

00361 10
293



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
División de Estudios de Posgrado

EL EFECTO DE LA COMPOSICION DE TRES MEDIOS DE
CULTIVO SOBRE EL PERFIL CROMATOGRAFICO DE
LOS ACIDOS GRASOS CELULARES TOTALES DE
Klebsiella oxytoca

T E S I S
Para obtener el grado académico de
Maestro en Ciencias (Biología)
P r e s e n t a
Biólogo Saúl Flores Maya



TESIS CCN
FALLA DE ORIGEN

México, D. F.

1993



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 está 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.

I N D I C E

	Fágina
INTRODUCCION.....	1
ANTECEDENTES.....	3
CARACTERISTICAS GENERALES DE <u>Klebsiella oxytoca</u>	8
OBJETIVOS.....	10
METODOS.....	11
RESULTADOS.....	15
DISCUSION.....	21
CONCLUSIONES.....	30
BIBLIOGRAFIA.....	31
APENDICE.....	36

Klebsiella oxytoca

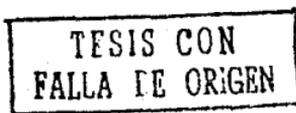
INTRODUCCION.

La célula bacteriana tiene una membrana plasmática que sirve para la incorporación de nutrimentos, ayuda a contener las estructuras celulares en el citoplasma, le proporciona una comunicación con el medio externo y tiene una función clave en la respiración celular. Los principales componentes de la membrana plasmática son los fosfolípidos y las proteínas. La parte fosfolípidica contiene seis o más clases diferentes de lípidos, donde cada uno consiste de una especie molecular individual con variaciones estructurales. El porcentaje relativo de la composición de los lípidos individuales y la estructura de éstos, es influenciado por la edad de las células y otros parámetros ambientales (34) (47).

Los principales componentes de los lípidos celulares son los ácidos grasos, que son sintetizados y regulados por mecanismos químicos bastante estables en la célula bacteriana, por ésta razón, los ácidos grasos pueden ser empleados como un criterio taxonómico (2) (3) (15) (16) (24) (45).

Existen varias características de valor taxonómico que se emplean para hacer la clasificación e identificación de las bacterias como son: la morfología de las células, la sensibilidad a los antibióticos, las características inmunológicas, la patogenicidad, los datos a nivel de la genética molecular, al hábitat y los análisis químicos de los componentes celulares. Algunas de estas características pueden no ser aplicables o útiles en un grupo particular y uno debe juzgar que tan extensa debe ser una compilación de datos para efectuar una buena clasificación (5) (25).

Las bacterias están divididas en dos grandes grupos, según la



composición celular de los ácidos grasos. Un grupo contiene ácidos grasos ramificados iso- y/o anteiso como componentes mayoritarios y los ácidos grasos del otro grupo son principalmente cadenas de ácidos lineales, que incluyen ácidos monoinsaturados (6).

Las Arqueobacterias difieren de las Eubacterias en las secuencias de su ARN ribosomal 16S, no contienen peptidoglucano, son resistentes a los antibióticos como el cloramfenicol y la kanamicina, se ha determinado que el aminoácido portador por el RNAt iniciador es la metionina en lugar de la formilmetionina y en la composición química de sus lípidos de membrana son ligados a éster (CO-C), mientras que los lípidos Eubacterianos están ligados a éster (CO-O) (24) (25).

C

El método de cromatografía de gas-líquido (CGL) es muy sensible para analizar la composición de los ácidos grasos celulares de material extraído a partir de unos cuantos miligramos de células secas. Los datos obtenidos por la técnica de cromatografía de gas-líquido pueden ser procesados por una computadora (48). Este método en la actualidad se emplea para estudiar en detalle los efectos de la edad del cultivo, de la temperatura y la composición del medio sobre la constitución de los ácidos grasos celulares en bacterias (6) (22).

El principio del método propuesto consiste, en la extracción y análisis de los ácidos grasos celulares de las bacterias por cromatografía de gas-líquido. Cada categoría taxonómica, está caracterizada por la presencia y la relación mutua de los ácidos grasos contenidos directamente en los microorganismos. Estos ácidos son determinados como ésteres metílicos, después de la liofilización y esterificación del cultivo. Los resultados obtenidos dan una imagen característica, que es muy similar a una huella digital en criminología, que corresponde a un cierto microorganismo y no es intercambiable (33).

ANTECEDENTES.

El desarrollo del conocimiento de los lípidos en bacterias, hasta donde se sabe, se inicia con los trabajos de Anderson (*cit in* 22) sobre el análisis de los lípidos del bacilo de la tuberculosis. En los años de 1955 a 1957, cuando la aplicación de la técnica de cromatografía para analizar lípidos llega a ser amplia, se aislaron y caracterizaron los Ácidos grasos de las bacterias, que incluyeron al complejo ácido micólico y se conoció la naturaleza de los lípidos complejos, como los fosfátidos y los glucolípidos. En la actualidad, la acumulación de conocimientos concernientes a la composición de los Ácidos grasos, de los fosfátidos, y la distribución celular de los lípidos de bacterias podrán facilitar una amplia información de la actividad de los lípidos en las vías metabólicas de estos microorganismos (11) (27) (28).

El contenido y la composición de los lípidos en las bacterias se sabe que varían con la composición del medio de cultivo, la edad del cultivo y la temperatura (3) (6) (7) (8) (15) (28). En general, las concentraciones altas de glucosa en el medio, aumentan el contenido de lípidos, mientras que las bajas concentraciones de azúcar y una alta concentración de nitrógeno, o glicerol, en lugar de azúcar, disminuye el contenido de lípidos (19) (34).

En 1961 Croom y Mc Neill (*cit in* 22), observaron que las células de Lactobacillus arabinosus cosechadas en la fase estacionaria tuvieron una producción alta de ácidos lactobacilicos y niveles bajos de ácidos insaturados, a diferencia de las células cosechadas durante la fase logarítmica. También se encontró que la proporción del C₁₇-ciclopropano aumenta en Escherichia coli y que el ácido palmítico baja cuando la edad del cultivo es mayor.

Marr e Ingraham (31), y Law *et al* (26), observaron un efecto similar con E. coli: Los cultivos jóvenes tuvieron niveles altos de

C₁₆- y ácido C₁₈- monoenoico y valores bajos para los ácidos C₁₇- y C₁₉-ciclopropano; los primeros fueron convertidos al correspondiente ácido ciclopropano durante la última fase de crecimiento logarítmico, la conversión se completa antes o justo después de alcanzar el máximo crecimiento. Se observaron cambios similares en cultivos de Serratia marcescens, pero en este caso los cambios fueron muy lentos para la conversión a los ácidos ciclopropanos, que fueron terminados durante el período de máximo crecimiento. Los cultivos jóvenes producen una gran cantidad de ácidos insaturados y poco o nada de ácido ciclopropano, tal vez más tarde son sintetizados a causa del envejecimiento del cultivo en la última fase de crecimiento logarítmico (22) (26).

La base bioquímica de estos cambios en E. coli, S. marcescens, L. arabinosus, y otras bacterias que sintetizan ácido ciclopropano, es la transferencia de un grupo metileno de la S-adenosilmetionina a través del doble enlace en el ácido monoenoico correspondiente. Los cambios observados en la proporción de ácido monoenoico y ciclopropano durante el ciclo de crecimiento, pueden explicarse de la siguiente manera: durante las primeras divisiones celulares, las células jóvenes sintetizan ácidos monoenoicos, pero no son convertidos a ácidos ciclopropanos; conforme la división celular avanza, las células viejas en la población comienzan a convertir sus ácidos monoenoicos en ácidos ciclopropanos, este proceso se termina en la fase estacionaria cuando las células jóvenes están en baja proporción (22) (23).

Lenarz y colaboradores en 1962 (27), observaron cambios análogos en la proporción de los ácidos grasos C₁₈ y C₁₉ de Mycobacterium phlei durante el ciclo de crecimiento. En los primeros estadios de crecimiento, los ácidos grasos tienen altas proporciones de ácido oleico y bajos niveles de ácido 10-metilestearico; cuando los cultivos pasan de un crecimiento activo a la fase estacionaria, hay un marcado aumento en los niveles de ácido 10-metilestearico y una disminución en el ácido oleico; el ácido esteárico también disminuye. Con base en estos cambios, estos investigadores proponen la secuencia biosintética del ácido 10-metilestearico la cual se inicia con la dehidrogenación

directa del ácido esteárico en ácido oleico, y por una metilación en el doble enlace de este último ácido se produce el ácido 10-metilesteárico. Estas reacciones ocurren durante el ciclo de crecimiento de M. phlei, las células jóvenes sintetizan esteato y lo convierten en oleato; conforme la división celular continúa, las células viejas transforman su ácido oleico en ácido 10-metilesteárico, este proceso se completa en la fase estacionaria, cuando ya no hay células jóvenes (28).

Los primeros estudios sobre el efecto de la temperatura en los lípidos de los microorganismos, mostraron que a bajas temperaturas los lípidos contienen altas proporciones de ácidos grasos insaturados (18) (21) (31) (37) (51). Marr e Ingraham en 1962 (31) estudiaron el efecto de la temperatura sobre la composición de los ácidos grasos de E. coli en medios con un mínimo de glucosa y un medio complementado con extracto de levadura. La bacteria se incubó a 10° C en ambos medios, y se observó que la proporción de ácido hexadecanoico y ácido octadecanoico aumentaron, y los niveles para el ácido palmítico y el ácido metilhexadecanoico decayeron con la disminución de la temperatura.

Los niveles bajos de ácido ciclopropano y los niveles altos de ácidos monoenoicos en E. coli y S. marcescens, que crecen en temperaturas bajas, se debe a que la transferencia enzimática de un grupo metileno a la doble ligadura de los ácidos monoenoicos es o muy lento o bien inhibido a temperaturas bajas y a la intervención de otros factores tales como la composición del medio y los cambios en la tasa de crecimiento (31).

Long y Williams en 1960 (*cit in* 21), mencionan que los organismos que crecen por encima de su temperatura óptima tienen niveles altos de ácidos saturados y un nivel bajo de insaturados.

Marr e Ingraham en 1962 (31), observaron la influencia de la nutrición sobre la composición de los ácidos grasos de E. coli. Las bacterias crecieron a 30° C limitadas de glucosa o de la fuente de nitrógeno (amonio), en una tasa específica de crecimiento de 0.2 hr⁻¹. Las bacterias limitadas por nitrógeno tuvieron niveles más

altos de ácido palmítico y ácido metilhexadecanoico y niveles bajos de ácidos grasos insaturados que las bacterias limitadas de glucosa; en este aspecto las limitaciones de nitrógeno son similares al efecto de las temperaturas altas. Para determinar el efecto de la tasa de crecimiento, las células se cultivaron a 25^o C en diferentes medios: mínimo de succinato, mínimo de glucosa (control) y mínimo glucosa + ácido casamino o extracto de levadura; las células fueron cosechadas durante el crecimiento exponencial y se determinaron proporciones bajas de ácido ciclopropano. Las proporciones de ácidos palmíticos y ácidos insaturados no se correlacionaron bien con la tasa de crecimiento, pero fueron en algo dependientes del medio. Las células que crecieron en el medio mínimo de glucosa tuvieron un alto contenido de ácido palmítico y un contenido bajo de ácidos insaturados; la complementación con ácidos casamino o extracto de levadura, o las que crecieron en el medio mínimo de succinato, tienen niveles altos de ácidos insaturados y niveles bajos de ácido palmítico. Estos resultados señalan que la comparación de la composición de los ácidos grasos de las bacterias que crecen en diferentes medios no pueden ser concluyentes si sólo se toma en cuenta la composición del medio (23), por lo que hay que considerar también la temperatura y la fase de crecimiento como lo mencionaron Marr e Ingraham (31).

Fujii y Fukui (17), investigaron el efecto de la longitud de la cadena de n-alkano usada como única fuente de carbono, en relación a la composición de los ácidos grasos de Corynebacterium simplex ATCC 6946. Estos organismos contenían cantidades apreciables de ácidos grasos impares aún cuando crecían sobre n-alkano con número par. Además fueron sintetizados varios homólogos del ácido tuberculoesteárico (ácido-metilesteárico) y de ácidos iso-ramificados, según la longitud de la cadena del n-alkano.

También estudiaron el efecto de la vitamina B₁₂ intracelular sobre la composición de los ácidos grasos de C. simplex ATCC 6946. Observaron que las células con suficiente vitamina B₁₂ contienen más ácidos grasos de cadena ramificada 10-metil que ácidos monoinsaturados, y viceversa. Esto sugiere, que la síntesis

enzimática para formar los ácidos grasos de cadena ramificada 10-metil se ve aumentada por la transferencia del grupo metil a partir de la S-adenosilmetionina hacia los ácidos monoinsaturados.

