M	AN	CV	TN	CV
1	2.26 1.76	249 141	10.2	.928
3	5.86 1.99	223 194	17.1	.909
7	11.30 4.23	135 377	25.2	.914
10	21.70 3.34	236 351	43.3	.911
14	21.77 9.34	105 162	47.0	.905
15	100 0	0	100 0	0
18	30.83 17.13	102 126	112	.922
19	4.87 1.76	183 112	115	.926
22	6.18 3.85	622 170	127	.928
23	18.50 3.34	191 145	128	.926
24	7.86 1.89	385 434	132	.932
25	4.23 1.73	179 43	146	.933

N = NUMBER OF FISHES OF EACH SPECIES AND MEDIA DE AREA NORMALIZADA = MEDIA DEL TISSUE NORMALIZADO. AN = NUMBER OF ANALYSIS. VALOR SUPERIOR MEDIA = VALOR INTERIOR DENSIIDAD ESTANDAR.

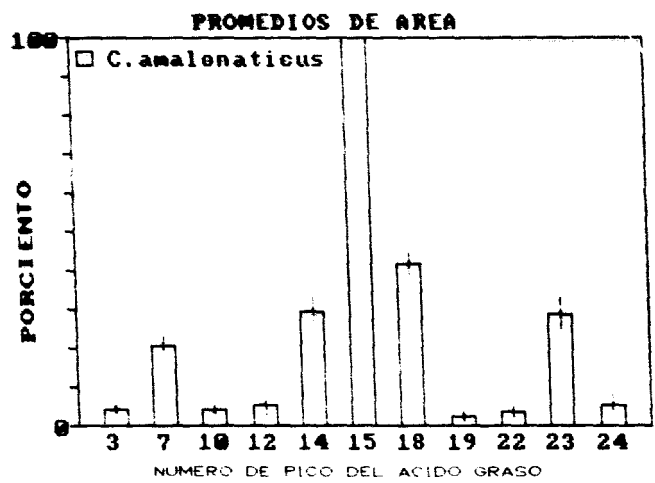


FIGURA 1. AREA DE LOS PICO DE LOS ACIDOS GRASOS EN EL ANALISIS POR GASES DE UN EJEMPLAR DE LA MEDIA DEL AREA DEL ESTANLAR.

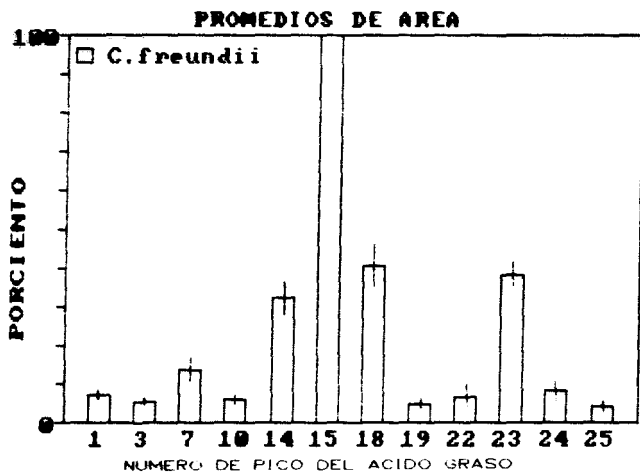


FIGURA 2. AREAAS DE LOS PICO DE LOS ACIDOS GRASOS EN EL LIQUIDIA DE LAS BACTERIAS TIPO PARA MEDIR EL AREA DEL PICO DEL ACIDO GRASO EN LOS LIQUIDIA DE ESTADIA.

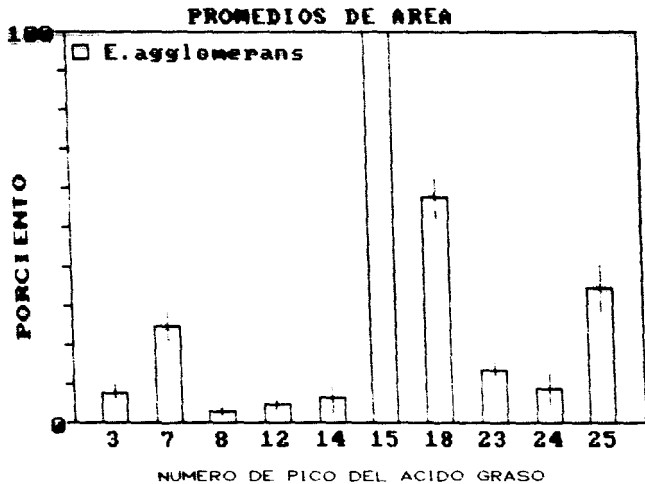


FIGURA 4. AREA DE LOS Picos de los ácidos grasos EN E. agglomerans. El área de cada pico se midió en la MEDIA DEL AREA DEL PICO y se normalizó con el AREA TOTAL DEL AREA.

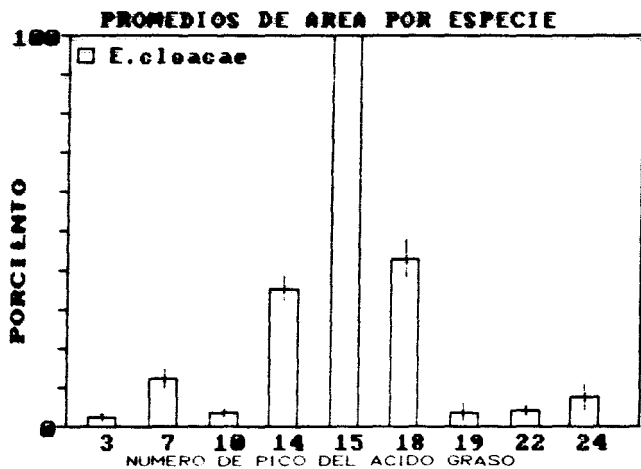
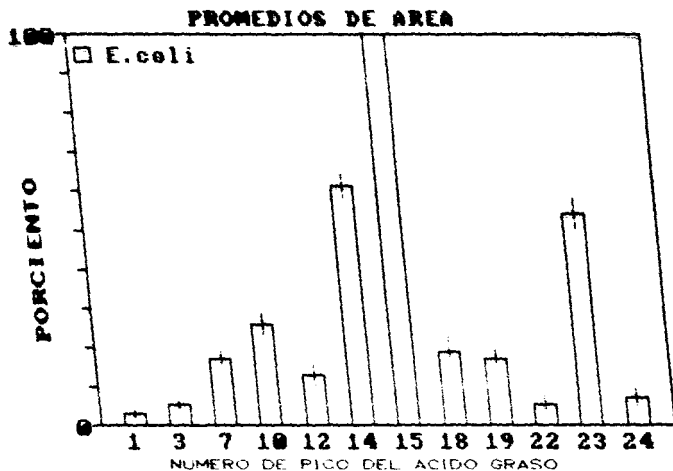


FIGURA 11. AREA PROMEDIO DE LA ESPECIE *E. cloacae* EN LOS PERFILES DE ACIDOS GRASOS DE LAS BARRAS DE TERAPIA PARA MEJORAR LA ALIMENTACION DEL FICUS DEL AVILA. (VALORES ESTADISTICAMENTE SIGNIFICATIVOS)



... .. LAS
 DEL DEL ACIDO

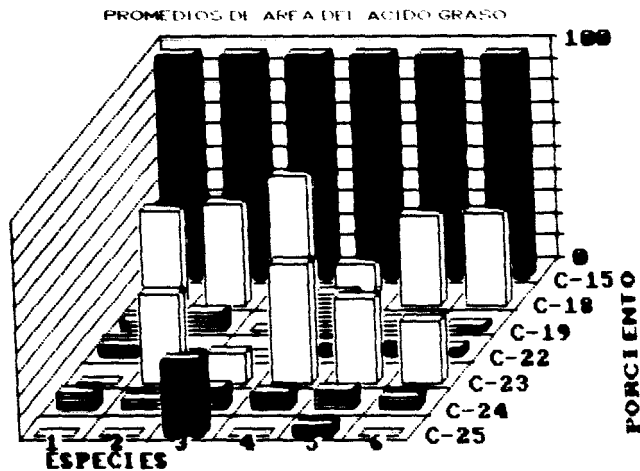


Fig. 10. - Promedios de área de los ácidos grasos de las especies 1-6 expresados en porcentaje de área del ácido graso de cada especie.

1- *Brachycephalus altipinnatus*; 2- *Brachycephalus altipinnatus*; 3- *Brachycephalus altipinnatus*; 4- *Brachycephalus altipinnatus*; 5- *Brachycephalus altipinnatus*; 6- *Brachycephalus altipinnatus*.

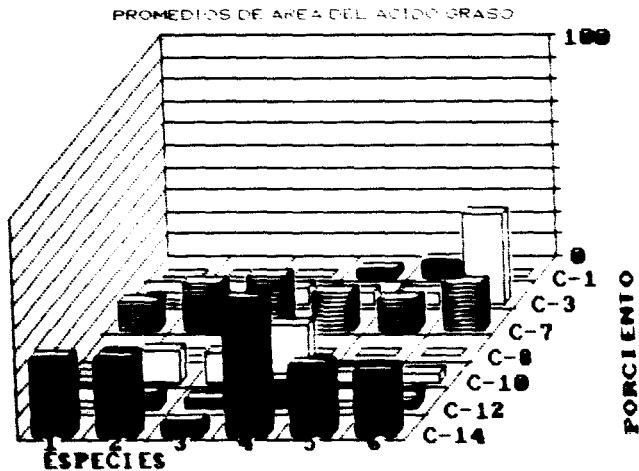


FIG. 1. — Composición porcentual de los ácidos grasos en las especies de *Chironomus* (1-6) y en los ácidos grasos (C-1, C-3, C-7, C-8, C-10, C-12, C-14).

1 = *Chironomus tentaculatus*; 2 = *Chironomus tentaculatus*; 3 = *Chironomus tentaculatus*; 4 = *Chironomus tentaculatus*; 5 = *Chironomus tentaculatus*; 6 = *Chironomus tentaculatus*.
 C-1 = ácido acético; C-3 = ácido propiónico; C-7 = ácido heptanoico; C-8 = ácido octanoico; C-10 = ácido decanoico; C-12 = ácido dodecanoico; C-14 = ácido tetradecanoico.

Figure 10: Histogram

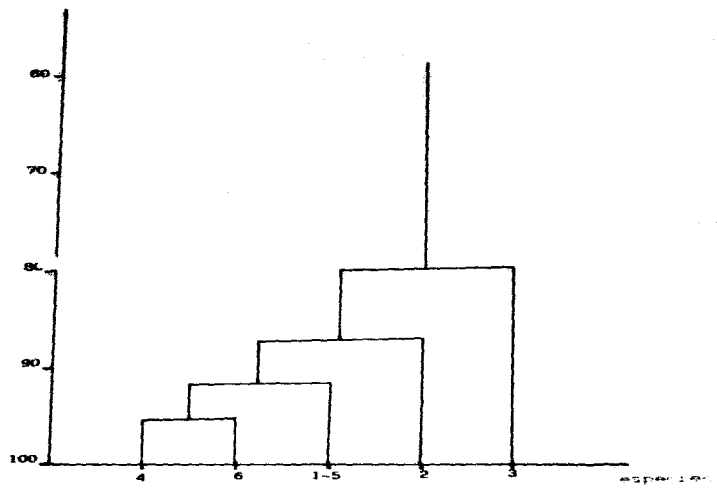


Figure 10: Histogram showing the distribution of experience values. The x-axis represents experience (4, 6, 1-5, 2, 3) and the y-axis represents frequency (60, 70, 80, 90, 100). The distribution is skewed to the right, with the highest frequency occurring at experience level 4.