Los lípidos de Pseudomonas aeruginosa cepa 015 fueron alterados al crecer en aminoácidos de cadena ramificada y su derivado acilo, como única fuente de carbono. Estas condiciones de cultivo sobre los derivados acilo, bajan los niveles de los ácidos grasos insaturados y aumentan los niveles del ácido ciclopropil. Este cambio en la proporción de los ácidos insaturados en ácidos ciclopropil fue debido a la fuente de carbono y no a la fase de crecimiento del cultivo. También concluyeron que la bacteria Pseudomonas aeruginosa si crece sobre fuentes de carbono catabolizadas a propionil-CoA, afecta la síntesis de ácidos grasos de cadena impar y cuando crecen sobre sustratos de carbono iso-ramificados, se lleva a cabo la síntesis de ácidos grasos de cadena ramificada (9).

La investigación sobre el efecto de la composición del medio de cultivo en los ácidos grasos también se ha hecho en otros microorganismos (2) (3) (7) (8) (9) (12) (14) (17) (21) (29) (32) (34) (41). Se encontraron ácidos grasos de C 18:2 en varias cepas del hongo Blastomyces dermatitidis, en donde se observó que los ácidos C 16:0, C 16:1, C 18:0, C 18:1 y C 18:2, contenidos en la pared celular y en toda la célula, varían poco cuando están en la fase de levadura y crecen en medios de soya dialisada, o en un medio de extracto de levadura + glucosa (32).

Massoudnia y Scheer en 1982 (32), utilizaron la técnica de cromatografía de gas-líquido y observaron que las células de B dermatitidis que crecían en un medio modificado Halliday y McCoy (HMM) contenían más ácidos grasos, que las preparaciones de las células que crecieron en un medio modificado Ordal y Levine (LOM). Las células que crecían en HMM también tienen más lípidos que las que crecían en LOM complementado con biotina. Las deficiencias de biotina pueden causar disminución de la síntesis de ácidos grasos en ciertos hongos. Posiblemente, los niveles altos de biotina en HMM aumentan el porcentaje de lípidos y de ácidos grasos en hongos que

se desarrollan en este medio. Ahora se sabe que existen otros factores a parte de la biotina que influyen en el contenido de lípidos de los hongos.

CARACTERISTICAS GENERALES DE Klebsiella oxytoca.

Las bacterias del género Klebsiella son Gram negativas, son bacilos con cápsula, no móviles, que pertenecen a la Familia Enterobacteriaceae. Las siguientes características son útiles para distinguirla de otros miembros de la familia: producen ácido a partir de inositol, hidrolizan urea, utilizan el citrato, no producen ornitina decarboxilasa ni ácido sulfúrico. En general, la prueba de rojo de melilo (MR) es negativa y la prueba de Voges-Proskauer (VP) es positiva. Las cepas exhiben una asociación relativa del 73 al 100%, en los estudios de hibridación de ADN, con Klebsiella pneumoniae (sensu stricto) como cepa de referencia. Dentro del género existe un intervalo de 55 a 59% mol de G+C (4) (5) (38) (43) (53).

La especie Klebsiella oxytoca, a diferencia de las especies de Klebsiella pneumoniae (sensu stricto) y Klebsiella planticola, degrada pectato, forma indol, forma pigmento sobre agar D-gluconato citrato férrico, crece a 10⁰ C y a 44⁰ C no fermentan lactosa con producción de gas (prueba de coliformes fecales), utiliza genticato y m-hidroxi benzoato. Además, se encuentra que tiene valores del 58% mol de G+C. (4) (10) (25).

Las investigaciones médicas reafirman que K. oxytoca es importante en las infecciones en humanos y en las infecciones en otros animales, como patógeno oportunista, con una resistencia múltiple a los antibióticos. Estos patógenos oportunistas se han aislado de rábanos, tomates y ensaladas verdes considerándolas como las primeras fuentes de una infección nosocomial (43) (53).

Muchos de los trabajos realizados con cromatografía de gas-líquido presentan datos muy variados, por lo que no se ha podido realizar una correlación muy clara de estos datos con la taxonomía de las bacterias. Cuando los datos son empleados en la

clasificación la estandarización de las condiciones de cultivo es un punto crucial. La composición del medio a usar es un factor importante y determinante. Si se logra la estandarización de las condiciones de crecimiento y la caracterización del medio de cultivo, la reproducibilidad debe ser satisfactoria para dos funciones: la correlación positiva de los datos de cromatografía de gas-líquido con la taxonomía y el mantenimiento o conservación de las características genéticas de las bacterias.

La composición de los ácidos grasos en bacterias es una característica específica, en los miembros de la Familia Enterobacteriaceae, los análisis cualitativos y cuantitativos pueden ser adaptados en laboratorios clínicos y pueden ser un criterio adicional muy importante para la determinación de especies estrechamente relacionadas, y servir como un método rápido y reproducible, para rutinas de identificación a nivel clínico, sanitario, alimentario y biotecnológico.

En el laboratorio de Bacteriología de la Unidad de Investigación Interdisciplinaria de las Ciencias de la Salud y la Educación, de la Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala-UNAM, se inician investigaciones en colaboración con el Instituto de Investigaciones del Agua en Fraga, Checoslovaquia, para llegar a uniformizar el método de análisis de los ácidos grasos por cromatografía gas-líquido, con el fin de incorporarlo a las pruebas de rutina en el proceso de identificación y/o clasificación de enterobacterias. Este estudio formó parte de la primera fase de estandarización del método, abocado a las condiciones del cultivo.

OBJETIVOS.

Determinar el efecto de los siguientes medios de cultivo: agar nutritivo, agar Infusión de Cerebro y Corazón (BHI) y agar Extracto de Levadura-Dextrosa-Feptona (YFD), sobre la composición de los ácidos grasos celulares totales de Klebsiella oxytoca ATCC 13182.

Proponer el perfil cromatográfico de los ácidos grasos celulares de Klebsiella oxytoca ATCC 13182, en el medio de cultivo que genere las características cualitativas y cuantitativas más completas para el análisis lipídico de la bacteria.

Determinar el medio de cultivo más propicio para la conservación o mantenimiento de las características lipídicas de Klebsiella oxytoca ATCC 13182.

MÉTODOS.

CEPA BACTERIANA Y CONDICIONES DE CULTIVO.

La cepa de Klebsiella oxyloca ATCC 13182 usada en este trabajo provino directamente de la American Type Culture Collection (ATCC) (1). Para garantizar la viabilidad y estabilidad genética de la bacteria, durante el estudio, se depositó en custodia, en el laboratorio de Cultivos Microbianos del Centro de Investigación de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

La cepa se hizo crecer en agar nutritivo Difco No de catálogo 0001-17-0, en agar de infusión de cerebro y corazón (BHI) No de catálogo 0418-17-7 y en un medio preparado, el cual contenía (g/100 ml): 2% de Dextrosa (Difco), 0.3% de extracto de levadura (Difco) y 1% de Peptona (Difco) (YPD).

De cada uno de los medios se prepararon 20 cajas de Petri, cada una con 25 ml de agar. La inoculación de las cajas se hizo a partir de un tubo con agar inclinado con la cepa bacteriana, al final del periodo exponencial de crecimiento. La inoculación se hizo por estriaciones que cubrieron totalmente la caja. Las células se incubaron a 37° C durante 24 horas después de la inoculación, tiempo en el cual los cultivos estuvieron en la fase final del crecimiento exponencial.

Transcurrido el tiempo de incubación, en cada caja Petri se procedió a adicionar 5 ml de formaldehído al 5% con el propósito de coleccionar las bacterias de la superficie del medio, se levantaron suavemente con una varilla de vidrio para desprender todo el crecimiento celular y vaciar la suspensión a un tubo de centrifuga. El contenido de cada tubo obtenido se centrifugó a 15,000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante del primer lavado se desechó cuidadosamente, después se agregó solución fisiológica de NaCl al 0.85% para realizar un segundo lavado y centrifugar a 15,000 rpm durante 10 minutos. Este proceso se repite una vez más para el tercer lavado (49).

Posteriormente se recogieron 20 mg de biomasa, los cuales se pesaron en tubos de ensayo lavados con hexano y secados en estufa, la biomasa se distribuyó a lo largo de las paredes de los tubos por medio de una cucharilla de metal, previamente lavada con hexano, con la finalidad de obtener un secado más rápido y eficiente durante la liofilización. Los tubos permanecieron cerrados en todo momento para evitar cualquier contaminación, hidratación y destrucción de los ácidos grasos.

LIOFILIZACION.

El paquete celular obtenido se liofilizó durante 3 horas en un aparato Labconco LYPH-LOCK 4.5 I con un sistema de enfriamiento en seco 5739561, previamente se acondicionó la liofilizadora a -50°C y un vacío de 25 micrones de mercurio (25×10^{-3} Torr). No es recomendable almacenar el liofilizado, por que al pasar el tiempo se presentan problemas de hidratación y destrucción de los ácidos grasos, si fuese muy necesario, se coloca a -20°C en un congelador.

ESTERIFICACION Y EXTRACCION DE LOS ACIDOS GRASOS (Oliva 1971 cit in 40).

A la muestra liofilizada de aproximadamente 20 mg de materia seca, se le agregó 1 ml de metóxido de sodio después se agitó por 5 minutos. Posteriormente, se adicionaron 0.7 ml de metanol saturado de ácido sulfurico hasta alcanzar un pH de 1 ó 2 y se agitó con movimientos circulares ligeros, se dejó reposar durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo se adicionaron 2 ml de solución fisiológica de NaCl al 0.85% y se mezcló con movimientos circulares.

El proceso de extracción de los ésteres metílicos con hexano se realizó al agregar 1 ml de hexano, se agitó mecánicamente por espacio de 1 minuto, se dejó reposar hasta separarse las capas y se extrajo el hexano con los ésteres metílicos (capa superior transparente) con una pipeta Pasteur, y se transfirió a un tubo de ensayo que contiene sulfato de sodio anhidro para extraer el agua.

Este proceso de extracción de los ésteres metílicos con hexano se repitió dos veces más para cada una de las muestras. Al final se obtuvo en cada uno de los tubos un volumen de hexano con ésteres metílicos.

La evaporación del hexano se realizó con nitrógeno para obtener un volumen final de 10 μ l, y de ahí tomar 1 μ l que se inyectó al cromatógrafo de gases (35).

ANÁLISIS DE LOS ÁCIDOS GRASOS ESTERIFICADOS.

La muestra de 1 μ l de la fracción obtenida de los ésteres metílicos se analizó en un cromatógrafo de gases (5870 A/3396A; Packard Instrument Co. Inc., Rockville, Md.) equipado con un inyector sólido (Chrompack 8790; Packard) y detector de ionización de flama hidrógeno SGE DCI-3, con una columna capilar de sílice fundido (30 m x 0.25 mm de diámetro interno) cubierta con polidimetilsiloxano (0.25 μ m de capa) como fase estacionaria. En principio, la mezcla de ésteres de ácidos grasos se separa en columna capilar (35).

Las condiciones de operación del cromatógrafo fueron las siguientes:

Temperatura del inyector 270^o C.

Temperatura del detector 270^o C.

Temperatura de la columna programada de 120^oC a 250^oC a 4^oC/minuto

Presión del nitrógeno 50 Kg/p².

El gas acarreador fue nitrógeno con un flujo aproximado de 5 ml/minuto al puerto de inyección. En estas condiciones los ésteres metílicos de los ácidos grasos de 10 a 20 carbonos de longitud, eluyeron de la columna en 30 minutos en promedio. La cuantificación de los perfiles cromatográficos en el área de los picos fue ejecutada con un integrador electrónico Hewlett Packard 3396 A.

Los picos de los ésteres metílicos de los ácidos grasos, fueron identificados primero, por la comparación de los tiempos de

retención de cada cromatograma, con los tiempos de retención de una mezcla estándar de ésteres metílicos de los ácidos grasos bacterianos de referencia No 4-7080. La mezcla contiene un total de 10 mg/ml de ésteres metílicos en metil caproato; Sulpeco (Inc., Bellafonte Pa.). El análisis del efecto de cada medio de cultivo, sobre el perfil de ácidos grasos de Michsiella oxyloca en este trabajo, fue realizado de 20 a 50 veces.

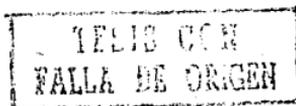
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los picos de los ácidos con el número de átomos de carbono en el intervalo de 12 a 28 fueron considerados para procesar la información de la siguiente manera:

a) Normalización. Estandarizar en porcentajes las áreas dadas por el cromatograma, que fueron analizadas por los métodos estadísticos descritos a continuación: El proceso de normalización se efectuó mediante la transformación de los datos numéricos de área y tiempo, a porcentajes, en relación a un dato de área o tiempo, como referencia que se considera el 100%, el criterio para obtener el dato de área y tiempo de referencia es el siguiente: de los datos originales arrojados por el cromatograma, se elige aquel que provenga del pico o área más alta y se le asocia el tiempo de retención. Ya que se tienen los datos normalizados se procede a tabularlos y graficarlos (16).

b) Medidas estadísticas descriptivas. Se calcularon la media aritmética, la desviación estándar y el coeficiente de variación para las áreas de los picos y tiempos de retención normalizados, para cada medio de cultivo. Los valores se obtuvieron como porcentajes del total del área del pico para eliminar el efecto de la variación por el tamaño del inóculo.

c) El análisis de varianza fue calculado para las áreas y tiempos de retención normalizados para cada medio.



RESULTADOS.

Los componentes químicos de los tres medios de cultivo, empleados en este trabajo, y los cromatogramas de los Ácidos grasos esterificados que se obtuvieron en cada uno de estos medios, se presentan en el apéndice.

Los resultados se obtuvieron por análisis repetitivos de 21 a 50 determinaciones para cada medio de cultivo. Al comparar los cromatogramas de los Ácidos grasos esterificados de Klebsiella oxytoca ATCC 13182 obtenidos en los tres medios de cultivo con el estándar de referencia 4-7080 de los ésteres metílicos de los Ácidos grasos bacterianos, se estableció la ocurrencia e identidad de 11 Ácidos grasos en la fase final del crecimiento exponencial de la bacteria (Tabla 1). Es importante mencionar que en los cromatogramas se detectaron Ácidos grasos menores de 12 carbonos y mayores de 24 carbonos en la longitud de la cadena, cuya Área es tan pequeña que su aparición fue menor del 1% por lo cual se dificultó su determinación (ver apéndice cromatogramas).

La normalización de los datos de Áreas y tiempos de retención de cada Ácido graso obtenidos en los tres diferentes medios de cultivo se muestran en las tablas 2, 3 y 4 del apéndice.

La composición química de los medios de cultivo no afectaron los tiempos de retención de los Ácidos grasos, ya que la emisión de cada Ácido graso en la columna de cromatografía de gas-líquido fue constante. Esto se confirmó en el análisis estadístico aplicado a los datos de tiempos de retención para los tres medios de cultivo, con el cual no se observó una diferencia significativa (ver análisis de variancia para tiempos de retención y la tabla 5).

La tabla 5 permite una comparación simultánea de los perfiles cromatográficos en estos medios de cultivo y da la abundancia de cada Ácido graso en porcentaje.

TABLE 1

Principales ácidos grasos celulares totales aislados de Klebsiella oxytoca. Los ácidos grasos son enumerados de acuerdo al orden de elución de la columna de cromatografía Gas-Líquido.

ABREVIATURA	NOMBRE
1 C 12:0	DODECANOICO (LAURICO)
2 C 14:0	TETRADECANOICO (MIRISTICO)
3 C 15:0	PENTADECANOICO
4 3-OH C 14:0	3-HIDROXITETRADECANOICO (β-HIDROXIMIRISTICO)
5 C 16:1 (9 Cis)	Cis 9-HEXADECANOICO (PALMITOLEICO)
6 C 16:0	HEXADECANOICO (PALMITICO)
7 C 17:0 Δ	Cis 9-10 METILENHEXADECANOICO
8 C 17:0	HEPTADECANOICO
9 C 18:1 ⁹ - C 18:1 ¹¹	Trans 9 OCTADECANOICO (OLEICO)-Cis 11 OCTADECANOICO (Cis UACCENICO)
10 C 18:0	OCTADECANOICO (ESTEARICO)
11 C 19:0 Δ	Cis 9-10 METILENOCTADECANOICO

Klebsiella oxytoca ATCC 13182 en el medio agar nutritivo tiene la siguiente constitución de ácidos grasos: C 12:0, C 14:0, C 15:0, 3OH-C 14:0, C 16:1 (9 Cis), C 16:0, C 17:0 Δ, C 17:0, C 18:1 (9, 11 cis), C 18:0, C 19:0 Δ, en el medio agar EHI tiene la misma composición cualitativa de ácidos grasos presentada en el medio agar nutritivo. Cuando se hace crecer esta bacteria en el medio YFD, es notable la ausencia de los siguientes ácidos grasos: C 15:0 y C 17:0 (tabla 5).

En la fase final del crecimiento exponencial de la bacteria y a una incubación de 37° C se observó que el aspecto cuantitativo de los ácidos grasos difiere entre los tres medios. Así los ácidos grasos C16:0 y C17:0 Δ presentaron porcentajes muy altos en los tres medios y los ácidos grasos con valores más bajos fueron C15:0, C16:1 (9 cis), C17:0 y C18:1 (9, 11 cis) los cuales se presentaron en los cromatogramas obtenidos en el medio YFD, también el ácido C19:0 Δ en el medio EHI presentó valores bajos con respecto a los otros dos medios de cultivo (figuras 1, 2, 3 y 4).

Para determinar si existían diferencias significativas en el aspecto cuantitativo de las áreas de los ácidos grasos, entre los medios de cultivo, se realizó un análisis de varianza. Los intervalos de confianza se determinaron al 0.95% debido al diferente número de repeticiones utilizadas en este trabajo. Con base en este análisis se obtuvieron los siguientes resultados: los ácidos grasos C12:0, C14:0, C15:0, 3-OH C14:0, C16:1 (9 cis), C17:0 y C18:1 (9, 11 cis) obtenidos al hacer crecer a la bacteria en el medio agar YFD mostraron diferencias cuantitativas con respecto a estos mismos ácidos grasos obtenidos en la bacteria pero desarrollada en los otros dos medios de cultivo. Otros de los ácidos grasos que presentan diferencias significativas son el C17:0 Δ obtenido en el medio agar nutritivo y el C19:0 Δ obtenido en el medio EHI. Por este análisis se observó que en el medio agar YFD, la mayoría de los ácidos grasos presentan diferencias significativas con el perfil cromatográfico de Klebsiella oxytoca ATCC 13182 crecida en el medio agar EHI y en agar nutritivo (ver análisis de varianza, apéndice y la figura 1).

TABLA 5

Efecto de la composición del medio sobre el perfil de los ácidos grasos de *Klebsiella oxytoca* ATCC 13182 a 37° C y cosechada durante la fase final del crecimiento exponencial.

ACIDO GRASO	AGAR NUTRITIVO			AGAR BHI			AGAR YPD		
	\bar{X}	DST	C U	\bar{X}	DST	C U	\bar{X}	DST	C U
AREA									
C 12:0	1.01	0.40	0.40	1.33	0.60	0.42	2.39	0.10	0.41
C 14:0	6.32	1.30	0.20	9.90	1.73	0.17	16.00	1.00	0.10
C 15:0	3.12	0.40	0.13	4.43	1.73	0.40	0.00	0.00	0.00
3-OH C 14:0	1.20	1.04	0.00	1.40	0.02	0.60	3.37	1.70	0.50
C 16:1 (9 Cis)	16.13	2.10	0.13	26.21	5.02	0.22	5.45	0.33	0.06
C 16:0	100.00	0.00	0.00	100.00	0.00	0.00	100.00	0.00	0.00
C 17:0 [^]	61.85	0.20	0.13	50.74	5.44	0.11	54.00	2.00	0.05
C 17:0 ^g	3.19	0.62	0.20	1.52	0.71	0.46	0.00	0.00	0.00
C 18:1 ^g -C18:1 ¹¹	29.99	3.70	0.12	19.70	3.65	0.10	4.64	0.62	0.13
C 18:0	2.00	0.30	0.15	1.33	0.21	0.16	1.06	0.74	0.40
C 19:0 [^]	22.24	3.14	0.14	6.71	1.63	0.24	19.16	1.35	0.07
TIEMPO DE RETENCION									
	\bar{X}	DST	C U	\bar{X}	DST	C U	\bar{X}	DST	C U
C 12:0	42.70	0.20	0.004	42.70	0.15	0.003	44.64	0.10	0.004
C 14:0	60.70	1.42	0.020	69.31	0.15	0.002	70.60	0.16	0.002
C 15:0	04.04	0.37	0.004	04.20	0.21	0.002	0.00	0.00	0.000
3-OH C 14:0	09.47	0.41	0.004	00.00	0.76	0.000	00.55	0.20	0.002
C 16:1 (9 Cis)	95.46	0.53	0.005	95.60	0.14	0.001	95.92	0.19	0.002
C 16:0	100.00	0.00	0.000	100.00	0.00	0.000	100.00	0.00	0.000
C 17:0 [^]	111.95	0.12	0.001	111.97	0.11	0.009	111.66	0.09	0.000
C 17:0 ^g	114.21	0.43	0.003	114.46	0.29	0.002	0.00	0.00	0.000
C 18:1 ^g -C18:1 ¹¹	125.45	0.34	0.002	125.50	0.22	0.001	124.63	0.30	0.002
C 18:0	120.03	0.60	0.004	129.19	0.32	0.002	120.19	0.34	0.002
C 19:0 [^]	140.06	0.42	0.003	141.05	0.33	0.002	139.63	0.32	0.002

\bar{X} = Media aritmética, DST = Desviación estándar, C U = Coeficiente de variación.

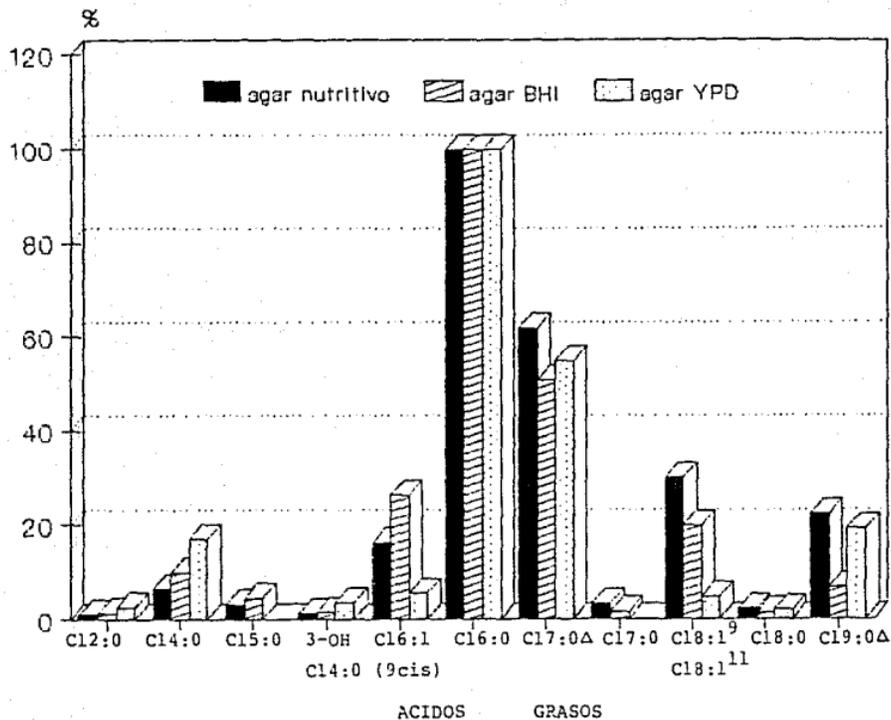


Figura 1. Areas de los ácidos grasos de *Klebsiella oxytoca* ATCC 13182 en tres medios de cultivo.

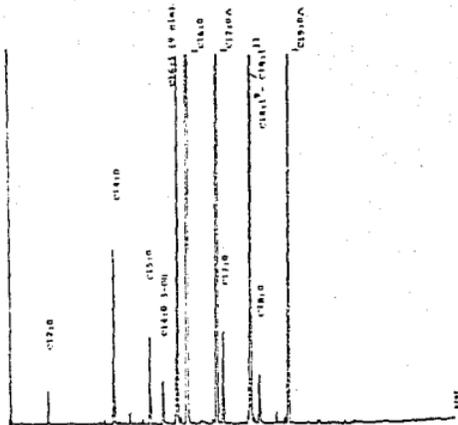


FIGURA 2. PERFIL CROMATOGRAFICO DE ACIDOS GRASOS ESTERIFICADOS DE *Klebsiella oxytoca* ATCC 13622 CRECIDA EN AGAR NUTRITIVO.

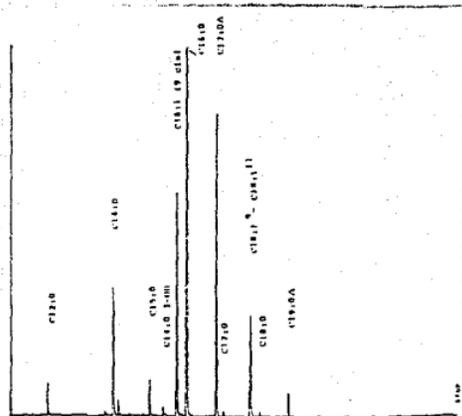


FIGURA 3. PERFIL CROMATOGRAFICO DE ACIDOS GRASOS ESTERIFICADOS DE *Klebsiella oxytoca* ATCC 13622 CRECIDA EN AGUA INFUSION DE FENO Y CUBAZON 19821.