The distribution of experience values is highly skewed to the right, indicating that most individuals in the sample have low experience levels (4 or 6), while a smaller number of individuals have higher experience levels (1-5, 2, or 3). The peak frequency is observed at experience level 4, with approximately 95 individuals.

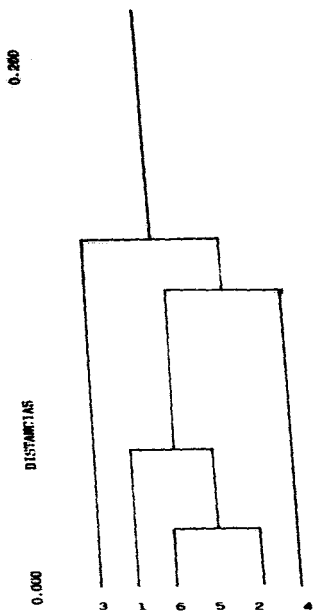


FIGURA 2. DISTRIBUCIÓN DE LAS DISTANCIAS EN EL RESULTADO DE LA RELACION EXISTENTE ENTRE LAS CURVAS BAUTERIANAS, BASADO EN EL COEFICIENTE DE CORRELACION DE PEARSON.

1° EURETEROGRAMAS NORMALES. 2° EURETEROGRAMAS ANOMALOS. 3° EURETEROGRAMAS ANOMALOS. 4° EURETEROGRAMAS ANOMALOS. 5° EURETEROGRAMAS ANOMALOS. 6° EURETEROGRAMAS ANOMALOS.

Las otras dos especies de *Enterobacter*, *E. aerogenes* se agrupa con las especies anteriores con una asociación menor de 0.50. *E. coli* y *E. aggluticans* son las dos especies con el mayor valor y por lo tanto con la menor asociación de 13 y 11.140 con base en los valores de las áreas de los picos de los Ácidos grasos. Es interesante observar que *E. aggluticans* vuelve a segregarse como en el caso del análisis de presencia o ausencia.

La relación existente entre las seis especies bacterianas de acuerdo al análisis de conglomerados por distancias Euclidianas, se presenta en la figura 10, se forman cinco grupos de las seis especies analizadas. El *Legionella* y *E. amnionitiformis* presentan la menor distancia de 2.5 y con ello la mayor asociación de acuerdo al área de los picos de sus ácidos grasos. *E. aerogenes* se une con ambas especies a una distancia mayor de 4.8, y presenta el mismo tipo de agrupamiento que en el análisis de correlación. *E. coli* se asocia con un valor aproximado de 8.0, finalmente *E. aggluticans* y *E. coli* tienen la mayor distancia 12.5 y 13.0 respectivamente, la menor asociación con los tres grupos anteriores.

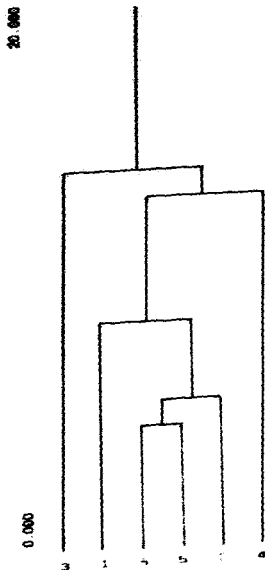


FIGURE 2. THE EFFECT OF THE... ON THE... OF THE...
 THE... OF THE... OF THE... OF THE...
 THE... OF THE... OF THE... OF THE...

THE... OF THE... OF THE... OF THE...
 THE... OF THE... OF THE... OF THE...
 THE... OF THE... OF THE... OF THE...

La Tabla # 2 establece la ocurrencia de 14 picos de ácidos grasos celulares en las 9 especies de la Familia Enterobacteriaceae, para todos los picos, el tipo de ácido graso es una cadena de átomos lineal saturada. Los ácidos grasos octadecánicos, mirístico, tetradecánico, palmítico y hexadecánicos, y esteárico (octadecánicos), han sido establecidos como característicos de la Familia Enterobacteriaceae en otros trabajos que analizan lípidos previamente extraídos y metilados con metilato de sodio e hidrolizados con ácido clorhídrico y extraído con hexano (7), (11), (12), (20), lo que confirma en este estudio otros autores (13), (21), (22), (23), efectúan la esterificación con trifluoruro de boro, pero este método requiere calentamiento y por lo tanto además no presenta mucha efectividad en la recuperación de hidrocarburos y los ácidos grasos hidrocarburos presentan una conversión a ésteres metoximetilados, este efecto se reduce al trabajar en tubos cerrados y esterilizados bajo hidrogeno, ya que la presencia de aire y humedad, produce muestras par lo obscuro que indican destrucción de ácidos clorhídricos. Por desgracia hasta donde se sabe no existen trabajos que comparen y determinen la eficacia de los diferentes métodos de esterificación y extracción, lo que limita de esta manera la uniformidad del método de análisis lipídico como herramienta para la identificación en bacterias y por ende su estandarización.

La presencia de metilaciones, hidroxilaciones, isomerizaciones y de cadenas de ácidos hidrocarburos que se mencionan, es aun distribuido en los trabajos que se citaron, si presencia a nivel de Familia y mucho menos a nivel generico. La tabla # 3 presenta la ocurrencia de los tipos de átomos antes citados para la Familia Enterobacteriaceae en los picos 9, 10, 14, 19, 20 y 24. Su ocurrencia generica se identifica mas adelante. La ausencia de cadenas ramificadas, polisaturadas y oxigenadas para la Familia Enterobacteriaceae y en especial para las 9 especies analizadas en este estudio, representan otros trabajos de Bore y Gierde (24) y de Seydini y Hausler (25).

Para Enterobacter amarae, el pico de mayor area es el 15 que corresponde a ácido hexadecátrico y que ha sido identificado por Bore y Gierde (24) y Hausler (25) y que pertenece a la Familia Enterobacteriaceae. El pico 14 (ácido heptadecátrico) y el pico 24 (ácido octadecátrico) y el pico 19 (ácido hexadecátrico) y el pico 9 (ácido tetradecánico) representan los picos de mayor area y por lo mismo de mayor abundancia y sirven como elementos que pertenecen a esta especie. Tabla # 1a y figura 1.

En Enterobacter liquefaciens el pico que en amarae el ácido palmítico pertenece a liquefaciens dentro de la Familia Enterobacteriaceae, aquí tambien el género liquefaciens por los picos 9, 14, 19, 20 y 24, las diferencias que permiten separar ambas especies son la presencia del pico 19 en liquefaciens, la presencia del pico 14 en amarae y la presencia del ácido graso 25 en liquefaciens Tabla # 1b y figura 2.

Al presentar Enterobacter aerogenes el ácido palmítico como el pico con mayor area, le permite estar incluido en la familia

Enterobacteriaceae. Los picos de los ácidos grasos con mayor peso son el 7, 10, 14, 18, 22. A diferencia de *Y. amygdalius* y *Y. Graudalis*, *Y. aerogenes* presenta el pico 16 como característico. Tabla 5 y 10 y figura 4.

Enterobacter assakensis tiene el ácido palmítico y el ácido mirístico como pico diferencial, el pico del ácido 18 es característico de la Familia Enterobacteriaceae y los picos más abundantes el 7, 10, 14, 18. Aquí el pico 22 diferencia esta especie de las cinco restantes. Tabla 5 y 10 y figura 4.

Para *Enterobacter agalactae* el ácido palmítico y la cetina en la Familia Enterobacteriaceae los picos de mayor abundancia son el 7, 14, 18. Tabla 5 y 10 y figura 5.

Escherichia coli tiene el ácido palmítico como el pico más abundante, característico de la Familia Enterobacteriaceae, esta especie presenta el perfil de ácidos grasos más diverso, este perfil es igual a los determinados en los trabajos de Abel y colaboradores (19), Cecchini y McBrien (20), Heine, et al (21), Hausler y Pienster (22), Lechevalier (23), McFarlane y Armstrong (24) y Sinker (25). Los picos de mayor abundancia son el 7, 10, 12, 14, 18, 19 y 22. Es de las especies analizadas, la única de la que se conoce su constitución lipídica a nivel de los ésteres metílicos y los ácidos grasos volátiles totales en la literatura y es por decirlo, el punto de referencia de la Familia Enterobacteriaceae. Tabla 5 y 10 y figura 6.

A nivel del análisis cualitativo, las 6 especies estudiadas pertenecen a la misma Familia, al presentar el ácido palmítico como el componente con más frecuencia y abundancia, con lo cual, con base en el análisis de ácidos grasos, podemos asegurar que su ubicación a este nivel es correcta. Los ácidos grasos de las cinco primeras especies, hasta donde se sabe, es la primera vez que se determinan, ya que no existe en la literatura ninguna referencia de ellas. Para *Escherichia coli* los determinaciones concuerdan casi totalmente con las referidas por los autores antes citados, las diferencias como son la presencia de los picos C10 y C20, así como la ausencia de la formación de un ácido diclopropano en C10 y los valores un poco más superiores en el área del pico C10 y en el ácido graso C16, pueden explicarse a partir del tipo de columna empleada, el tiempo de uso de la misma, marca, lote y tipo de agar empleado en el cultivo, fase de crecimiento bacteriano en el cual se realiza el análisis, centrifugación, liofilización y demás factores inherentes a la esterilización. Estos factores de referencia en los trabajos constituidos en la bibliografía.

Por lo que respecta al análisis cuantitativo, la tabla 1 y 10 muestra el promedio de la composición de los ácidos grasos con su desviación estándar (D.V.), en las 6 cepas estudiadas, los coeficientes de variación (C.V.) se dan para cada pico del ácido graso. En general el ácido palmítico caracteriza a las 6 especies dentro de la Familia Enterobacteriaceae, es el pico en frecuencia y cantidad más constante. En particular para el género *Enterobacter*, el ácido graso más abundante es el heptadecanoico y presenta el C.V. más pequeño en las tres especies y define al

genero Para E. glabrum figura 5, el acido Cis-9-hexadecanoico define la especie, es un acido graso muy constante ya que presenta un area promedio de 85 y una DS de 4.85 y un CV de 13%. En E. agalactiae figura 2, el acido estearico tiene un area promedio de 40.3 y define la especie, presenta una DS de 10.2 y un CV de 25%. En E. adductum figura 4, el acido nonadecanoico caracteristico de la especie con un area promedio de 44.76, DS de 15.45 y CV de 44%. Escherichia coli figura 6, tiene como acidos grasos mas abundantes y constantes el Cis-9-hexadecanoico y el acido estearico con un area de 61.8 y 59.9 respectivamente, una DS de 4.81 y 4.27 y un CV de 7% y 6%, respectivamente. En las 6 especies analizadas, E. coli presenta a nivel de Areas de los picos y tiempos de retención, los valores más altos, pero esta indica que esta bacteria representa un excelente material experimental por lo que respecta al analisis lipidico por cromatografía de gases, pues muestra una alta estabilidad de un analisis a otro. Esta propiedad puede ser aprovechada para empezar a analizar el efecto de las variables experimentales, que pueden cambiar cualitativa y cuantitativamente en la cromatografía de bacterias entericas.