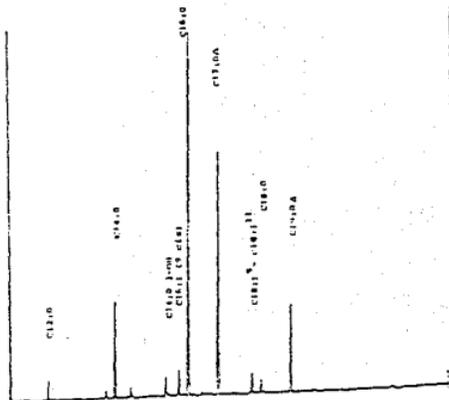


FIGURA 4. PERFIL CROMATOGRAFICO DE ACIDOS GRASOS ESTERIFICADOS DE *Klebsiella oxytoca* ATCC 13622 CRECIDA EN AGAR EXTRACTO DE LEVADURA-PEPTONA-DEXTROSA (YPD).

DISCUSION.

Varios investigadores han examinado en detalle la composición de los ácidos grasos por cromatografía de gas-líquido, en una amplia variedad de bacterias. Los resultados que se obtienen por esta técnica son empleados como un complemento para la clasificación taxonómica de estos microorganismos (3) (6) (15) (16) (35) (36) (39) (40) (45) (48) (50) (52). Sin embargo, hay factores que pueden alterar esta relación, uno de los factores que influye en forma cualitativa y cuantitativa del perfil cromatográfico de los ácidos grasos de bacterias, es la composición química del medio de cultivo. Para establecer una interpretación correcta de la identificación de las bacterias es necesario uniformar y/o estandarizar el medio de cultivo para emplearlo en la técnica de cromatografía de los ácidos grasos.

En este estudio, se analizó la comparación entre los tres medios de cultivo y se compararon los datos de este trabajo con otras investigaciones. Como resultado de lo cual se propone un medio de cultivo que permita que las bacterias presenten las siguientes características: una mayor diversidad y un incremento de los ácidos grasos previamente extraídos, mediante la metilación con metilato de sodio e hidrolizados con metanol saturado y ácido sulfúrico y hexano.

Para llegar a establecer el medio de cultivo estándar se procedió a realizar el análisis cualitativo de los perfiles cromatográficos de los ácidos grasos de Klebsiella oxytoca ATCC 13182 y más adelante el análisis cuantitativo de los ácidos grasos de esta bacteria.

La presencia de 11 ácidos grasos de Klebsiella oxytoca ATCC 13182 en el medio agar infusión cerebro corazón (BHI) y el medio agar nutritivo (figura 1) son los mismos que caracterizan a las bacterias pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae (5) (40). Además, K. oxytoca ATCC 13182 posee dos ácidos que caracterizan a las bacterias Gram negativas (6), estos son el ácido cis vaccénico (C19:1¹¹) y el ácido 3-hidroxitradecanoico (C14:0). En el medio agar nutritivo y el medio agar BHI se detectó la presencia de los

ácidos grasos de cadena impar, estos ácidos sólo han sido reportados para las bacterias (9) y son raros en plantas y animales (30).

A diferencia del medio agar BHI y el medio agar nutritivo, en el agar extracto de levadura-peptona-dextrosa (YFD), no se presentaron los ácidos grasos de cadena impar, la importancia de estos ácidos se discutirá más adelante. Los ácidos grasos que aparecieron en el medio agar YFD también son los que caracterizan a la Familia Enterobacteriaceae, pero la ausencia del ácido C15:0 y del ácido C17:0, hace difícil establecer a K. oxytoca ATCC 13182 en la Familia Enterobacteriaceae, hasta donde se sabe, no existen trabajos que comparen y determinen la importancia de la presencia de estos ácidos ni los procesos biosintéticos de los ácidos de cadena impar en este género.

El ácido palmítico (C16:0) fue en los tres medios de cultivo, el ácido más abundante que caracteriza en este estudio a K. oxytoca ATCC 13182, lo que reafirma la inclusión de este género a la Familia Enterobacteriaceae (5) (6) (10). Como se observa en las figuras 2, 3 y 4 para la especie K. oxytoca crecida en el medio agar nutritivo, el ácido más abundante es el cis 9-10 metilheptadecanoico (C17:0 Δ) que posee un área de 61.8, una desviación estándar (DS) de 8.17 y un coeficiente de variación (CV) de 13%; en el medio agar BHI el Área de este ácido es de 50.7, una DS de 5.43 y presenta un CV de 10% y en el medio agar YFD, posee un área de 54.8, una DS de 2.87 y un CV de 5%. Como se observa en estos datos, por presencia y abundancia de este ácido graso podría ser el que caracteriza a la especie y posiblemente al género, el ácido C17:0 Δ presenta el CV más pequeño y constante de todos los ácidos grasos (tabla 5).

Los perfiles cromatográficos de los ácidos grasos de K. oxytoca ATCC 13182 obtenidos en los tres medios de cultivo no pusieron de manifiesto los ácidos grasos con cadenas ramificadas, los ácidos grasos poliinsaturados ni los ácidos grasos oxigenados, lo que confirma que estos ácidos grasos no son representativos de las bacterias Gram negativas (5) (6) (22) (24) (40) (44).



Se realizó un análisis cualitativo al comparar los datos obtenidos en este trabajo con los de otras investigaciones, hasta el momento de la realización de este estudio, no existe en la literatura la referencia que reporte el perfil de los ácidos grasos de Klebsiella oxytoca, crecida en alguno de los medios de cultivo aquí empleados. Bergon y Sobrin en 1984 (6), reportaron el perfil cromatográfico de K. oxytoca obtenido en un medio de agar sangre, los resultados de estos investigadores son cualitativamente muy parecidos a los obtenidos en el medio agar nutritivo y en el medio agar BHI (figuras 2 y 3). Sin embargo, el ácido cis 9-10 metilhexadecanoico (C17:0 Δ) no fue el ácido más abundante en el medio agar sangre, pero sí se presentó. A pesar de que es un medio diferente, a los que se emplearon en este trabajo, se detectaron los 11 ácidos grasos que incluyen al género Klebsiella en la familia Enterobacteriaceae. Desde el punto de vista de que sólo la presencia (análisis cualitativo) de los ácidos grasos favorece una correlación positiva en la identificación de las bacterias, se puede decir que cualquier medio de cultivo de los mencionados hasta el momento de esta discusión pueden ser utilizados para el análisis cromatográfico de los ácidos grasos de K. oxytoca.

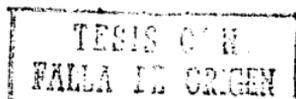
Este estudio fue más allá del análisis cualitativo, con el sentido de establecer un medio de cultivo que permita una mayor abundancia y diversidad de los ácidos grasos para la identificación y conservación de Klebsiella oxytoca.

Por lo que respecta al análisis cuantitativo la tabla 5 muestra que al realizar la cosecha en la fase final del crecimiento exponencial de la bacteria, en el medio agar nutritivo se encontró el 54% de los ácidos lineales saturados, un 18% de los ácidos insaturados, un 18% de los ácidos ciclopropanos y un 9% de los ácidos hidroxilados, estos mismos porcentajes fueron obtenidos en el medio agar BHI. Para el cultivo crecido en agar YFD, los ácidos saturados lineales disminuyeron hasta un 36%, sólo los otros ácidos mantuvieron los mismos porcentajes presentados en el medio agar BHI y medio agar nutritivo. En relación a estos porcentajes se observó en la figura 1, que durante el proceso de alargamiento de las cadenas de los ácidos grasos saturados lineales, al inicio del

proceso las cadenas cortas de estos ácidos grasos tuvieron áreas muy pequeñas y conforme se agrandaban las cadenas saturadas sus áreas fueron más pequeñas, también las áreas de los ácidos insaturados disminuyeron, mientras que las áreas de los ácidos grasos ciclopropanos se incrementaron conforme avanzó el proceso de alargamiento de las cadenas de los ácidos grasos (11). Esto significa que durante el avance del crecimiento del cultivo, la presencia de los ácidos saturados e insaturados y sus porcentajes de áreas irán disminuyendo, en cambio la presencia y abundancia de los ácidos cíclicos aumentará (Figuras 2, 3 y 4). Por lo tanto, el medio de cultivo que produce una mayor diversidad y sobre todo una mayor área de los ácidos grasos cosechados en la fase final del crecimiento exponencial de la bacteria es el medio agar nutritivo (tabla 5 y figura 1).

La composición química del medio agar BHI contiene 0.2% de dextrosa, que es una concentración menor a la del medio agar YFD, que fue de 2% de dextrosa (ver la composición química de los medios de cultivo en el apéndice). Se observó, que Streptococcus pyogenes ATCC 13182 expuesta a bajas concentraciones de dextrosa incrementa el área en un 19.76% del ácido C18:1⁹-C18:1¹¹ y disminuye hasta un 6.71% el ácido C19:0 Δ (tabla 5). En el medio agar YFD, las células bacterianas presentaron porcentajes altos del ácido C19:0 Δ (19.16%) y un porcentaje bajo del ácido C18:1⁹-C18:1¹¹ (4.64%). Los efectos de la concentración de dextrosa, contenida en los medios de cultivo, se observa en la existencia de bajos niveles de ácidos cíclicos cuando hay altas concentraciones de dextrosa y viceversa (34). En el medio agar nutritivo se presentaron los valores de área más altos para los ácidos insaturados y los ciclopropanos, con respecto a los otros medios, debido a que la concentración de dextrosa en este medio puede ser muy baja o nula (figura 1).

Los valores bajos de las áreas de los ácidos grasos obtenidos en el medio agar YFD (tabla 5), están asociados a factores enzimáticos que determinan o regulan la longitud de la cadena y que las reacciones que catalizan este proceso es la etapa limitante de la velocidad en la biosíntesis de los ácidos grasos saturados, la primera enzima que participa en estos procesos parece ser, de



acuerdo a Lioret y Moysé (30), la Acetil-CoA carboxilasa, la cual posee biotina, que transforma a la Acetil CoA en Malonil-CoA. Lioret y Moysé (30) y Massoudnia y Scheer (32), mencionan que un aumento en la concentración de la biotina contenida en el extracto de levadura, como sucede en el medio agar YPD, puede ser un factor determinante en el contenido de los ácidos grasos saturados de las bacterias y los hongos. Cuando existe un aumento en la concentración de biotina el proceso inicial de alargamiento de las cadenas es más rápido y como consecuencia los ácidos presentan un incremento en sus áreas, hasta antes de comenzar la etapa de condensación. En esta etapa participan dos enzimas que pueden catalizar todas las reacciones de condensación hasta formar el ácido metilenoctadecanoico (C18:0) ver esquema de la ruta biosintética de los ácidos grasos en el apéndice, estas enzimas son llamadas la 3- ketoacil-ACP sintetasa I y la sintetasa II (11). Pascaud (39), menciona que los altos porcentajes de ácidos grasos saturados de cadena corta pueden ser considerados como "prematuros" ya que sirven como sustrato para la formación de los otros ácidos grasos y que en el proceso de condensación, el área de estos ácidos se ve disminuida (figura 5).

En la figura 1 se señala el porcentaje de la abundancia de los ácidos grasos para cada uno de los medios de cultivo. Se observó que el área del ácido palmitoleico (C16:1⁹) es menor a la del ácido cis 9-10 metilenoctadecanoico (C17:0 Δ) en los tres medios de cultivo y con respecto a los ácidos trans 9 octadecanoico y cis 9 octadecanoico (C18:1⁹-C18:1¹¹), los cuales son probablemente una mezcla de cis vaccénico y ácido oleico, que por las características de la columna del cromatógrafo no se pudieron separar, su área es menor que la del ácido cis 9-10 metilenoctadecanoico (C17:0 Δ). Con base en esto, en la etapa final de la fase de crecimiento exponencial la proporción de los ácidos cíclicos comenzó a incrementarse, mientras que la de los ácidos monoenoicos disminuyó, en dirección y tiempo del alargamiento de las cadenas de los ácidos grasos y rumbo a la fase de crecimiento estacionario de Klebsiella oxytoca ATCC 13102. Estos resultados concuerdan con las observaciones de Cronan y Fock (11), los cuales mencionan que el ácido C17:0 Δ y el ácido C19:0 Δ comienzan a formarse cuando el



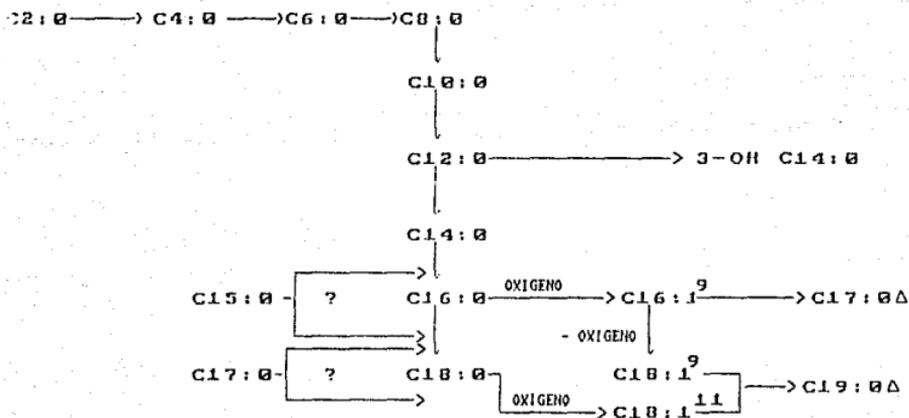


Figura 5. Vía biosintética de los ácidos grasos en bacterias, tomada de Thompson, G. I. 1968 (46).

cultivó entra en la fase estacionaria (cese del crecimiento del cultivo debido a la limitación de oxígeno y nutrientes). La ruta para la biosíntesis de estos ácidos, recientemente ha sido estudiada en detalle. Los resultados sugieren que los ácidos ciclopropanos se forman por una modificación postsintética de los ácidos grasos insaturados que están incorporados en los fosfolípidos de la membrana interna y membrana externa. La modificación del doble enlace cis se da porque un átomo de carbono se agrega a partir del grupo metilo de la S-adenosilmetionina para formar un anillo ciclopropano, ver reacciones de la ruta biosintética en apéndice (22) (31) (42) (46) (49). En la fase final del crecimiento exponencial los ácidos C17:0 A y C19:0 A de Klebsiella oxytoca ATCC 13182 estuvieron mejor representados por los valores altos de sus áreas en el medio agar nutritivo (tabla 5).

En la tabla 5 se observó que en el medio agar YFD, se obtuvieron los ácidos grasos insaturados con áreas muy pequeñas en relación a los otros dos medios de cultivo, la importancia biológica de estos ácidos en la estructura de la bacteria se discute más adelante. La formación de los ácidos grasos insaturados en K. oxytoca, hasta donde se sabe, no se ha reportado en otros trabajos. Sin embargo, se tiene un análisis detallado de su biosíntesis en Escherichia coli (11) (37).

A pesar de que los ácidos grasos C18:1⁷-C18:1¹¹ se obtuvieron como una mezcla, se supuso que el ácido C18:1¹¹ (cis vaccénico) sea el ácido más representativo de esta mezcla, por la razón de que los ácidos grasos insaturados con la configuración trans, son raros o no se presentan en bacterias (11). El ácido con la configuración cis (ácido cis vaccénico) se ha reportado como un ácido graso insaturado característico de la familia Enterobacteriaceae (6). Con esta aclaración, se procedió a extrapolar el esquema de biosíntesis de los ácidos grasos insaturados de E. coli (42), a la biosíntesis de los ácidos grasos insaturados de Klebsiella oxytoca ATCC 13182. Se sabe que en las bacterias, cualquier mecanismo ya sea aerobio o anaerobio es responsable para la biosíntesis de los ácidos grasos insaturados (11) (46). La ruta aerobia interviene en una modificación posterior de los ácidos grasos saturados totalmente

sintetizados, en tanto que en la anaerobia la insaturación, tiene lugar durante el alargamiento de la cadena de los ácidos grasos. Los ácidos grasos insaturados se forman en la ruta anaerobia por la deshidratación del compuesto 3-hidroxi-decanoil-ACP y por la adición y reducción de unidades de carbono del Malonil-ACP, se produce el ácido palmítico (C16:1⁷) y de éste, el ácido cis vaccénico (C18:1¹¹) (11). Lioret y Moyse (30), señalan que las bacterias que emplean la ruta anaerobia contienen ácido cis vaccénico, en lugar de ácido oleico, que es el producto de saturación directa del ácido estearico (18:0) por la ruta aerobia (46). Esto es una razón más que apoya la suposición de que el ácido C18:1¹¹ es el ácido graso insaturado más representativo en la mezcla y que posiblemente de acuerdo a lo mencionado por Lioret y Moyse (30), Klebsiella oxytoca ATCC 13182 sintetiza sus ácidos grasos insaturados por la ruta anaerobia.

Lennarz (29), menciona algunos trabajos sobre el efecto que tiene la biotina en los cultivos bacterianos, señala que las células deficientes en biotina les falta el ácido β -hidroximiriístico (3-OH C14:0) en la estructura del lípido A. Como se señaló anteriormente, la biotina en el medio agar YFD determinó la presencia de ácidos grasos saturados en la bacteria. La concentración de biotina en el medio agar YFD causó un aumento en el área del ácido β -hidroximiriístico a diferencia de los otros dos medios de cultivo. Sin embargo, no se sabe que efecto puede tener un cambio en el nivel del ácido β -hidroximiriístico en la estructura química del lípido A de la cepa de Klebsiella oxytoca ATCC 13182. Cronan y Koch (11), mencionan que el ácido β -hidroximiriístico forma parte de la estructura del lípido A de los lipopolisacáridos. Sin embargo, no se conoce el mecanismo que incorpora este ácido al lípido A.

Al determinar las diferencias significativas (ver el análisis de ANOVA en el apéndice) en el aspecto cuantitativo de las áreas de los ácidos grasos de Klebsiella oxytoca ATCC 13182, entre los tres medios de cultivo, se detectó que en el medio agar YFD, la mayoría de los ácidos grasos tuvieron diferencias significativas en sus áreas con respecto a las áreas obtenidas con los otros dos medios

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

de cultivo, por lo que el medio agar YFD podría dificultar el análisis de los ácidos grasos para llevar a cabo una identificación de la bacteria.

Guarnieri y Johnson (20), señalan que los ácidos grasos saturados lineales, los ácidos ciclopropanos y los ácidos insaturados constituyen elementos estructurales de los fosfolípidos de la membrana interna y de la membrana externa de las bacterias. Los fosfolípidos participan en forma activa en la bacteria, dan una característica elástica y semipermeable a las membranas, para llevar a cabo la incorporación de nutrientes, la estabilización de la forma celular, los procesos respiratorios y reproductivos de la bacteria. Cronan y Rodl (11), señalaron que las membranas bacterianas con ácidos grasos insaturados, por los enlaces cis o trans, son funcionales, pero aquellas que solo poseen ácidos grasos saturados no son funcionales, estas mutantes se lisan. La funcionalidad de la membrana requiere que la composición de los ácidos grasos esté balanceada. Con estos razonamientos, la integridad de la membrana del cultivo de Klebsiella oxytoca ATCC 13182 crecida en el medio agar YFD (figura 4), puede ser inestable, debido a que sus ácidos grasos son incompletos y sus áreas son más bajas que las obtenidas en los otros dos medios de cultivo. El uso de este medio de cultivo no se recomienda para los procesos de conservación de la bacteria y para la realización del análisis cromatográfico de los ácidos grasos totales de K. oxytoca, para su identificación.

Si la bacteria se creciera a una temperatura constante y en un solo tipo de medio de cultivo, la composición del perfil cromatográfico de los ácidos grasos a nivel cualitativo y cuantitativo sería único. Para determinar que la composición de los ácidos grasos es dependiente de la composición química del medio, la temperatura se mantuvo constante a 37°C, y la cosecha de la bacteria siempre fue a las 24 horas de incubación. Al realizar la comparación entre los tres medios, se observó que el medio nutritivo presenta características nutricionales ideales para realizar estudios de cromatografía de los ácidos grasos de Klebsiella y llevar a cabo su conservación en este medio.



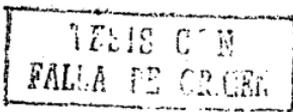
CONCLUSIONES.

1- El medio agar nutritivo es el ideal para realizar estudios de cromatografía gas-líquido y llevar a cabo la conservación de Klebsiella.

2- El perfil cromatográfico de los Ácidos grasos totales de Klebsiella oxytoca ATCC 13182 obtenido en el medio agar nutritivo es: ácido laurico (C12:0), ácido mirístico (C14:0), ácido pentadecanoico (C15:0), ácido β -hidromirístico (C-OH C14:0), ácido palmitoleico (C16:1⁹), ácido palmítico (C16:0), ácido cis 9-10 metilhexadecanoico (C17:0 Δ) ácido heptadecanoico (C17:0), ácido cis vaccénico (C18:1¹¹), ácido octadecanoico (C18:0) y el ácido cis 9-10 metilnoctadecanoico (C19:0 Δ).

3- Se propone al ácido cis 9-10 metilhexadecanoico (C17:0 Δ) como el ácido graso característico de Klebsiella oxytoca ATCC 13182 por poseer el segundo porcentaje de Área más alto y constante, después del ácido palmítico (C16:0).

4- La concentración de dextrosa y biotina juegan un papel importante en la formación de los ácidos grasos saturados lineales, en la de los ácidos insaturados y los ácidos ciclopropanos.



BIBLIOGRAFIA.

- 1 - American Type Culture Collection. (ATCC). 1982 CATALOGUE OF STRAINS.
- 2 - Amos, A. D. y McInerney, J. M. 1970. Growth of *Synthrophomonas wolfei* on unsaturated short chain fatty acids. Arch Microbiol 154:31-36.
- 3 - Asselineau, J. 1951. Sur la variation de la teneur en lipides du bacille tuberculeux, en fonction de l'age de la culture. Ann Inst Pasteur 3:306-309.
- 4 - Bagley, T.S., Seidler, J.R. y Brenner, J. D. 1981. *Atlebiella planticola* sp. nov.: A new species of Enterobacteriaceae found primarily in nonclinical environments. Curr microbiol 2:105-110.
- 5 - Bergen, T. 1984. Classification of Enterobacteriaceae. Beth Microbiol 14:1-41.
- 6 - Bergen, T. y Sorheim, K. 1984. Gas-liquid chromatography for the assay of fatty acid composition in Gram-negative bacilli as an aid to classification. Beth Microbiol 15:345-362.
- 7 - Bremer, H. y Dennis, P.P. 1987. Modulation of chemical composition and other parameters of the cell by growth rate. Am Soc Microbiol 2:1542-1557.
- 8 - Chang, E. L. Y. y Pate, L.J. 1981. Nutritional requirements of *Eutrophaga johnsonae* and some of its auxotrophic mutants. Curr Microbiol 4:235-240.
- 9 - Conrad, S. R., Gary, W.R. y Ankom, A.K. 1981. Fatty acids of *Pseudomonas aeruginosa* grown on media affecting polymyxin susceptibility. Curr Microbiol 4:231-234.
- 10 - Cowan, T. S., Steel, J. K. y Shaw, C. 1960. A classification of the *Atlebiella* group. J Gen Microbiol 23:601-612.
- 11 - Cronan, E. J. y Rock, D.CH. 1987. Biosynthesis of membrane lipids. Am Soc Microbiol 2:474-497.
- 12 - Davidoff, F. y Korn, D.E. 1963. The biosynthesis of fatty acids in the cellular slime mold, *Dicystotellium discoideum*. J Biol Chem 10:3210-3215.