El genero Enterobacter presenta al igual que Enterobacter como acido graso más abundante el heptadecanoico pero el último genero tiene una mayor abundancia y estabilidad en valores de area superior y CV menores. Enterobacter tiene gran abundancia del acido cis-9-hexadecanoico, mientras que E. coli el acido estearico tiene mayor area. En base en un analisis estadístico descriptivo, es posible ubicar a las 6 especies analizadas de una forma correcta en familia genero y especie sin que se presenten solapamientos en los valores de la figura 7 y 8, muestran que de las 6 especies, E. coli presenta la mayor cantidad de acidos grasos, con los mayores valores de area y los tiempos de retención más constantes, se establece de esta forma su valor como material experimental en este estudio. Las especies que más se aproximan a E. coli en abundancia de acidos grasos y estabilidad en el analisis cromatografico son E. freundii y Camalobacter, pero con valores de area menor y CV más altos en general. El grupo Enterobacter presenta entre 9 y 10 acidos grasos que definen su perfil cromatografico a diferencia de E. coli que presenta 12 acidos grasos Enterobacter que tiene de 11 a 13 tipos diferentes. Esto puede indicar que la mayor diversidad en la estructura lipidica de E. coli es en segundo lugar de E. freundii.

Los acidos grasos mas abundantes en las 6 especies aqui analizadas son C-15, C-16, C-14 y C-25, los de abundancia intermedia son C-17, C-10, C-19 y C-24, los de abundancia menor son C-11, C-3, C-8, C-12, C-22 y C-23.

En la actualidad, se realizan investigaciones en nuestro laboratorio respecto a la influencia de la variación de los medios de cultivo en el perfil de los acidos grasos de cinco especies de Escherichia, tres especies de Enterobacter y cuatro especies de Salmonella; en especial se usa el agua nutritivo (CAN), agar infusión cerebro corazón (BHI), medio de levadura, peptonina y glucosa (YPG), y medio mineral. Los resultados preliminares parecen indicar que un medio enriquecido como el BHI provoca una mayor diversidad de los acidos grasos, así como un

incremento en su área y medios mínimos como el mineral reducen la diversidad y área de los picos de los ácidos grasos.

En dos trabajos de tesis, se está analizando la influencia de la temperatura y de la concentración de sales en el medio, sobre la composición de ácidos grasos celulares en cinco especies de *Mycobacteria* y se ha determinado de forma preliminar que temperaturas en el intervalo de 20°C a 40°C causan una menor proporción de ácidos grasos insaturados y aumenta la cantidad de ácidos saturados, al bajar la temperatura en un intervalo de 20°C a 34°C , la cantidad de ácidos grasos monoinsaturados se incrementa. Respecto a la concentración de sales en el medio, se incrementan los ácidos grasos poliinsaturados en una relación directamente proporcional al incremento de sales y disminuye la cantidad de ácidos grasos monoinsaturados. Lo anterior nos lleva a elaborar la hipótesis de que estos factores pueden activar o inhibir sistemas enzimáticos a nivel lipídico.

Para llegar a determinar un método estándar en el análisis de lípidos, que se limite a las pruebas de rutina en el proceso de identificación y clasificación de bacterias, se deben analizar todos y cada uno de los factores que afectan el crecimiento en bacterias, como: tiempo, pH, concentración de sales, temperatura, nutrientes, concentración de gases, humedad, pH, temperatura, aerobiosis, fuerza iónica y presión osmótica, lo que limita en la actualidad la aplicación de este método para ser usado de igual manera en todos los laboratorios que se dedican a la taxonomía de bacterias por determinación de ácidos grasos celulares, mediante cromatografía de gas licuado, es que dichas investigaciones se están iniciando y los resultados no llegan aún a ser homogéneos (11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20).

Presencia o la ausencia o ausencia de los 14 picos de los ésteres metílicos de los ácidos grasos en las seis especies, encontramos que los picos 1, 2, 3, 4, 5, 10, 11, 12, 13, 14 y 15 son los que presentan variación en su porcentual, los restantes 6 picos están presentes en las seis especies con base en la tabla 4 se estableció la posible relación entre las seis especies mostrada en la figura 8, así *M. goodii* y *M. freundii* se encuentran relacionadas con un índice de semejanza de 0.80, el segundo grupo formado por *M. goodii* y *M. abscessus* presenta una relación de 0.50, finalmente *M. abscessus* y *M. goodii* se relacionan con un índice de semejanza de 0.50. Esta relación sólo denota criterios cualitativos de presencia o ausencia, pero en ningún momento evalúa las áreas de los picos de los ácidos grasos, es así que las relaciones generadas por esta técnica, empiezan a tener diferentes y especies del mismo género pueden quedar en grupos distintos, como es el caso de *Bacteroides* y *Haemophilus* y *Haemophilus* y *Haemophilus* que se relacionan por valores superiores a un índice de semejanza de 0.50, el caso de *M. abscessus* y *M. goodii* se relacionan por un índice de semejanza de 0.50, se desprende que la sola caracterización cualitativa de los ácidos grasos por bacteria con el fin de encontrar relaciones taxonómicas entre especies, se debe manejar con sumo cuidado, y en la mayoría de los casos es mejor recurrir a un análisis en el que a cada ácido graso del perfil cromatográfico, se le asigne su abundancia relativa, en términos de su área normalizada. De lo contrario se puede llegar a la conclusión de que *M. goodii* y *M. freundii* son las especies más

relacionadas ya que a nivel cualitativo, sus perfiles solo difieren en dos ácidos grasos.

En los dendrogramas, figura 9 y 10, se encuentra el mismo tipo de asociación, lo que indica una constancia en el agrupamiento de las seis especies. Al aplicar los índices de asociación en los que se tomó en cuenta el área normalizada de los ácidos grasos.

Así El lipídica y de estructura lipídica que se encuentran bien definidas como especies mu relacionadas, el grupo de Enterobacter, es el que presenta a nivel de nomenclaturas diferentes grados de asociación y las 3 especies no están tan íntimamente asociadas como en el caso de Citrobacter. En la literatura (16, 17, 18), se menciona que El grupo de Enterobacter que es la especie tipo, las otras dos aun presentan problemas en su ubicación taxonómica; ya que para su identificación se recurre a reacciones metabólicas en medios diferenciales, esta probable identificación preliminar debe complementarse con pruebas de estructura antigénica. Sin embargo, diversas cepas de Enterobacter poseen la misma actividad antigénica pero difieren en reacciones metabólicas distintas (19, 20). Por otra parte este tipo de bacterias producen una amplia variedad de recombinantes que se refleja en patrones superpuestos de metabolismo y antigénicos; cabe la posibilidad que el proceso antes descrito pueda alterar la composición de ácidos grasos, lo cual se intentará probar en nuestros laboratorios en un futuro cercano. Sin embargo, los trabajos recientes sustentan la hipótesis de que la estructura lipídica en bacterias, es lo bastante estable como para no poder ser alterada por los procesos antes descritos (4) (18) (21) (22) (23) (24).

Cabe concluir que a diferencia de Citrobacter, Enterobacter, es un grupo heterogéneo en lo que respecta a la abundancia de los ácidos grasos celulares. El g de esta queda bien definido y se separa como un grupo diferente de Citrobacter.

CONCLUSIONES

I - El análisis de los ésteres metílicos de los ácidos grasos celulares en bacterias, por el método de cromatografía de gas líquido, puede ser considerado como uno de los métodos más rápidos, altamente reproducibles y menos alterables, cuyos resultados son numéricamente procesados tanto a nivel de identificación como clasificación, con la restricción de que las condiciones de cultivo bacteriano y proceso cromatográfico deben estandarizarse.

II - El análisis de los lípidos bacterianos en este trabajo, no solo tienen su aplicación en el área quimiotaxonomía, sino también representa, hasta donde sabemos, el primer trabajo que pone de manifiesto la composición de los metil ésteres de los ácidos grasos celulares, en estas seis especies de enterobacterias, y contribuye al conocimiento de la composición de la flora bacteriana a nivel biotecnológico.

III - Los resultados de este estudio, muestran que las seis especies de enterobacterias contienen solo ácidos grasos de cadena de carbonos lineal saturada. Para la familia Enterobacteriaceae, el ácido palmítico es el de mayor abundancia, esta característica bioquímica distingue a las seis especies aquí analizadas de otras bacterias gram negativas como *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii*, *Acetivibrio fermentans* y *Yersinia enterocolitica* algunas ya puede ser usado como un método relativamente exacto para identificar a la familia Enterobacteriaceae. A nivel específico los cuatro ácidos grasos de menor peso son el ácido heptadecanoico, el ácido esteárico, el ácido isononadecanoico y el ácido mirístico y relativamente pueden ser los ácidos grasos que definen el nivel genérico específico de las seis organismos estudiados.

IV - Con base en la similitud de los perfiles de los ácidos grasos celulares, parece existir una relación muy cercana entre *Citrobacter amalonas* y *Yersinia*. Para el grupo de *Enterobacter*, *E. aggluticans* muestra poca relación con *E. aerogenes* y *E. cloacae*, se establece una diferencia en la composición de los ácidos grasos celulares, la composición en enterobacterias de los ácidos grasos es altamente específica, los análisis cualitativos y cuantitativos pueden ser adaptados en laboratorios simples y pueden ser un criterio adicional muy valioso para la diferenciación de especies enterobacterias relacionadas, y servir como un método rápido y altamente reproducible para rutinas de identificación a nivel clínico, sanitario, alimenticio y biotecnológico.

- 1 - Abel, J., H. de Scherizing, v. J. I. Pierson 1969. Classification of microorganisms by analysis of chemical composition. I. Feasibility of utilizing gas chromatography. J. Bacteriol. 95:139-144
- 2 - Alexander, A. D., E. F. Lessel, L. B. Evans, E. Frank, S. S. Green 1972. Preservation by liquid nitrogen refrigeration. Ing. J. Syst. Bacteriol. 20:165-169
- 3 - American Type Culture Collection (ATCC) 1982. Catalogue of strains
- 4 - Amstein, J. F., v. R. A. Hartman 1973. Differentiation of some enterococci by gas chromatography. J. Bacteriol. 112:39-41
- 5 - Bailey, N. T. J., ed. 1981. Statistical methods in biology, 2 ed., Hodder and Stoughton, Ltd., London.
- 6 - Bascom, S. 1981. Application of automation to the general and specific detection of bacteria. Lab. Invest. 45:530
- 7 - Bee, B. v. J. Verde 1981. Fatty acid patterns in the classification of some representative of the Families Enterobacteriaceae and Vibrionaceae. J. Gen. Microbiol. 116:41-48
- 8 - Boydfield, J. L., G. Smith, J. P. Landry, v. S. Hobbs 1983. Numerical analysis of fatty acid profiles in the identification of Gram-negative bacilli and some other bacteria. J. Gen. Microbiol. 115:364
- 9 - Brian, B. L., v. E. W. Gardner 1967. Preparation of bacterial fatty acid methyl esters for rapid characterization by gas liquid chromatography. Appl. Microbiol. 15:146-150
- 10 - Brian, B. L., v. E. W. Gardner 1968. A simple procedure for detecting the presence of long-chain fatty acids in bacterial lipids. Appl. Microbiol. 16:549-556
- 11 - Campbell, F. F., v. M. A. Pisano 1966. Gas-liquid chromatograph analysis of fatty acid methyl esters of *Aerobius hydrophila*, *Aerobius salina* and *Aerobius salinus*. J. Gen. Microbiol. 9:361-366
- 12 - Chernin, S. v. F. I. Terien 1969. Detection of *Escherichia coli* by gas chromatography. J. Biol. Chem. 244:1205-1206
- 13 - Cowson, E. H., I. Isaniana, S. Chinn, v. I. Phillips 1969. A qualitative and quantitative study of cellular fatty acids of *Streptococcus faecalis* with capillary gas chromatography. J. Gen. Microbiol. 125:291-296
- 14 - Cronan, J. E., Jr. 1975. Thermal regulation of the membrane lipid composition of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 250:7074-7077

- 15 - Davis, J.P., C.E. Stager, P.D. Wende, y S.M. Hussain Qadri. 1981. Clinical laboratory evaluation of the automatic system Enterobacteriaceae biochemical card J. Clin. Microbiol. 14: 370-375.
- 16 - Dees, S.B., D.G. Hollis, R.E. Weaver, y C.W. Moss. 1983. Cellular fatty acid composition of *Pseudomonas marginata* and closely associated bacteria. J. Clin. Microbiol. 16: 1073-1078.
- 17- Dees, S.B., y C.W. Moss. 1975. Cellular fatty acids of *Alcaligenes* and *Escherichia* species isolated from clinical specimens. J. Clin. Microbiol. 1: 414-419.
- 18 - Dees, S.B., y C.W. Moss. 1978. Identification of *Achromobacter* species by cellular fatty acids and by production of keto acids. J. Clin. Microbiol. 18: 1074-1078.
- 19 - Drucker, D.B. 1974. Chemotaxonomic fatty acid fingerprints. Geb. J. Microbiol. 20: 17-21.
- 20 - Drucker, D.B. 1981. Analysis of structural components of microorganisms by gas chromatography, p. 166-251. In D.B. Drucker (ed.), Microbiological applications of gas chromatography. Cambridge University Press, Cambridge.
- 21 - Drucker, D.B. 1981. Computation of gas chromatographic data, p. 400-423. In D.B. Drucker (ed.), Microbiological applications of gas chromatography. Cambridge University Press, Cambridge.
- 22 - Drucker, D.B., y J. Swain. 1975. Chemotaxonomic fatty acid fingerprints of bacterial growth with and without aeration. J. Gen. Microbiol. 13: 241-250.
- 23 - Edwards, P.F., y W.H. Ewing. 1962. Identification of Enterobacteriaceae. 2nd ed. Burgess Publishing Co. Minneapolis Minn.
- 24 - Eerola, E., y O.F. Lehtonen. 1988. Optimal data processing procedure for automatic bacterial identification by gas liquid chromatography of cellular fatty acids. J. Clin. Microbiol. 26: 1745-1753.
- 25 - Farmer III, J.J., H.F. Davis, F.W. Hickman, A. McWhorter, C. Eliaz, J.K. Fanning, A.S. Steingerwalt, G.M. O'Hara, B.V. Smith, y E.J. Brenner. 1987. Biochemical identification of new species and biogroups of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens. J. Clin. Microbiol. 25: 2145-2150.
- 26 - Felch, J.M., Loev, y D.G.H. Sloan-Stanley. 1967. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem. 246: 447-450.
- 27 - Gehre, G.W., y R.F. Goerlitz. 1963. Quantitative preparation of methyl esters of fatty acids for gas chromatography. Analyt. Chem. 35: 76-80.

- 28 - Gill, C O y J K Suisted 1978 The effects of temperature and growth rate on the proportion of unsaturated fatty acids in bacterial lipids. J. Clin. Microbiol. **5**:945-960
- 29 - Gonzalez, A M 1987 Fundamentos teóricos y principios de la cromatografía en fase de vapor. Proyecto de Conservación y Mejoramiento del Ambiente (CYMA). FNER. Iztacala, UNAM. Mexico (Publicación de distribución restringida)
- 30 - Goodfellow, M. y R S Beard 1987 Microbiological Classification and Identification. Acad. Press, London
- 31 - Goodfellow, M. y Minnikin, D E 1985 Introduction to chemosystematics. In: Chemical Methods in Bacterial Systematics, p. 1-15. Edited by M. Goodfellow & D E Minnikin. London & New York, Academic Press
- 32 - Goodwin, S G, W M Connell, P E Mc Culloch, J H Mc Culloch, R Hill, M A Brinkley, von Kupper 1989 Cellular fatty acid composition of Camphobacter pyleri from primates and ferrets compared with those of other Campylobacter. J. Clin. Microbiol. **5**:945-948
- 33 - Guarrant, J C, M A Lambert, y W Moss 1987 Analysis of short-chain acids from anaerobic bacteria by high performance liquid chromatography. J. Clin. Microbiol. **15**:495-500
- 34 - Hurst, M J, y A I James 1980 Fatty acids, p. 18-88. In Lipid biochemistry and introduction. Chapman & Hall, New York
- 35 - Hausler, J 1987 Determination of the organic acids content by gas chromatography as a rapid and accurate identification method for bacteria. V. Curso-Seminario Internacional sobre Biología de la Contaminación. Memorial. UNAM, SEDUE, UPN. Mexico
- 36 - Hausler, J 1987 Identification of indicators of fecal pollution by Enterobacteriaceae using gas chromatography. V. Curso-Seminario Internacional sobre Biología de la Contaminación. Memorial. UNAM, SEDUE, UPN. Mexico
- 37 - Hausler, J, y Pionter, V 1987a A process of identification microorganism using chromatography. UK Patent Application GB 2 121-444 A
- 38 - Hausler, J, y Pionter, V 1987b Identification of bacteria 12 the International Symposium on Microbiol. Association and interaction in food. Publishing House of the Hungarian Academy of Sciences, Budapest
- 39 - Healy, P J 1971 Preservation of bacteria by lyophilization. Advances in Appl. Microbiol. 2 ed. by W Umbreit. Academic Press
- 40 - Henis, Y, J P Gould y M Alexander 1966 Detection and identification of bacteria by gas chromatography. Appl. Microbiol. **14**:513-524

- 41 - Holmes, B., W. K. Willcox, & S. F. Lajage. 1978. Identification of Enterobacteriaceae by the API 20E System. J. Clin. Pathol. 31:22-30.
- 42 - James, A. T. & A. J. Martin. 1956. Gas-liquid chromatography: The separation and identification of the methyl esters of saturated and unsaturated acids from formic acid to n-octadecanoic acid. Biochem. J. 63:144-150.
- 43 - Janzen, E. 1984. Analysis of cellular components in bacterial classification and diagnosis. p. 257-302. In G. Odham, I. Larson, and P. A. March (ed.), Gas chromatography-mass spectrometry applications in microbiology. Plenum Publishing Corp., New York.
- 44 - Janze, E., K. Bergan, & J. Bevre. 1974. Gas chromatography of whole cell methanolyzates. V. Fatty acid composition of Neisseria and Moraxella. Acta Pathol. Microbiol. Scand. 82:107-112.
- 45 - Janzen, E., E. Bevre, T. Bergan, & J. Bevre. 1975. Gas chromatography of whole cell methanolyzates. VII. Fatty acid composition of Acinetobacter in relation to the taxonomy of Neisseriaceae. Acta Pathol. Microbiol. Scand. 83:509-516.
- 46 - Janeda, I. 1967. Fatty acids in the genus Bacillus. I. Isotana anteiso fatty acids as characteristic constituents of lipid in 10 species. J. Bacteriol. 91:894-895.
- 47 - Krieg, N. R. (Editor). 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 9th ed., Vol. 1. Williams & Wilkins.
- 48 - Lambert, M. A., & L. W. Moss. 1988. Composition of the effects of acid and base hydrolyses on hydroxy and cyclopropane fatty acids in bacteria. J. Clin. Microbiol. 18:1970-1977.
- 49 - Lajage, S. P., & J. F. Shelton. 1970. Culture collection and the preservation of bacteria. In Methods in Microbiology, Edited by J. R. Norris and W. Ribbons. Academic Press.
- 50 - Lechevalier, M. P. 1982. Lipids in bacterial taxonomy. p. 489-509. In I. Lastin and H. A. Lechevalier (eds), CRC handbook of microbiology, 2nd ed., Vol. 4. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
- 51 - Newman, J. S., & J. Brian, K. J. 1978. Gas chromatographic test for coliform bacteria in water. Appl. Microbiol. 36:584-588.
- 52 - Mayer, H. 1984. Significance of lipopolysaccharide structure for questions of taxonomy and phylogenetical relatedness of Gram negative bacteria. p. 71-82. In E. Haber (ed.), The cell membrane. Plenum Publishing Corp., New York.
- 53 - Mc Elinavey, P. N. 1970. The biochemical significance of alterations in the fatty acid composition of microbial membrane lipids in response to changes in environmental temperature. In Extreme Environments: Mechanisms of Microbial Adaptation, p. 255-281. Edited by H. P. Heinrich. New York: Academic Press.

- 54 - Mc Garrity, J T & Armstrong, J B 1981 The effect of temperature and other growth conditions on the fatty acid composition of *Escherichia coli*. *J. Microbiol.* **21**, 835-840.
- 55 - Metcalfe, L D, A A Schultiz & J R Pella 1966 Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatography. *Analysis*. *Chem.* **98**, 514-515.
- 56 - Mittra, B M & M Alexander 1968 Rapid and sensitive detection of bacteria by gas chromatography. *APPL. MICROBIOL.* **16**, 6-64.
- 57 - Mittra, B M, A M Dasgupta & S. Kundari 1973 Rapid differentiation of certain bacteria in mixed populations by gas-liquid chromatography. *Yale. J. Biol. and Med.* **48**, 104-112.
- 58 - Montecilla Sanchez, M 1988 Cellular fatty acid composition of *Lelelya halophila*: effect of growth temperature and salt concentration. *J. Gen. Microbiol.* **132**, 196-203.
- 59 - Moss, C W, & S B Dees 1975 Identification of microorganisms by gas chromatographic-mass spectrometric analysis of cellular fatty acids. *J. Chromatogr.* **112**, 595-604.
- 60 - Moss, C W, & S B Dees 1978 Cellular fatty acids and metabolic products of *Pseudomonas* species obtained from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* **4**, 492-502.
- 61 - Moss, C W, S B Dees, & S D Guerrant 1980 Gas-liquid chromatography of bacterial fatty acids with a fused-silica capillary column. *J. Clin. Microbiol.* **10**, 127-131.
- 62 - Moss, C W, Lambert, M A & Merwin, W H 1974 Comparison of rapid methods for analysis of bacterial fatty acids. *APPL. MICROBIOL.* **28**, 9-19.
- 63 - Moss, C W, & L. Nuffe-Montiel 1982 Analysis of short-chain acids from bacteria by gas-liquid chromatography with a fused-silica capillary column. *J. Clin. Microbiol.* **15**, 309-311.
- 64 - Moss, C W, I Shinoda, & J W Samuels 1982 Determination of cellular fatty acid compositions of various yeasts by gas-liquid chromatography. *J. Clin. Microbiol.* **16**, 1073-1079.
- 65 - Moss, J W, P J Wallace, P R Hollis, V F E Weaver 1988 Cultural and chemical characterization of *CND* groups E-6, M-5, and M-6, *Moraxella* species, *Acetivibrio*, *Aerobacter* species, and *Escherichia*. *Microbiol. J. Clin. Microbiol.* **26**, 494-492.
- 66 - Pizzol, A P, H Korkeala, & J Mononen 1987 Gas chromatographic analysis of cellular fatty acids and neutral monosaccharides in the identification of lactobacilli. *APPL. Environ. Microbiol.* **52**, 2993-2995.
- 67 - Pubin, S J, P A Granato, & B L Wasilianas 1985 Glucose-fermenting Gram-negative bacteria, p. 380-372. In E.H. Lennette, A. Balows, W J Hausler, Jr., & H J Shadomy (ed).

Manual of clinical microbiology. 4 ed. American Society for Microbiology. Washington, D.C.

68 - Schliefer, K.H. y E. Stackebrandt. 1983. Molecular systematics of Prokaryotes. Ann. Rev. Microbiol. 37:143-171.

69 - Shaw, N. 1974. Lipid composition as a guide to the classifications of bacteria. Advanced and Appl. Microbiol. 12:63-108.