- 13 - Difco, 1972. Product catalog and reference guide, Difco (USA).
- 14 - Doner, J.E. y Hamilton, J.G. 1971. The readily extracted lipids of *Pectoplasmia capsulatum* and *Chaetomyces dermatitidis*. Biochim Biophys Acta 231:465-478.
- 15 - Drucker, D. B. 1974. Chemotaxonomic fatty acid fingerprints. Can J Microbiol 20:1723-1728.
- 16 - Drucker, D. B. y Guen, I. 1973. Chemotaxonomic fatty acid fingerprints of bacteria growth with and without aeration. Can J Microbiol 19:247-250.
- 17 - Fujii, K. y Fukui, S. 1970. Hydrocarbon-utilizing microorganism. Relationship of fatty acid composition and biosynthesis to hydrocarbon substrate and to vitamin B₁₂ level in *Saccharobacterium simplex*. Eur J Biochem 17:352-360.
- 18 - Gaughran, E. R. L. 1947. The thermophilic microorganisms. Bacteriol Rev 11:197-225.
- 19 - Getz, S. G. 1970. Lipids in membrane development. Adv Lipid Res 8:175-203.
- 20 - Guarnieri, H. y Johnson, H.E. 1970. The essential fatty acids. Adv Lipid Res 8:115-174.
- 21 - Ingraham, J. 1937. Effect of temperature, pH, water activity, and pressure on growth. Am Soc Microbiol 2:1543-1554.
- 22 - Kates, H. 1964. Bacterial lipids. Adv Lipid Res 2:17-90.
- 23 - Kates, M., Adams, G. A. y Martin S. M. 1964. Lipids of *Yersinia marseillensis*. Can J Biochem 42:461-472.
- 24 - Komagata, K. y Suzuki, Ken-ichiro. 1987. Lipid and cell-wall analysis in bacterial systematics. Moth Microbiol 19:161-207.
- 25 - Krieg, H. K. 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 5th, Ed. Williams and Wilkins.
- 26 - Law, H. J., Zalkin, H. y Kaneshiro, T. 1963. Transmethylation reactions in bacterial lipids. Biochim Biophys Acta 70:143-151.
- 27 - Lehninger, L. A. 1982. Bioquímica. las bases moleculares de la estructura y función celular. 2^a ed., Ed. Omega, Barcelona, 206,55-568, 671-679.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- 28 - Lennarz, J. W. 1966. Lipid metabolism in the bacteria. Adv Lipid Res 4:175-225.
- 29 - Lennarz, J. W., Schwenbrandt, G. y Bloch, K. 1962. The biosynthesis of oleic and 10- methylstearic acids in *Mycobacterium phlei*. J Biol Chem 237:664-671.
- 30 - Lieret, C. y Moyses, A. 1963. Acid Metabolism: The Citric Acid Cycle and Other Cycles, p. 281-294. en H. Florentin y H. S. Mason (ed). Comparative Biochemistry A Comprehensive Treatise, vol 5. Academic Press, Inc., New York.
- 31 - Hart, G. A. y Ingraham, L. J. 1962. Effect of temperature on the composition of fatty acids in *Escherichia coli*. J Bacteriol 84:1260-1267.
- 32 - Massoudnia, G. y Scheer, R. E. 1962. The influence of medium on the chemical composition of *Staphylococcus dermatitidis*. Curr Microbiol 1:25-28.
- 33 - Mitruka, S. M. y Alexander, M. 1963. Rapid and sensitive detection of bacteria by gas chromatography. Appl Microbiol 16:636-640.
- 34 - Montgomerie, Z. J., Palmanson, M.G. y Guze, B. L. 1981. Fatty acid composition of membranes of L-forms of *Staphylococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus* cultured at different osmolalities. Curr Microbiol 5:301-304.
- 35 - Moss, C. W., Does, S. B. y Guarrant, G. O. 1980. Gas-liquid chromatography of bacterial fatty acids with a fused-silica capillary column. J Clin Microbiol 12:127-130.
- 36 - Moss, C. W., Lambert, H. A. y Merwin, W. H. 1974. Comparison of rapid methods for analysis of bacterial fatty acids. Appl Microbiol 28:60-65.
- 37 - Ohuyama, H., Seitch, H. y Hiramoto, S. 1963. Fatty acid synthetase system in the regulation of membrang lipid synthesis in *Escherichia coli* after shifts in temperature. J Biol Chem 238:4812-4817.
- 38 - Orskov, I. y Orskov, F. 1984. Serotyping of *Neisseria*. Meth Microbiol 14:143-164.
- 39 - Pascaud, H. 1963. Chromatographic investigations in fatty acid biosynthesis. Adv Lipid Res 1:253-264.



- 40 - Rivera, A. V. 1971. Análisis de los ésteres metílicos de los ácidos grasos celulares de seis especies de la Familia Enterobacteriaceae por cromatografía Gas-Líquido. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- 41 - Rye, J. A., Drozd, W. J., Jones, W.C. y Linton, D. J. 1968. Growth efficiency of *Xanthomonas campestris* in continuous culture. J Gen Microbiol 134:1055-1061.
- 42 - Scheverbrandt, G. y Bloch, K. 1962. Unsaturated fatty acids in microorganisms. J Biol Chem 7:2064-2066.
- 43 - Seidler, R. J., Knittel, H. D. y Brown, C. 1975. Potential pathogens in the environment: Cultural reactions and nucleic acid studies on *Mycobacteria* from clinical and environmental sources. Appl Microbiol 29:819-825.
- 44 - Shaw, R. 1956. The polyunsaturated fatty acids of microorganisms. Adv Lipid Res 4:107-174.
- 45 - Smith, F. P. 1969. The lipids of Mycoplasma. Adv Lipid Res 6:67-105.
- 46 - Thompson, G.A. 1980. The Regulation of Membrane Lipid Metabolism. Ed CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- 47 - Tornabene, G. T. 1973. Lipid composition of selected strains of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis*. Biochim Biophys Acta 306:173-185.
- 48 - Tornabene, G. T. 1985. Lipid analysis and the relationship to chemotaxonomy. Mol Microbiol 18:209-234.
- 49 - Vandem, B. T. y Cronan, E. J. 1989. Genetics and regulation of bacterial lipid metabolism. Annu Rev Microbiol 43:317-347.
- 50 - Verne, H. J. y Ehuller, E. G. 1963. Lipids of Actinomycetes. Adv Lipid Res 20:337-316.
- 51 - Wada, H., Fukunaga, N. y Sasaki, S. 1969. Mechanism of biosynthesis of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas* sp. Strain E-3, a psychrotrophic bacterium. J Bacteriol 8:4267-4271.

- 52 - White, D. C. y Tucker, A. N. 1969. Phospholipid metabolism during bacterial growth. J Lipid Res 10: 220-233.
- 53 - Yamamoto, K. D. y Seidler, J. E. 1981. Colonization of growing radish plants by clinical and nonclinical isolates of *Stenocella* inoculated on seeds. Curr Microbiol 5:287-294.

APENDICE

Composición química de los medios de cultivo utilizados en este trabajo.

AGAR NUTRITIVO (DIFCO) No de catálogo 0001-17-0

EXTRACTO DE CARNE	5 g.
PEPTONA DE CARNE	3 g.
AGAR	12 g
AGUA	1000 ml.

Análisis tipo (13).

Contenido en peptona (como N) calculado como sustancia seca: mínimo 80%-85%, nitrógeno amínico 2%-3.5%, creatinina (por cromatografía en capa fina): 0.5%-1%, cenizas de sulfato: máximo 20%, compuestos fosforados (como P): máximo 1%, metales pesados (Pb): máximo 0.0001%, calcio: máximo 0.1%, Mg.: 0.05%. Pérdida por desecación (4 horas a 105°C): máximo 5%, valor del pH (en solución al 2%): 6-7, nitrato: corresponde a metales pesados.

MEDIO ENRIQUECIDO: AGAR INFUSION CEREBRO CORAZON (BHI) (DIFCO) No de catálogo 0418-17-7

INFUSION DE CEREBRO DE TERNERA	200 g.
INFUSION DE CORAZON DE RES	250 g.
MEZCLA DE PEPTONAS	10 g.
DEXTROSA	2 g.
CLORURO DE SODIO	5 g.
FOSFATO DIPOTASICO	2.5 g.
AGAR	15 g.
AGUA	1000 g.

Análisis tipo (13).

Contenido de peptona (como N) calculado como sustancia seca: mínimo 90%, nitrógeno amínico: mínimo 3.5%, triptofano (por cromatografía en capa fina): 1-2%, cenizas de sulfato: máximo 5%, compuestos fosforados (como P): máximo 1%, metales pesados (Pb): máximo 0.1%. Pérdida por desecación (4 horas a 105°C): máximo 7%, solubilidad

conservando la transparencia: mínimo 2%, valor del pH (en solución al 2%): 6-7.

AGAR DEXTROSA, PEPTONA Y EXTRACTO DE LEVADURA (YFD).

Este medio fue elaborado en el laboratorio de Bacteriología de la Unidad de Investigación Interdisciplinaria para las Ciencias de la Salud y de la Educación de la Escuela Nacional de Estudios Profesionales de Iztacala.

EXTRACTO DE LEVADURA	3 g.
DEXTROSA	20 g.
PEPTONA	10 g.
AGAR	20 g.
AGUA	1000 ml.

Análisis tipo (13).

Contenido en peptona (como N) calculado como sustancia seca: mínimo 65%, proteína coagulable: no detectable, cenizas de sulfato: máximo 15%, compuestos fosforados (como P): máximo 25%, metales pesados (Pb): máximo 0.005%, calcio: máximo 0.005%, Hg.:máximo 5%, valor del pH (en solución al 2%): 5.5-7.0.

TABLE NO 2 Datos normalizados de los tiempos de retención y áreas de las órbitas grasas de Klatschella ovata ADCC 12182 crecidas en agar nutritivo.

CROM. No	TIEMPO										AREA											
	ACID0 GRAS0	C12:0	C14:0	C15:0	3-OH C14:0 (% C15)	C16:1	C16:0	C17:0	* C17:0	C18:1	C18:0	C19:0 *	C12:0	C14:0	C15:0	3-OH C14:0 (% C15)	C16:1	C16:0	C17:0 *	C17:0	C18:1	C18:0
1	42.54	68.99	83.72	89.11	95.89	100	111.69	113.85	125.22	128.4	140.57	1.08	6.06	2.59	0.94	14.74	100	95.89	2.83	29.83	2.03	25.45
2	42.91	69.58	84.52	90.1	95.78	100	112.12	114.79	125.6	129.61	141.46	1.1	6.77	3.48	0.99	15.78	100	95.89	1.51	25.9	1.79	17.28
3	42.92	69.59	84.51	89.96	97.36	100	112.12	114.64	125.89	129.62	141.46	2.36	10.77	2.2	3.55	15.61	100	51.12	3.34	25.57	1.67	17.09
4	42.86	69.43	84.3	89.75	95.6	100	111.99	114.5	125.63	129.21	141.09	1.16	7.59	2.66	1.22	17.14	100	56.66	2.65	28.62	1.36	16.16
5	42.79	69.39	84.27	89.75	95.56	100	112.07	114.53	125.64	129.23	141.21	0.93	5.78	2.63	0.96	15.52	100	69.44	2.97	27.07	2.01	25.44
6	42.45	68.87	83.55	88.58	94.95	100	111.6	113.61	124.92	128.82	140.24	0.94	5.89	3.02	0.96	14.59	100	61.29	3.5	27.3	2.2	22.68
7	42.43	68.85	83.53	88.54	94.95	100	111.77	113.63	125	128.86	140.23	1.33	6.88	3.01	1.46	15.02	100	64.21	2.87	30.37	1.85	22.95
8	42.93	69.4	84.49	89.97	95.76	100	112.1	114.72	125.82	129.48	141.37	1.28	6.42	3.02	1.07	15.96	100	60.15	3.18	26.42	1.92	20.83
9	42.82	69.67	83.81	89.24	95.22	100	111.89	113.92	125.24	129.5	140.59	0.91	6.49	3.18	0.89	14.78	100	68.5	3.17	26.04	2.28	21.82
10	42.33	68.57	83.15	88.5	94.59	100	111.72	113.2	124.61	127.54	139.97	0.64	5.44	2.62	1.2	11.96	100	61.91	3.3	24.4	2.21	20.94
11	42.55	69.02	83.75	89.15	95.14	100	111.67	113.69	125.19	128.44	140.57	1.16	6.5	3.13	1.16	14.82	100	61.73	2.99	29.68	2.19	22.19
12	42.7	69.24	84.12	89.52	95.45	100	111.92	114.3	125.43	128.97	140.95	0.82	5.28	2.66	0.99	14.46	100	62.73	3.34	24.51	1.86	20.96
13	42.57	69.02	83.73	89.15	95.14	100	111.81	113.89	125.14	128.37	140.49	0.82	6.56	2.9	1.25	15.06	100	60.74	2.81	27.38	1.99	20.45
14	42.92	69.44	84.37	89.6	95.84	100	112.05	114.56	125.66	129.24	141.16	0.94	5.95	3.26	1.84	16.22	100	65.48	3.61	28.46	1.92	22.02
15	42.84	69.12	83.92	89.33	95.3	100	111.67	114.42	125.34	129.6	140.55	0.56	4.89	3	0.6	17.72	100	62.39	3.52	34.67	2.02	22.21
16	42.85	69.46	84.26	89.61	95.62	100	112.07	114.56	125.69	129.28	141.16	0.79	5.86	3.51	1.01	16.82	100	65.3	3.56	29.82	1.73	22.46
17	42.81	69.39	84.23	89.65	95.52	100	111.97	114.4	125.6	129.08	141.01	0.8	5.8	3.84	0.96	17.85	100	63.45	2.78	21.92	1.91	22.89
18	42.74	69.39	84.13	89.65	95.44	100	111.97	114.3	125.54	129.03	140.89	0.6	5.06	3.16	0.55	16.82	100	64.46	3.45	34.05	1.92	22.89
19	42.84	69.53	84.41	89.65	95.71	100	112.05	114.6	125.77	129.38	141.26	0.91	6.24	3.3	1.05	20.49	100	61.75	3.54	33.26	1.79	18.14
20	42.66	69.23	84.19	89.5	95.48	100	111.96	114.27	125.53	128.92	141.03	0.64	5.09	2.99	0.45	20.47	100	59.7	3.52	36.1	2.02	21.5
21	42.69	69.18	83.94	89.35	95.44	100	112.05	114.49	125.57	128.67	140.77	1.03	6.02	4.49	0.69	17	100	61.21	4.99	33.1	2.77	20.21

No 3 Datos normalizados de los (líneas de retención y áreas de los Actinos grupos de Ejelella cavoca ATCC 13182) crecida en agar 1%.

No. GRABO	IEMV										AREA											
	C12:0	C12:0	C15:0	3-0N	C16:1	C16:0	C17:0	C17:0	C18:1	C18:0	C19:0	C12:0	C14:0	C15:0	3-0N	C16:1	C16:0	C17:0	C17:0	C18:1	C18:0	C19:0
1	42.21	69.44	84.57	89.72	95.74	100	112.81	115.87	125.67	129.4	141.25	2.1	11.92	5.58	1.74	34.43	100	48.26	1.41	20.77	1.14	5.82
2	43.1	69.75	84.89	90.27	95.93	100	112.14	115	125.95	129.76	141.56	2.76	17.83	5.44	1.69	32.11	100	44.37	1	15.26	1	4.81
3	42.75	69.24	84.18	89.63	95.6	100	111.83	114.34	123.48	129.02	140.63	1.65	9.09	3.69	1.32	29.95	100	52.19	1.29	23.34	1.58	6.91
4	42.65	69.23	84.81	89.44	95.5	100	111.83	114.12	121.26	126.78	140.55	1.51	11.65	3.77	1.46	26.95	100	53.45	1.35	21.26	1.22	6.93
5	42.73	69.31	84.12	89.54	95.57	100	111.93	114.29	125.44	128.97	140.78	1.52	9.96	3.42	1.28	29.82	100	53.21	1.6	23.14	1.28	6.71
6	42.55	69.1	83.33	89.22	95.36	100	111.79	113.89	123.13	126.46	140.34	1.3	30.88	5.25	1.26	25.57	100	53.84	1.59	23.89	1.41	7.55
7	42.53	69.89	83.85	89.29	95.42	100	111.81	113.87	125.27	128.62	140.45	0.97	8.73	3.92	0.88	28.83	100	53.22	1.27	24.94	1.14	6.87
8	42.72	69.3	84.17	89.61	95.55	100	112	114.1	125.54	129.12	140.96	0.96	8.61	4.43	1.09	22.48	100	55.76	1.29	19.96	1.26	7.45
9	42.77	69.39	84.27	89.74	95.59	100	112.83	114.54	125.62	129.25	141.13	1.84	9.49	3.18	1.41	19.33	100	57.15	1.85	17.58	1.47	8.63
10	42.64	69.48	84.38	89.85	95.7	100	112.89	114.65	125.71	129.45	141.24	1.11	6.49	3.73	0.84	19.27	100	57.1	1.27	19.11	1.31	8.82
11	42.73	69.32	84.18	89.62	95.53	100	112	114.24	125.51	129.14	141.82	0.97	8.69	3.47	1.06	16.27	100	58.51	1.16	18.82	1.31	8.56
12	42.62	69.17	84	89.43	95.45	100	111.92	114.18	125.37	128.86	140.75	1.01	8.62	3.66	1	23.35	100	56.75	1.23	20.84	1.23	8.18
13	42.68	69.82	83.86	89.19	95.27	100	111.84	113.83	123.81	128.51	140.41	0.92	8.13	3.15	1.04	21.52	100	57.74	1.15	19.62	1.28	8.07
14	42.84	69.44	84.36	89.82	95.66	100	112.81	114.63	125.15	129.36	141.18	1.86	9.66	3.21	1.47	20.99	100	54.74	1.59	18.34	1.32	7.4
15	42.88	69.22	84.85	89.55	95.53	100	111.86	114.23	125.44	129.93	140.75	0.99	6.58	4.25	0.87	29.91	100	52.87	1.47	25.89	1.21	6.96
16	42.78	69.25	84.25	89.72	95.6	100	111.82	114.6	125.58	129.21	141.85	1.01	8.54	3.22	1.25	21.69	100	54.57	1.67	21.81	1.18	8.63
17	42.88	69.25	84.82	89.57	95.5	100	111.94	114.3	125.47	129.99	140.65	1.84	8.98	3.89	0.9	25.11	100	55.15	1.82	17.94	1.15	7.89
18	42.62	69.98	83.49	89.15	95.23	100	111.77	113.81	125.83	128.38	140.27	1.24	9.3	3.92	1.55	16.43	100	53.13	1.31	23.64	1.1	7.21
19	42.71	69.31	84.19	89.46	95.6	100	111.97	114.43	125.59	129.15	141	1.27	9.22	3.17	1.19	27.99	100	53.67	1.41	25.46	1.21	7.47
20	42.64	69.46	84.34	89.83	95.7	100	112.85	114.63	125.72	129.37	141.23	1.25	9.21	3.79	1.59	24.34	100	53.65	1.31	23.43	1.23	7.65
21	42.69	69.45	84.4	89.89	95.85	100	112.8	114.74	125.81	129.55	141.14	2.22	12.62	4.47	1.14	26.56	100	53.93	1.99	16.24	1.27	8.2
22	42.83	69.84	84.6	89.17	95.9	100	112.8	114.97	126.82	129.52	141.68	1.18	16.38	6.14	0.97	19.61	100	44.57	1.87	14.95	1.27	3.69
23	42.66	69.23	84.67	89.52	95.55	100	111.91	114.25	125.45	129.96	140.8	1.13	9.23	5.82	0.91	16.87	100	51.81	1.86	25.81	1.04	6.58
24	42.64	69.21	84.91	89.5	95.53	100	111.82	114.19	125.35	129.85	140.88	0.92	9.3	1.87	0.76	29.92	100	48.82	0.97	26.22	1.06	5.66
25	42.72	69.29	84.17	89.8	95.5	100	111.99	114.42	125.49	129.15	141.83	1.18	10.29	5.49	0.75	17.26	100	55.29	1.41	14.55	1.11	7.96
26	42.75	69.34	84.22	89.76	95.55	100	112	114.51	125.61	129.86	141.13	1.29	9.31	4.58	1.74	21.26	100	52.1	1.37	17.95	1.49	7.11
27	42.7	69.27	84.16	89.64	95.49	100	111.97	114.91	125.52	129.16	141.84	1.2	10.3	3	1.23	28.67	100	51.81	0.99	15.95	1.24	6.6
28	42.84	69.24	84.87	89.63	95.49	100	111.96	114.56	125.43	129.85	140.89	1.37	10.71	3.38	1.38	29.2	100	51.62	1.83	15.19	1.29	6.26
29	42.66	69.26	84.16	89.66	95.58	100	111.97	114.44	125.6	129.19	141.89	1.31	11.88	1.77	0.84	25.76	100	56.2	0.66	20.8	1.41	7.35
30	42.82	69.45	84.4	89.89	95.71	100	112.13	114.79	125.84	129.58	141.45	1.11	10.1	3.79	0.94	15.85	100	57.49	1.82	13.93	1.52	8.1
31	42.81	69.43	84.39	89.84	95.72	100	112.87	114.75	125.79	129.53	141.42	1.16	9.97	2.23	1.37	23.85	100	51.89	0.84	16.91	1.52	6.16
32	42.75	69.36	84.26	89.71	95.65	100	112.81	114.59	125.88	129.36	141.26	1.84	9.96	3.44	1.56	25.24	100	48.25	1.35	17.74	1.31	6.6
33	42.75	69.27	84.14	89.11	95.44	100	111.97	114.39	125.37	129.89	140.94	0.79	8.41	2.19	0.81	11.22	100	54.46	0.81	11.54	1.63	7.86
34	42.82	69.52	84.48	89.76	95.75	100	112.12	114.85	125.85	129.62	141.46	0.32	9.28	3.58	0.81	12.91	100	55.4	1.17	12.41	1.73	7.67
35	42.82	69.42	84.36	89.73	95.69	100	112.81	114.7	125.73	129.47	141.33	1.16	10.29	2.76	0.82	23.83	100	48.62	0.94	17.48	1.28	5.83
36	42.81	69.44	84.38	89.74	95.76	100	112.82	114.73	125.8	129.52	141.38	1.52	12.11	2.91	1.68	11.7	100	43.36	0.39	19.75	1.86	4.4
37	42.83	69.42	84.33	89.73	95.6	100	112.81	114.65	125.69	129.45	141.33	1.31	10.4	3.25	1.47	34.43	100	58.61	1.11	19.91	1.67	12.15
38	42.83	69.54	84.49	89.17	95.81	100	112.13	114.85	125.92	129.67	141.53	1.49	9.49	4.11	3.29	28.48	100	47.82	2.64	20.37	1.37	6.41
39	42.82	69.18	84.29	89.66	95.57	100	111.79	114.21	125.44	129.91	140.75	1.55	10.8	5.85	2.55	25.22	100	43.15	2.52	22.13	1.33	6.44
40	42.7	69.28	84.22	89.83	95.6	100	111.95	114.44	125.52	129.18	141.82	1.15	8.67	4.86	1.49	27.33	100	47.37	2.62	19.13	1.27	5.86
41	42.77	69.43	84.37	89.83	95.76	100	112.87	114.74	125.84	129.54	141.42	1.82	10.81	4.76	3.11	26.49	100	44.6	1.85	19.99	1.39	6.66
42	42.83	69.47	84.42	89.86	95.82	100	112.86	114.78	125.91	129.62	141.49	1.5	9.75	6.95	2.28	33.43	100	41.33	2.91	24.3	1.2	4.51
43	42.82	69.47	84.42	89.86	95.81	100	111.89	114.33	125.56	129.86	140.95	1.87	8.43	4.64	1.26	25.72	100	44.1	1.75	25.73	1.21	5.18
44	42.82	69.19	84.1	89.74	95.61	100	111.82	114.1	125.64	129.29	141.16	1.3	5.5	4.13	2.37	35.17	100	48.11	1.62	17.56	1.49	1.1
45	42.87	69.29	84.24	89.87	95.67	100	112.83	114.56	125.73	129.36	141.25	1.77	10.67	6.8	3.76	29.86	100	49.74	2.67	20.84	1.67	6.57
46	42.89	69.39	84.18	89.83	95.6	100	111.99	114.49	125.66	129.27	141.15	3.39	8.19	4.53	2.3	24.86	100	43.74	1.74	22.42	1.43	6.11
47	42.82	69.13	84.82	89.69	95.85	100	111.91	114.32	125.49	129.87	141.87	1.19	8.36	4.26	1.7	25.86	100	49.82	1.78	18.1	1.57	6.52
48	42.83	69.43	84.44	89.12	95.5	100	112.12	114.87	125.89	129.74	141.67	1.77	11.65	6.47	1.44	34.43	100	34.82	2.31	21.16	1.1	2.88
49	42.44	69.81																				

Análisis de varianza para comparar las áreas de los picos de los ácidos grasos de Klebsiella oxytoca ATCC 13182 crecida en tres medios de cultivo.

Variable: ácido láurico

Fuente de variación.	Suma de cuadrados	Grados de libertad.	Cuadrados medios.	F	Probabilidad
tratamientos	48.976	2	24.488	36.491	4.688E-13
error	66.251	118	.561		
total	187.227	120			

Medio de cultivo.	- X	No de datos	Prueba de Tukey:	
agar BHI	1.330	58	agar BHI vs agar YPD	*
agar YPD	2.488	58	agar BHI vs agar Nutritivo	(n.s)
agar Nutritivo	1.818	21	agar YPD vs agar Nutritivo	*

Variable: ácido mirístico

Fuente de variación.	Suma de cuadrados	Grado de libertad.	Cuadrados medios.	F	Probabilidad
tratamientos	2869.898	2	1434.945	368.991	.000E+00
error	338.966	118	2.885		
total	2488.856	120			

Medios de cultivo.	- X	No de datos	Prueba de Tukey:	
agar BHI	9.981	58	agar BHI vs agar YPD	*
agar YPD	16.886	58	agar BHI vs agar Nutritivo	(n.s)
agar Nutritivo	6.328	21	agar YPD vs agar Nutritivo	*

* = diferencia significativa $\alpha=0.05$, n.s = diferencia no significativa.

Análisis de varianza para comparar las áreas de los picos de los ácidos grasos de Klebsiella oxytoca ATCC 13182 crecida en tres medios de cultivo.

Variable: ácido pentadecanoico

Fuente de variación.	Suma de cuadrados	Grados de libertad.	Cuadrados medios.	F	Probabilidad
tratamientos	25.515	1	25.515	11.750	1.026E-03
error	149.729	69	2.170		
total	175.244	70			
Medio de cultivo.	- X	No de datos	Prueba de Tukey:		
agar BHI	4.435	50	agar BHI vs agar Nutritivo (n.s)		
agar Nutritivo	3.122	21			

Variable: ácido 3-hidroxitetradecanoico

Fuente de variación.	Suma de cuadrados	Grado de libertad.	Cuadrados medios.	F	Probabilidad
tratamientos	115.103	2	57.591	34.939	1.210E-12
error	194.506	118	1.648		
total	309.609	120			
Medios de cultivo.	- X	No de datos	Prueba de Tukey:		
agar BHI	1.409	50	agar BHI vs agar YPD *		
agar YPD	3.375	50	agar BHI vs agar Nutritivo (n.s)		
agar Nutritivo	1.202	21	agar YPD vs agar Nutritivo *		

* = diferencia significativa $\alpha=0.05$, n.s = diferencia no significativa.

TEME CON
 FALLA DE ORIGEN

Análisis de varianza para comparar las áreas de los picos de los ácidos grasos de Klebsiella oxytoca ATCC 13182 crecida en tres medios de cultivo.