70 - Simpson, M. 1971. Temperature control of phospholipid biosynthesis in Escherichia coli. J. Bacteriol. 106:449-445.

71 - Sherman, V.B.D., McJovan, V. y Sheath, P.H.A. 1990. Approved list of bacterial names. J. Gen. Microbiol. 36:425-430.

72 - Starr, M.P., H. Stolp, H.G. Trilipper, A. Baltes y G.H. Schlegel. Editors. 1981. The prokaryotes: A Handbook on habitats, isolation and identification of bacteria. Springer-Verlag.

73 - Suzuki, K.I. y K. Komagata. 1983. Taxonomic significance of cellular fatty acid composition in some corynebacterium bacteria. Int. J. Syst. Bacteriol. 33:199-200.

74 - Tomabene, T.S. 1985. Lipid analysis and the relationship to chemotaxonomy. Metb. Microbiol. 7:1539-1542.

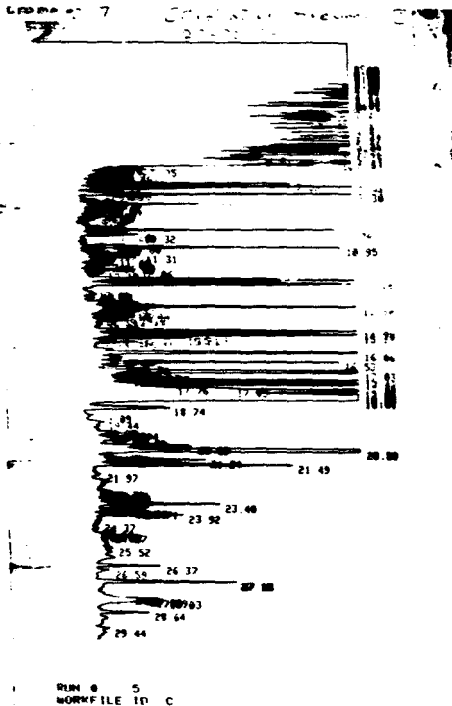
75 - Veys, A., W. Dillenaert, E. Waelkens y K.V. Abbeele. 1989. Application of gas-liquid chromatography to the routine identification of nonfermenting Gram-negative bacteria in clinical specimens. J. Gen. Microbiol. 7:1598-1642.

76 - Zar, J.H. 1974. Biostatistical Analysis. Prentice-Hall USA.

A P P E N D I C E

EL SISTEMA CALIENTE DEL ESTANQUE DE LOS ACIDOS GRASOS
ELIMINÓ DE ENTEROBACTERIAS. LA SEPARACION FUE REALIZADA EN UNA
COLUMNA CAPILAR DE SILICONEFUNDIDA. LAS CONDICIONES FUERON
DEBITAS EN METROS.

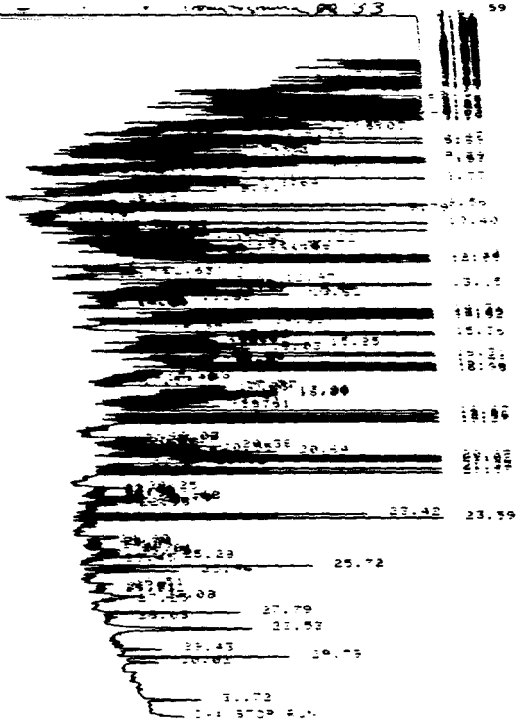
OF 2000 + 4000. THE SEPARATION OF THE 2000 + 4000 FROM THE 1000 + 1000 OF THE 2000 + 4000 WAS REALIZED IN ONE COLUMN WITH THE USE OF THE 2000 + 4000. THE CONDITIONS WERE DESCRIBED IN THE



RUN 8 5
WORWILE ID C

AREA:

AREA	TYPE	NR/HT	NR/HT	NR/HT
2 00	1570 D BP	0 000	0 000	0 000
04	11371 PH	0 014	0 014	0 014
06	1383 HP	0 012	0 012	0 012
10	8864 PH	0 024	0 024	0 024
15	30106 HH	0 016	0 016	0 016



DATA 05004 TRIAL INJECTION # 13116 NOV 19, 1967

RT	AREA	TYPE	AREA %
15.00			
15.72			
21.53			
27.79			
28.43			
31.72			

1.55			
2.55			
3.55			
4.00			
4.90			
5.5			
7.40			
8.24			
9.57			
10.41			
11.90			
12.06			
17.10			
18.92			
14.454.31			
15.36			
15.35			
16.98			
16.30			
16.95			
18.06			
19.23			
20.88			
21.01			
23.93			
25.73			
27.06			
27.90			
29.43			
31.72			

OUT STOP RUN

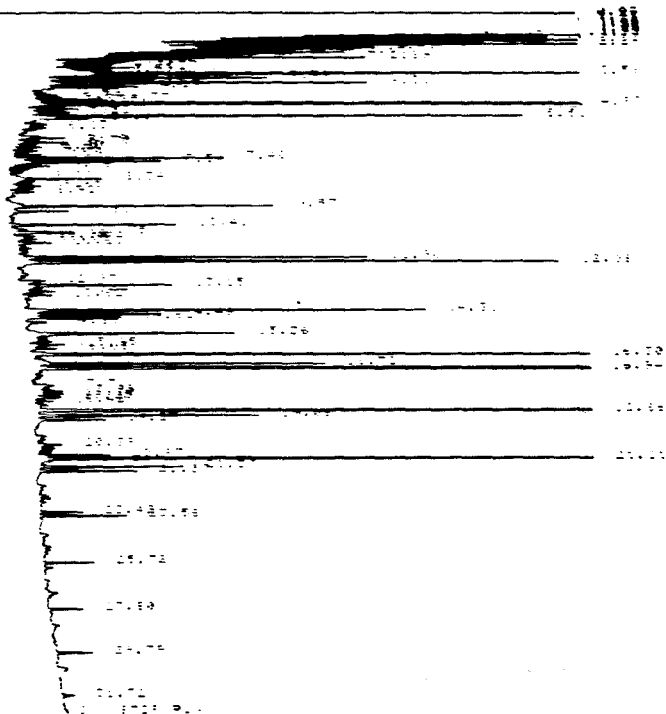
END 5890A MANUAL INJECTION @ 14:34 NOV 18, 1967

AREA %

RT AREA TYPE AREA %

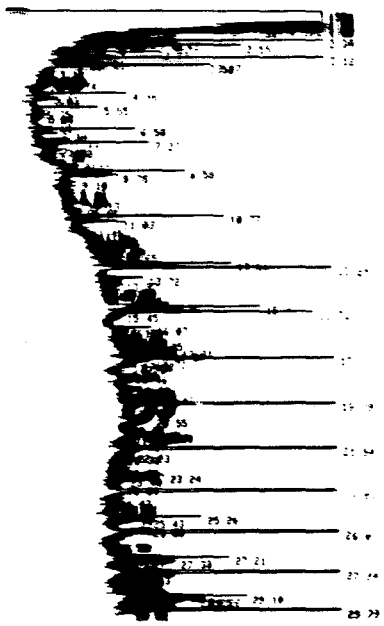
Cromatogram 8A 35 18-NOV-87

61



442 7204 ANAL. INJECTION * 18187 NOV 18, 1987

AREA 1

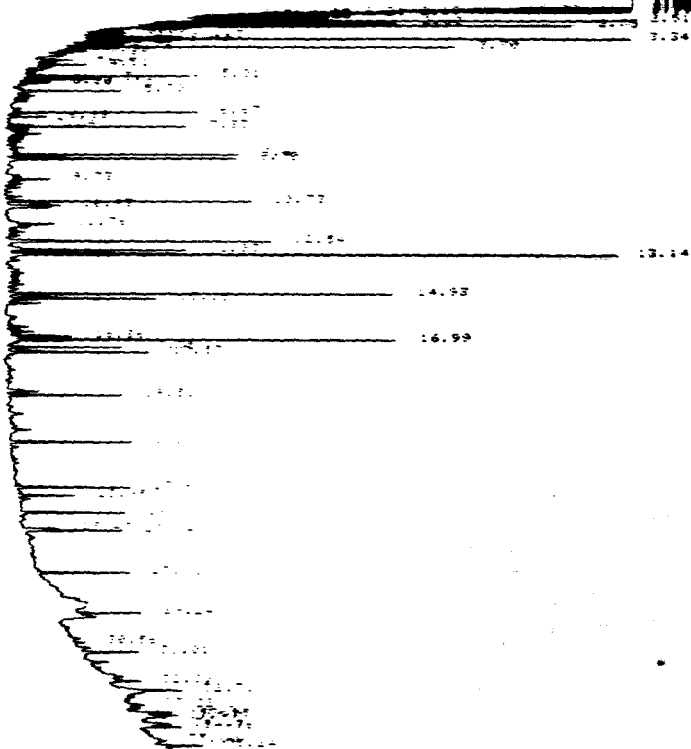


RUN # 3
 WORKFILE ID #
 WORD# NAME

AREA#	DT	AREA	TYPE	WRT/MT	AREA#
0	97	09563E	+07	TBRH	0 021
0	99	37441	200	S+H	0 004
1	02	28581	100	S+H	1 053
1	04	0940800	+50E	S+H	0 000
1	04	0940800	+50E	S+H	0 016
1	07	29146	TBRH	S	0 006
1	07	29677	DT+H	A	0 004

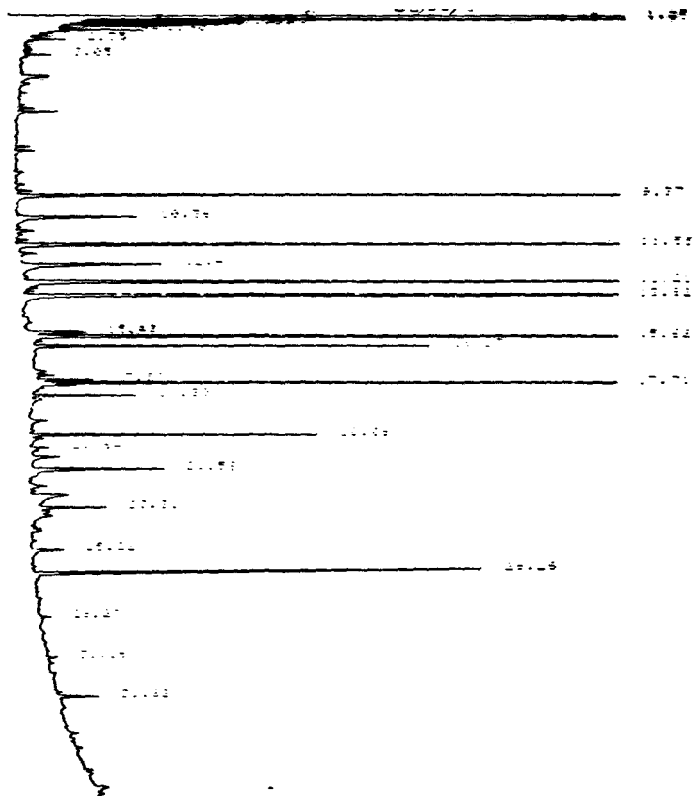
C. amalotat...

07/04/97 "

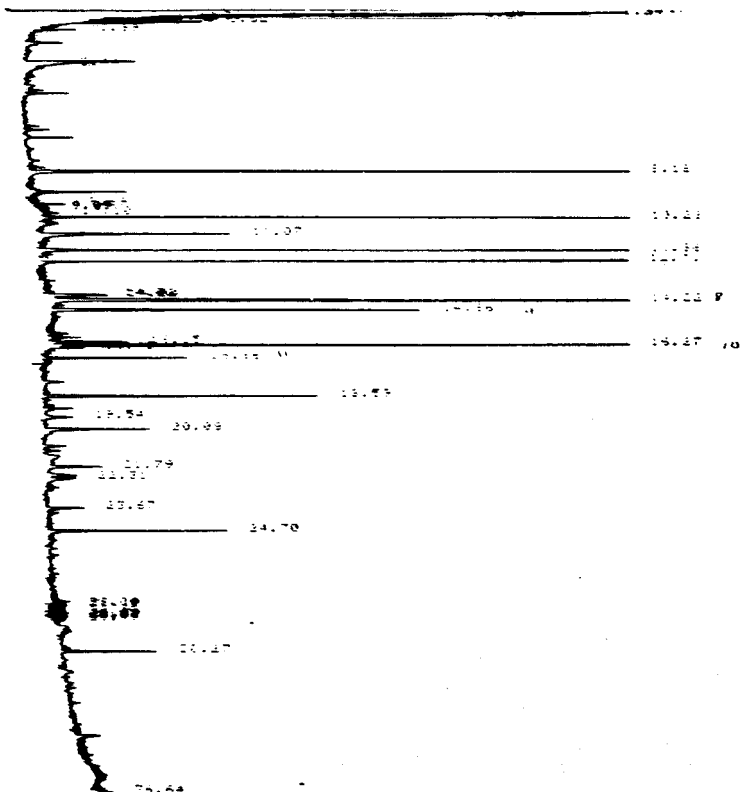


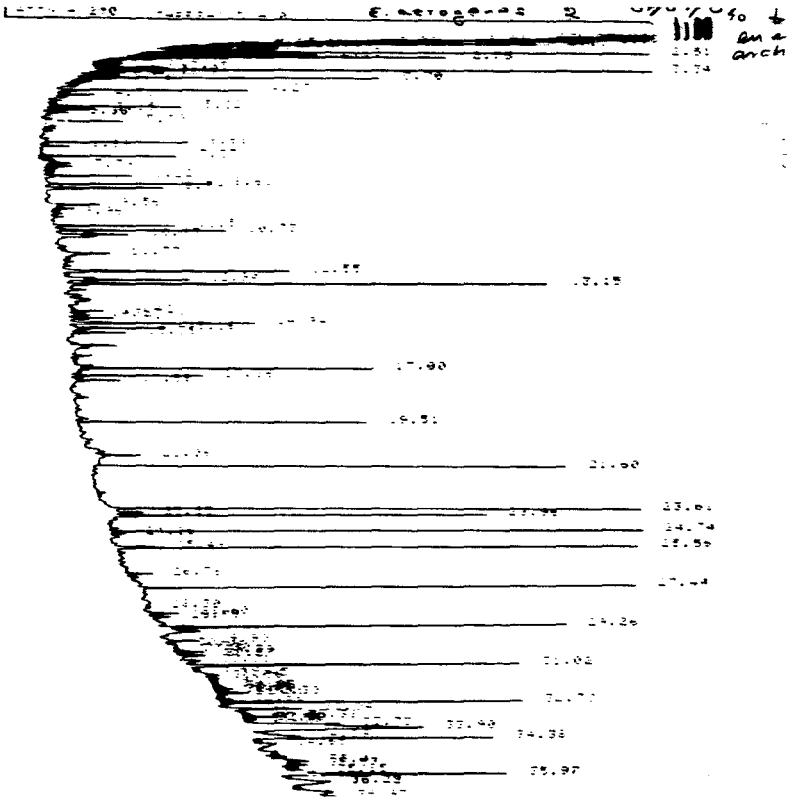
10.57	10.57	
11.70	11.70	5.14
12.4	12.4	5.67
13.33	13.33	
14.99	14.99	2.9175
16.72	16.72	
18.50	18.50	10.73
20.32	20.32	11.73
22.15	22.15	12.55
24.00	24.00	13.34
25.85	25.85	14.15
27.72	27.72	14.95
29.60	29.60	15.75
31.50	31.50	16.55
33.42	33.42	17.35
35.35	35.35	18.15
37.30	37.30	18.95
39.27	39.27	19.75
41.26	41.26	20.55
43.27	43.27	21.35
45.30	45.30	22.15
47.35	47.35	22.95
49.42	49.42	23.75
51.50	51.50	24.55
53.60	53.60	25.35
55.72	55.72	26.15
57.85	57.85	26.95
60.00	60.00	27.75
62.17	62.17	28.55
64.35	64.35	29.35
66.55	66.55	30.15
68.77	68.77	30.95
71.00	71.00	31.75
73.25	73.25	32.55
75.52	75.52	33.35
77.80	77.80	34.15
80.10	80.10	34.95
82.42	82.42	35.75
84.75	84.75	36.55
87.10	87.10	37.35
89.47	89.47	38.15
91.85	91.85	38.95
94.25	94.25	39.75
96.67	96.67	40.55
99.10	99.10	41.35
101.55	101.55	42.15
104.02	104.02	42.95
106.50	106.50	43.75
109.00	109.00	44.55
111.52	111.52	45.35
114.05	114.05	46.15
116.60	116.60	46.95
119.17	119.17	47.75
121.75	121.75	48.55
124.35	124.35	49.35
126.97	126.97	50.15
129.60	129.60	50.95
132.25	132.25	51.75
134.92	134.92	52.55
137.60	137.60	53.35
140.30	140.30	54.15
143.02	143.02	54.95
145.75	145.75	55.75
148.50	148.50	56.55
151.27	151.27	57.35
154.05	154.05	58.15
156.85	156.85	58.95
159.67	159.67	59.75
162.50	162.50	60.55
165.35	165.35	61.35
168.22	168.22	62.15
171.10	171.10	62.95
174.00	174.00	63.75
176.92	176.92	64.55
179.85	179.85	65.35
182.80	182.80	66.15
185.77	185.77	66.95
188.75	188.75	67.75
191.75	191.75	68.55
194.77	194.77	69.35
197.80	197.80	70.15
200.85	200.85	70.95
203.92	203.92	71.75
207.00	207.00	72.55
210.10	210.10	73.35
213.22	213.22	74.15
216.35	216.35	74.95
219.50	219.50	75.75
222.67	222.67	76.55
225.85	225.85	77.35
229.05	229.05	78.15
232.27	232.27	78.95
235.50	235.50	79.75
238.75	238.75	80.55
242.02	242.02	81.35
245.30	245.30	82.15
248.60	248.60	82.95
251.92	251.92	83.75
255.25	255.25	84.55
258.60	258.60	85.35
262.00	262.00	86.15
265.42	265.42	86.95
268.85	268.85	87.75
272.30	272.30	88.55
275.77	275.77	89.35
279.25	279.25	90.15
282.75	282.75	90.95
286.27	286.27	91.75
289.80	289.80	92.55
293.35	293.35	93.35
296.92	296.92	94.15
300.50	300.50	94.95
304.10	304.10	95.75
307.72	307.72	96.55
311.35	311.35	97.35
315.00	315.00	98.15
318.67	318.67	98.95
322.35	322.35	99.75
326.05	326.05	100.55
329.77	329.77	101.35
333.50	333.50	102.15
337.25	337.25	102.95
341.02	341.02	103.75
344.80	344.80	104.55
348.60	348.60	105.35
352.42	352.42	106.15
356.25	356.25	106.95
360.10	360.10	107.75
364.00	364.00	108.55
367.92	367.92	109.35
371.85	371.85	110.15
375.80	375.80	110.95
379.77	379.77	111.75
383.75	383.75	112.55
387.75	387.75	113.35
391.77	391.77	114.15
395.80	395.80	114.95
399.85	399.85	115.75
403.92	403.92	116.55
408.00	408.00	117.35
412.10	412.10	118.15
416.22	416.22	118.95
420.35	420.35	119.75
424.50	424.50	120.55
428.67	428.67	121.35
432.85	432.85	122.15
437.05	437.05	122.95
441.27	441.27	123.75
445.50	445.50	124.55
449.75	449.75	125.35
454.02	454.02	126.15
458.30	458.30	126.95
462.60	462.60	127.75
466.92	466.92	128.55
471.25	471.25	129.35
475.60	475.60	130.15
480.00	480.00	130.95
484.42	484.42	131.75
488.85	488.85	132.55
493.30	493.30	133.35
497.77	497.77	134.15
502.25	502.25	134.95
506.75	506.75	135.75
511.27	511.27	136.55
515.80	515.80	137.35
520.35	520.35	138.15
524.92	524.92	138.95
529.50	529.50	139.75
534.10	534.10	140.55
538.72	538.72	141.35
543.35	543.35	142.15
548.00	548.00	142.95
552.67	552.67	143.75
557.35	557.35	144.55
562.05	562.05	145.35
566.77	566.77	146.15
571.50	571.50	146.95
576.25	576.25	147.75
581.02	581.02	148.55
585.80	585.80	149.35
590.60	590.60	150.15
595.42	595.42	150.95
600.25	600.25	151.75
605.10	605.10	152.55
610.00	610.00	153.35
614.92	614.92	154.15
619.85	619.85	154.95
624.80	624.80	155.75
629.77	629.77	156.55
634.75	634.75	157.35
639.75	639.75	158.15
644.77	644.77	158.95
649.80	649.80	159.75
654.85	654.85	160.55
659.92	659.92	161.35
665.00	665.00	162.15
670.10	670.10	162.95
675.22	675.22	163.75
680.35	680.35	164.55
685.50	685.50	165.35
690.67	690.67	166.15
695.85	695.85	166.95
701.05	701.05	167.75
706.27	706.27	168.55
711.50	711.50	169.35
716.75	716.75	170.15
722.02	722.02	170.95
727.30	727.30	171.75
732.60	732.60	172.55
737.92	737.92	173.35
743.25	743.25	174.15
748.60	748.60	174.95
754.00	754.00	175.75
759.42	759.42	176.55
764.85	764.85	177.35
770.30	770.30	178.15
775.77	775.77	178.95
781.25	781.25	179.75
786.75	786.75	180.55
792.27	792.27	181.35
797.80	797.80	182.15
803.35	803.35	182.95
808.92	808.92	183.75
814.50	814.50	184.55
820.10	820.10	185.35
825.72	825.72	186.15
831.35	831.35	186.95
837.00	837.00	187.75
842.67	842.67	188.55
848.35	848.35	189.35
854.05	854.05	190.15
859.77	859.77	190.95
865.50	865.50	191.75
871.25	871.25	192.55
877.02	877.02	193.35
882.80	882.80	194.15
888.60	888.60	194.95
894.42	894.42	195.75
900.25	900.25	196.55
906.10	906.10	197.35
912.00	912.00	198.15
917.92	917.92	198.95
923.85	923.85	199.75
929.80	929.80	200.55
935.77	935.77	201.35
941.75	941.75	202.15
947.75	947.75	202.95
953.77	953.77	203.75
959.80	959.80	204.55
965.85	965.85	205.35
971.92	971.92	206.15
978.00	978.00	206.95
984.10	984.10	207.75
990.22	990.22	208.55
996.35	996.35	209.35
1002.50	1002.50	210.15
1008.67	1008.67	210.95
1014.85	1014.85	211.75
1021.05	1021.05	212.55
1027.27	1027.27	213.35
1033.50	1033.50	214.15
1039.75	1039.75	214.95
1046.02	1046.02	215.75
1052.30	1052.30	216.55
1058.60	1058.60	217.35
1064.92	1064.92	218.15
1071.25	1071.25	218.95
1077.60	1077.60	219.75
1084.00	1084.00	220.55
1090.42	1090.42	221.35
1096.85	1096.85	222.15
1103.30	1103.30	222.95
1109.77	1109.77	223.75
1116.25	1116.25	224.55
1122.75	1122.75	225.35
1129.27	1129.27	226.15
1135.80	1135.80	226.95
1142.35	1142.35	227.75
1148.92	1148.92	228.55
1155.50	1155.50	229.35
1162.10	1162.10	230.15
1168.72	1168.72	230.95
1175.35	1175.35	231.75
1182.00	1182.00	232.55
1188.67	1188.67	233.35
1195.35	1195.35	234.15
1202.05	1202.05	234.95
1208.77	1208.77	235.75
1215.50	1215.50	236.55
1222.25	1222.25	237.35
1229.02	1229.02	238.15
1235.80	1235.80	238.95
1242.60	1242.60	239.75
1249.42	1249.42	240.55
1256.25	1256.25	241.35
1263.10	1263.10	242.15
1270.00	1270.00	242.95
1276.92	1276.92	243.75
1283.85	1283.85	244.55
1290.80	1290.80	245.35
1297.77	1297.77	246.15
1304.75	1304.75	246.95
1311.75	1311.75	247.75
1318.77	1318.77	248.55
1325.80	1325.80	249.35
1332.85	1332.85	250.15
1339.92	1339.92	250.95
1347.00	1347.00	251.75
1354.10	1354.10	252.55
1361.22	1361.22	253.35
1368.35	1368.35	254.15
1375.50	1375.50	254.95
1382.67	1382.67	255.75
1389.85	1389.85	256.55
1397.05	1397.05	257.35
1404.27	1404.27	258.15
1411.50	1411.50	258.95
1418.75	1418.75	259.75
1426.02	1426.02	260.55
1433.30	1433.30	261.35
1440.60	1440.60	262.15
1447.92	1447.92	262.95
1455.25	1455.25	263.75
1462.60	1462.60	264.55
1470.00	1470.00	265.35
1477.42		

LA FORMA DE LA MOLECULA DE LOS ACIDOS GRASOS DERIVADOS DE
ESTEROS Y DEL ANESTESICO LA SEPARACION FUE REALIZADA EN UNA COLUMNA
CONTIENE EL ALCOHOL PORQUE LAS MOLECULAS FUERON DESCRITAS EN
MÉTRICO.



4
3
4

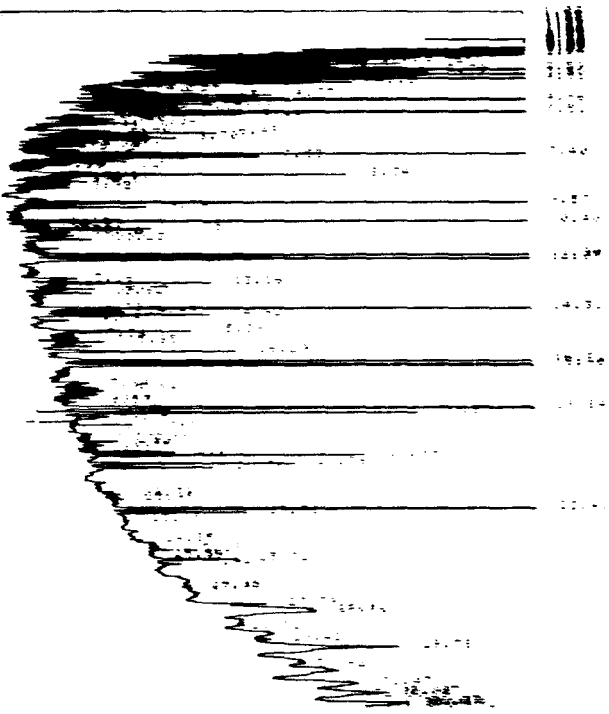




RUN 0 3
 WORKFILE 10 C
 WORKFILE -NONE

AREA	TIME	TYPE	NO	FILE
01	1550	BP	0 023	0 105
2 02	565	PV	0 014	0 045
2 08	1517	VP	0 024	0 122
2 13	1295	PV	0 015	0 103
2 16	2517	VV	0 023	0 092
2 20	1621	VV	0 027	0 138
2 25	2008	PV	0 038	0 225
2 31	26184	VV	0 019	0 100
2 37	1874	VV	0 011	0 041
2 43	5534	VV	0 023	0 047
2 49	700	VV	0 029	0 077
2 54	3267	VV	0 014	0 063
2 59	590	VV	0 013	0 042
2 56	296	VV	0 020	0 054
2 56	296	VV	0 033	0 104
2 57	907	VV	0 030	0 073
2 52	680	VV	0 038	0 124
2 58	4487	VP	0 021	0 054
2 51	357	VV	0 019	0 059
2 57	870	VP	0 030	0 070
3 04	2777	PV	0 042	0 227
3 18	318	VP	0 017	0 062
3 14	114200	00	0 020	0 072

DE LAS FIBRAS SINTÉTICAS DE LOS ÁCIDOS GRASOS DERIVADOS DE
BUTIRATO DE CALCIUM. LA SEPARACIÓN FUE REALIZADA EN UNA
COLUMNA CONDICAS DE 11 DE DIAMETRO. LA CANTIDAD DEL PRODUCTO
OBTENIDO ES DEL 100%.



**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

ESTE LIBRO HA SIDO DEPOSITADO EN LA BIBLIOTECA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA, EN VIRTUD DE LA LEY 11.723, EN SU ARTÍCULO 1.º, EN LA FECHA DE 1958. EL LIBRO HA SIDO DEPOSITADO EN LA BIBLIOTECA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA, EN VIRTUD DE LA LEY 11.723, EN SU ARTÍCULO 1.º, EN LA FECHA DE 1958.

1 Okawa

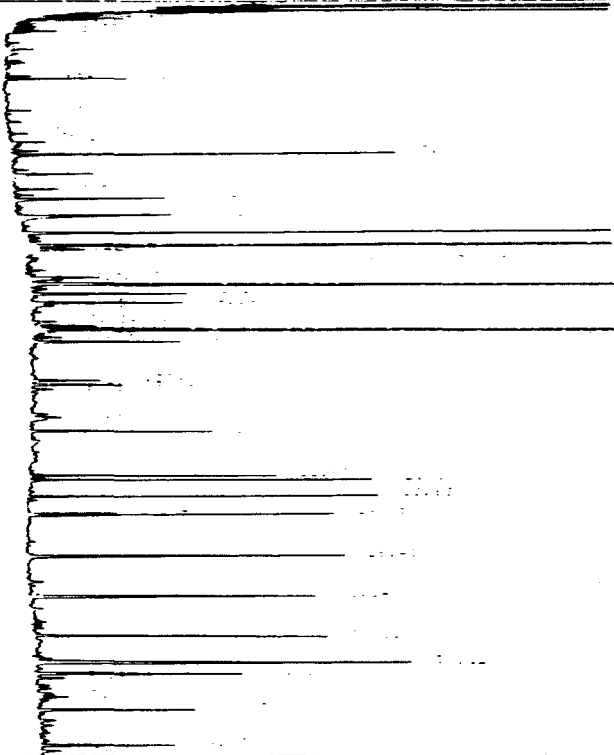
73-11

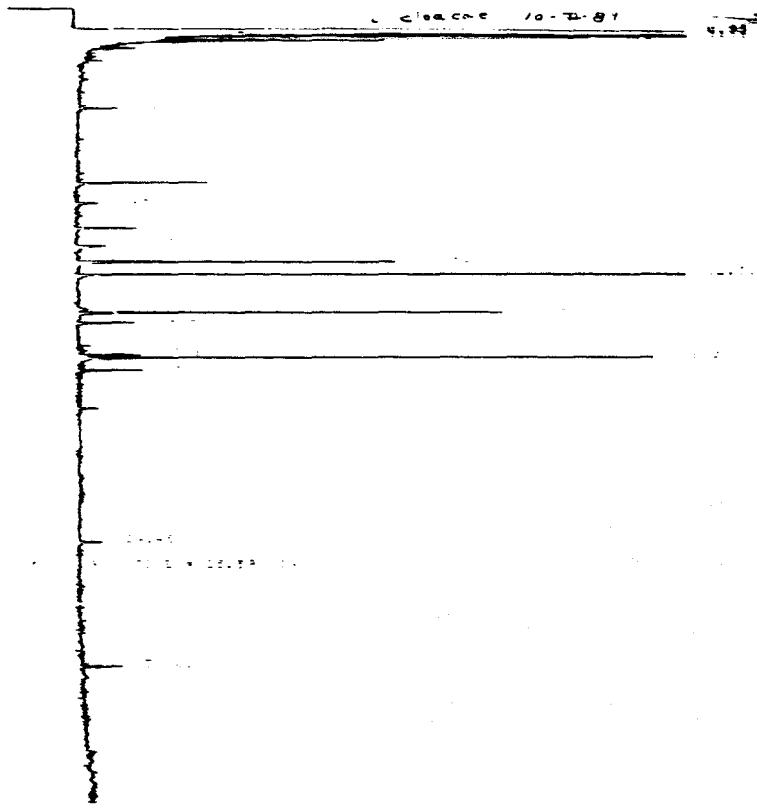
Case 78

80

11:23

100

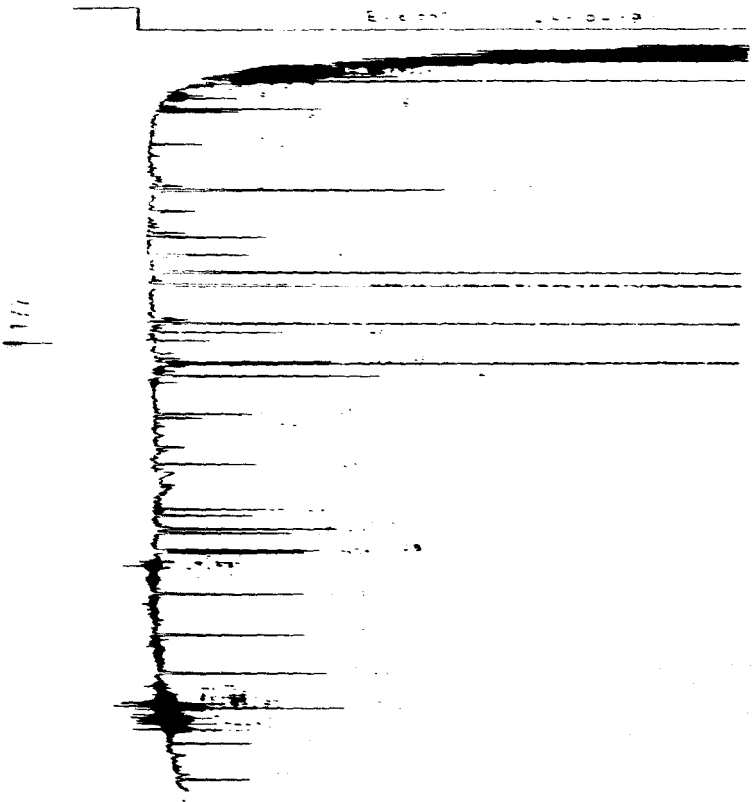




Electro

11-01-91

4
2
1



1
1
1

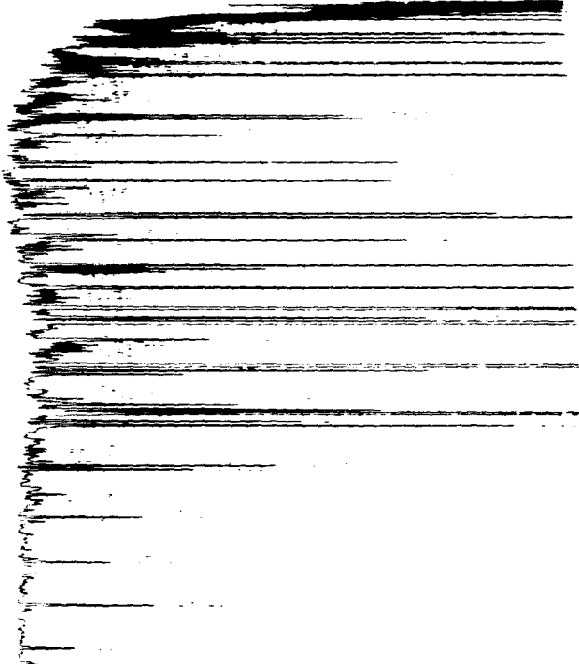
2
2

A

CROSS

Country can 25
~~28~~ ~~33~~ E
A

25-10-87



1111

100-100000-25

E. clausae 3

25. Nov. 1974



095

THE NATIONAL ARCHIVES COLLECTOR'S GUIDE TO THE RECORDS OF THE NATIONAL ARCHIVES

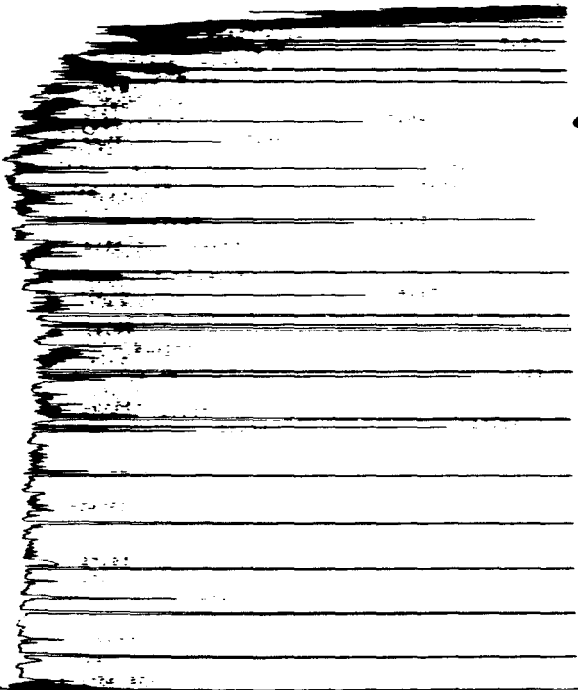
17 1974 1974 1974

CRON 24

Cromatogram 27

3 1 2

25 - No. 87



CROM 32

29 JUN 64-69

(14)

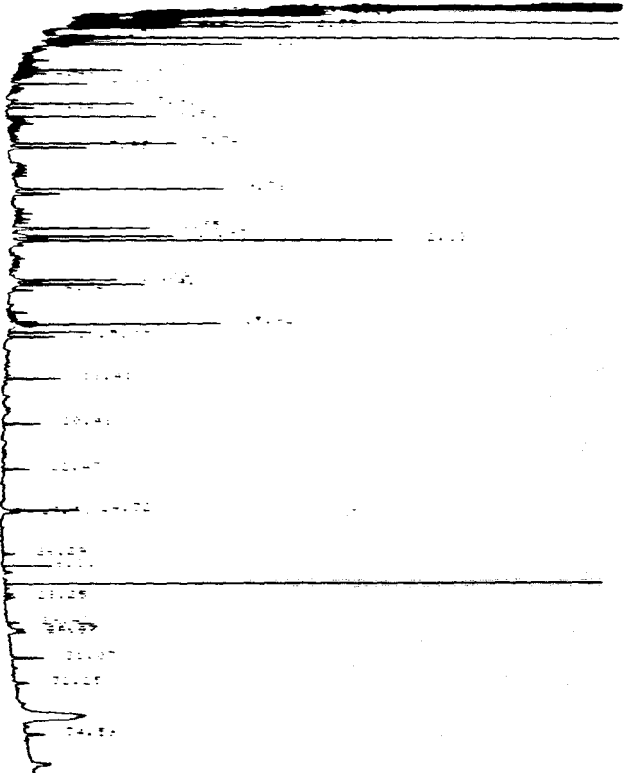
DATE	DESCRIPTION	AMOUNT
1964		
1965		
1966		
1967		
1968		
1969		
1970		
1971		
1972		
1973		
1974		
1975		
1976		
1977		
1978		
1979		
1980		
1981		
1982		
1983		
1984		
1985		
1986		
1987		
1988		
1989		
1990		
1991		
1992		
1993		
1994		
1995		
1996		
1997		
1998		
1999		
2000		
2001		
2002		
2003		
2004		
2005		
2006		
2007		
2008		
2009		
2010		
2011		
2012		
2013		
2014		
2015		
2016		
2017		
2018		
2019		
2020		
2021		
2022		
2023		
2024		
2025		
2026		
2027		
2028		
2029		
2030		
2031		
2032		
2033		
2034		
2035		
2036		
2037		
2038		
2039		
2040		
2041		
2042		
2043		
2044		
2045		
2046		
2047		
2048		
2049		
2050		
2051		
2052		
2053		
2054		
2055		
2056		
2057		
2058		
2059		
2060		
2061		
2062		
2063		
2064		
2065		
2066		
2067		
2068		
2069		
2070		
2071		
2072		
2073		
2074		
2075		
2076		
2077		
2078		
2079		
2080		
2081		
2082		
2083		
2084		
2085		
2086		
2087		
2088		
2089		
2090		
2091		
2092		
2093		
2094		
2095		
2096		
2097		
2098		
2099		
2100		
2101		
2102		
2103		
2104		
2105		
2106		
2107		
2108		
2109		
2110		
2111		
2112		
2113		
2114		
2115		
2116		
2117		
2118		
2119		
2120		
2121		
2122		
2123		
2124		
2125		
2126		
2127		
2128		
2129		
2130		
2131		
2132		
2133		
2134		
2135		
2136		
2137		
2138		
2139		
2140		
2141		
2142		
2143		
2144		
2145		
2146		
2147		
2148		
2149		
2150		
2151		
2152		
2153		
2154		
2155		
2156		
2157		
2158		
2159		
2160		
2161		
2162		
2163		
2164		
2165		
2166		
2167		
2168		
2169		
2170		
2171		
2172		
2173		
2174		
2175		
2176		
2177		
2178		
2179		
2180		
2181		
2182		
2183		
2184		
2185		
2186		
2187		
2188		
2189		
2190		
2191		
2192		
2193		
2194		
2195		
2196		
2197		
2198		
2199		
2200		
2201		
2202		
2203		
2204		
2205		
2206		
2207		
2208		
2209		
2210		
2211		
2212		
2213		
2214		
2215		
2216		
2217		
2218		
2219		
2220		
2221		
2222		
2223		
2224		
2225		
2226		
2227		
2228		
2229		
2230		
2231		
2232		
2233		
2234		
2235		
2236		
2237		
2238		
2239		
2240		
2241		
2242		
2243		
2244		
2245		
2246		
2247		
2248		
2249		
2250		
2251		
2252		
2253		
2254		
2255		
2256		
2257		
2258		
2259		
2260		
2261		
2262		
2263		
2264		
2265		
2266		
2267		
2268		
2269		
2270		
2271		
2272		
2273		
2274		
2275		
2276		
2277		
2278		
2279		
2280		
2281		
2282		
2283		
2284		
2285		
2286		
2287		
2288		
2289		
2290		
2291		
2292		
2293		
2294		
2295		
2296		
2297		
2298		
2299		
2300		
2301		
2302		
2303		
2304		
2305		
2306		
2307		
2308		
2309		
2310		
2311		
2312		
2313		
2314		
2315		
2316		
2317		
2318		
2319		
2320		
2321		
2322		
2323		
2324		
2325		
2326		
2327		
2328		
2329		
2330		
2331		
2332		
2333		
2334		
2335		
2336		
2337		
2338		
2339		
2340		
2341		
2342		
2343		
2344		
2345		
2346		
2347		
2348		
2349		
2350		
2351		
2352		
2353		
2354		
2355		
2356		
2357		
2358		
2359		
2360		
2361		
2362		
2363		
2364		
2365		
2366		
2367		
2368		
2369		
2370		
2371		
2372		
2373		
2374		
2375		
2376		
2377		
2378		
2379		
2380		
2381		
2382		
2383		
2384		
2385		
2386		
2387		
2388		
2389		
2390		
2391		
2392		
2393		
2394		
2395		
2396		
2397		
2398		
2399		
2400		
2401		
2402		
2403		
2404		
2405		
2406		
2407		
2408		
2409		
2410		
2411		
2412		
2413		
2414		
2415		
2416		
2417		
2418		
2419		
2420		
2421		
2422		
2423		
2424		
2425		
2426		
2427		
2428		
2429		
2430		
2431		
2432		
2433		
2434		
2435		
2436		
2437		
2438		
2439		
2440		
2441		
2442		
2443		
2444		
2445		
2446		
2447		
2448		
2449		
2450		
2451		
2452		
2453		
2454		
2455		
2456		
2457		
2458		
2459		
2460		
2461		
2462		
2463		
2464		
2465		
2466		
2467		
2468		
2469		
2470		
2471		
2472		
2473		
2474		
2475		
2476		
2477		
2478		
2479		
2480		
2481		
2482		
2483		
2484		
2485		
2486		
2487		
2488		
2489		
2490		
2491		
2492		
2493		
2494		
2495		
2496		
2497		
2498		
2499		
2500		
2501		
2502		
2503		
2504		
2505		
2506		
2507		
2508		
2509		
2510		
2511		
2512		
2513		
2514		
2515		
2516		
2517		

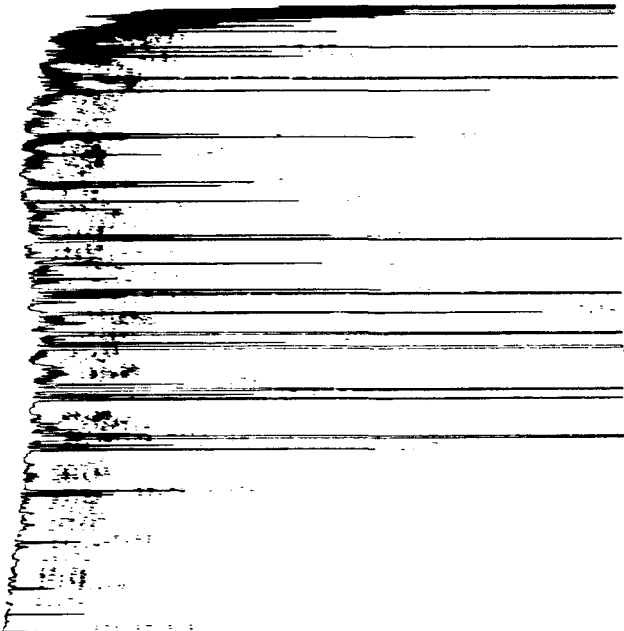
18 4 89

E 000000

65

0100





1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100