Variable: Acido palmitoleico

Fuente de variación.	Suma de cuadrados	Grados de libertad.	Cuadrados medios.	F	Probabilidad
tratamientos	18773.653	2	5306.826	362.500	.000E+00
error	1753.587	118	14.860		
total	12527.159	120			
Medio de cultivo.	- X	No de datos	Prueba de Tukey:		
agar BHI	26.217	50	agar BHI vs agar YPD	*	
agar YPD	5.459	50	agar BHI vs agar Nutritivo	(n.s)	
agar Nutritivo	16.132	21	agar YPD vs agar Nutritivo	*	

Variable: Acido cis 9-10 metilhexadecanoico

Fuente de variación.	Suma de cuadrados	Grado de libertad.	Cuadrados medios.	F	Probabilidad
tratamientos	1845.757	2	922.879	34.876	2.000E-12
error	3195.749	118	27.083		
total	5041.507	120			
Medios de cultivo.	- X	No de datos	Prueba de Tukey:		
agar BHI	58.741	50	agar BHI vs agar YPD	(n.s)	
agar YPD	54.806	50	agar BHI vs agar Nutritivo	*	
agar Nutritivo	61.868	21	agar YPD vs agar Nutritivo	*	

* = diferencia significativa $\alpha=0.05$, n.s = diferencia no significativa.

Análisis de varianza para comparar las áreas de los picos de los ácidos grasos de Klebsiella oxytoca ATCC 13182 crecida en tres medios de cultivo.

Variable: Acido heptadecanoico

Fuente de variación.	Suma de cuadrados	Grados de libertad.	Cuadrados medios.	F	Probabilidad
tratamientos	41.500	1	41.500	89.610	1.300E-13
error	32.823	69	.464		
total	73.611	70			
Medio de cultivo.	- X	No de datos		Prueba de Tukey:	
agar BHI	1.520	50		agar BHI vs agar Nutritivo (n.s)	
agar Nutritivo	3.197	21			

Variable: Acido trans 9, cis 11 octadecanoico

Fuente de variación.	Suma de cuadrados	Grado de libertad.	Cuadrados medios.	F	Probabilidad
tratamientos	11211.090	2	5605.945	699.154	.000E+00
error	946.145	118	8.018		
total	12158.035	120			
Medios de cultivo.	- X	No de datos		Prueba de Tukey:	
agar BHI	19.781	50		agar BHI vs agar YPD *	
agar YPD	4.645	50		agar BHI vs agar Nutritivo (n.s)	
agar Nutritivo	29.990	21		agar YPD vs agar Nutritivo *	

* = diferencia significativa $\alpha=0.05$, n.s = diferencia no significativa.

Análisis de varianza para comparar las áreas de los picos de los ácidos
grasos de Klebsiella oxytoca ATCC 13182 crecida en tres medios de cultivo.

Variable: Ácido octadecanoico

Fuente de variación.	Suma de cuadrados	Grados de libertad.	Cuadrados medios.	F	Probabilidad
tratamientos	11.189	2	5.594	28.818	1.775E-88
error	31.458	118	.267		
total	42.558	120			

Medio de cultivo.	- X	No de datos	Prueba de Tukey:		
agar BHI	1.338	58	agar BHI vs agar YPD		(n.s)
agar YPD	1.868	58	agar BHI vs agar Nutritivo		(n.s)
agar Nutritivo	2.888	21	agar YPD vs agar Nutritivo		(n.s)

Variable: Ácido cis 9-18 metilenoctadecanoico

Fuente de variación.	Suma de cuadrados	Grado de libertad.	Cuadrados medios.	F	Probabilidad
tratamientos	5377.491	2	2688.745	757.688	.888E+08
error	418.786	118	3.549		
total	5796.276	120			

Medios de cultivo.	- X	No de datos	Prueba de Tukey:		
agar BHI	6.716	58	agar BHI vs agar YPD		*
agar YPD	19.167	58	agar BHI vs agar Nutritivo		*
agar Nutritivo	22.245	21	agar YPD vs agar Nutritivo		(n.s)

* = diferencia significativa $\alpha = .05$, n.s = diferencia no significativa.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Análisis de varianza para comparar los tiempos de retención de los ácidos grasos de Klebsiella oxytoca ATCC 13182 crecida en tres medios de cultivo.

Variable: Acido láurico

Fuente de variación.	Suma de cuadrados	Grados de libertad.	Cuadrados medios.	F	Probabilidad
tratamientos	118.215	2	55.187	1879.435	.808E+08
error	3.468	118	.829		
total	113.675	120			
Medio de cultivo.	- X	No de datos	Prueba de Tukey:		
agar BHI	42.785	58	agar BHI vs agar YPD	(n.s)	
agar YPD	44.642	58	agar BHI vs agar Nutritivo	(n.s)	
agar Nutritivo	42.781	21	agar YPD vs agar Nutritivo	(n.s)	

Variable: Acido mirístico

Fuente de variación.	Suma de cuadrados	Grado de libertad.	Cuadrados medios.	F	Probabilidad
tratamientos	72.471	2	36.236	99.919	.808E+08
error	42.793	118	.363		
total	115.264	120			
Medios de cultivo.	- X	No de datos	Prueba de Tukey:		
agar BHI	69.319	58	agar BHI vs agar YPD	(n.s)	
agar YPD	78.688	58	agar BHI vs agar Nutritivo	(n.s)	
agar Nutritivo	68.789	21	agar YPD vs agar Nutritivo	(n.s)	

* = diferencia significativa $\alpha = .05$, n.s = diferencia no significativa.

Análisis de varianza para comparar los tiempos de retención de los ácidos grasos de Klebsiella oxytoca ATCC 13182 crecida en tres medios de cultivo.

Variable: Acido pentadecanoico

Fuente de variación.	Suma de cuadrados	Grados de libertad.	Cuadrados medios.	F	Probabilidad
tratamientos	.377	1	.377	5.149	.0264
error	5.052	69	.073		
total	5.429	70			
Medio de cultivo.	- X	No de datos	Prueba de Tukey:		
agar BHI	04.203	50	agar BHI vs agar Nutritivo (n.s)		
agar Nutritivo	04.843	21			

Variable: Acido 3-hidroxitetradecanoico

Fuente de variación.	Suma de cuadrados	Grado de libertad.	Cuadrados medios.	F	Probabilidad
tratamientos	19.069	2	9.535	33.455	3.890E-12
error	33.630	118	.285		
total	52.699	120			
Medios de cultivo.	- X	No de datos	Prueba de Tukey:		
agar BHI	90.004	50	agar BHI vs agar YPD (n.s)		
agar YPD	90.560	50	agar BHI vs agar Nutritivo (n.s)		
agar Nutritivo	89.437	21	agar YPD vs agar Nutritivo (n.s)		

* = diferencia significativa $\alpha = .05$, n.s = diferencia no significativa.



Análisis de varianza para comparar los tiempos de retención de los ácidos grasos de Klebsiella oxytoca ATCC 13102 crecida en tres medios de cultivo.

Variable: Acido palmitoleico

Fuente de variación.	Suma de cuadrados	Grados de libertad.	Cuadrados medios.	F	Probabilidad
tratamientos	4.104	2	2.092	29.898	5.336E-11
error	8.404	118	.072		
total	12.668	120			

Medio de cultivo.	- X	No de datos	Prueba de Tukey:	
agar BHI	95.685	50	agar BHI vs agar YPD	(n.s)
agar YPD	95.929	50	agar BHI vs agar Nutritivo	(n.s)
agar Nutritivo	95.468	21	agar YPD vs agar Nutritivo	(n.s)

Variable: Acido cis 9-10 metilhexadecanoico

Fuente de variación.	Suma de cuadrados	Grado de libertad.	Cuadrados medios.	F	Probabilidad
tratamientos	2.769	2	1.385	126.008	.000E+00
error	1.288	118	.011		
total	4.057	120			

Medios de cultivo.	- X	No de datos	Prueba de Tukey:	
agar BHI	111.978	50	agar BHI vs agar YPD	(n.s)
agar YPD	111.665	50	agar BHI vs agar Nutritivo	(n.s)
agar Nutritivo	111.956	21	agar YPD vs agar Nutritivo	(n.s)

* = diferencia significativa $\alpha = .05$, n.s = diferencia no significativa.

Análisis de varianza para comparar los tiempos de retención de los ácidos grasos de Klebsiella oxytoca ATCC 13102 crecida en tres medios de cultivo.

Variable: Acido heptadecanoico

Fuente de variación.	Suma de cuadrados	Grados de libertad.	Cuadrados medios.	F	Probabilidad
tratamientos	.933	1	.933	0.192	5.565E-03
error	7.856	69	.114		
total	8.788	70			
Medio de cultivo.	- X	No de datos	Prueba de Tukey:		
agar BHI	114.468	58			
agar Nutritivo	114.217	21	agar BHI vs agar Nutritivo (n.s)		

Variable: Acido trans 9, cis 11 octadecanoico

Fuente de variación.	Suma de cuadrados	Grado de libertad.	Cuadrados medios.	F	Probabilidad
tratamientos	24.692	2	12.346	156.279	.000E+00
error	9.322	118	.079		
total	34.014	120			
Medios de cultivo.	- X	No de datos	Prueba de Tukey:		
agar BHI	125.586	58	agar BHI vs agar YPD (n.s)		
agar YPD	124.635	58	agar BHI vs agar Nutritivo (n.s)		
agar Nutritivo	125.456	21	agar YPD vs agar Nutritivo (n.s)		

* = diferencia significativa $\alpha = .05$, n.s = diferencia no significativa.

Análisis de varianza para comparar los tiempos de retención de los ácidos grasos de Klebsiella oxytoca ATCC 13182 crecida en tres medios de cultivo.

Variable: ácido octadecanoico

Fuente de variación.	Suma de cuadrados	Grados de libertad.	Cuadrados medios.	F	Probabilidad
tratamientos	25.196	2	12.598	85.593	.808E+08
error	17.368	118	.147		
total	42.563	120			

Medio de cultivo.	- X	No de datos	Prueba de Tukey:	
agar BHI	129.192	50	agar BHI vs agar YPD	(n.s)
agar YPD	128.195	58	agar BHI vs agar Nutritivo	(n.s)
agar Nutritivo	128.836	21	agar YPD vs agar Nutritivo	(n.s)

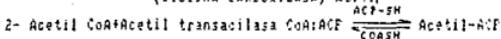
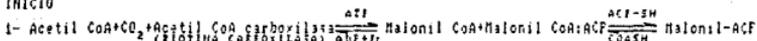
Variable: ácido cis 9-10 metilenoctadecanoico

Fuente de variación.	Suma de cuadrados	Grado de libertad.	Cuadrados medios.	F	Probabilidad
tratamientos	54.972	2	27.486	231.231	.808E+08
error	14.826	118	.119		
total	68.998	120			

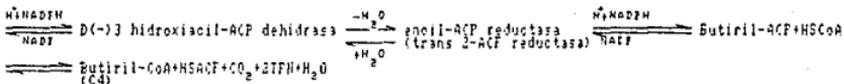
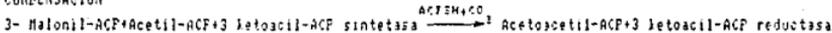
Medios de cultivo.	- X	No de datos	Prueba de Tukey:	
agar BHI	141.852	58	agar BHI vs agar YPD	(n.s)
agar YPD	139.633	58	agar BHI vs agar Nutritivo	(n.s)
agar Nutritivo	148.861	21	agar YPD vs agar Nutritivo	(n.s)

* = diferencia significativa $\alpha = .05$, n.s = diferencia no significativa.

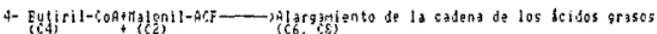
INICIO



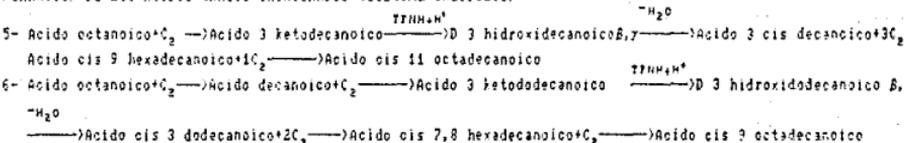
CONDENSACION



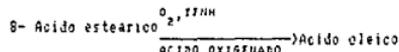
ALARGAMIENTO DE LOS ACIDOS GRASOS SATURADOS



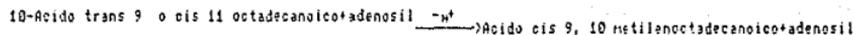
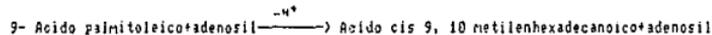
FORMACION DE LOS ACIDOS GRASOS INSATURADOS (sistema anaerobio)



(sistema aerobio)



FORMACION DE ACIDOS CICLOPROFANOS

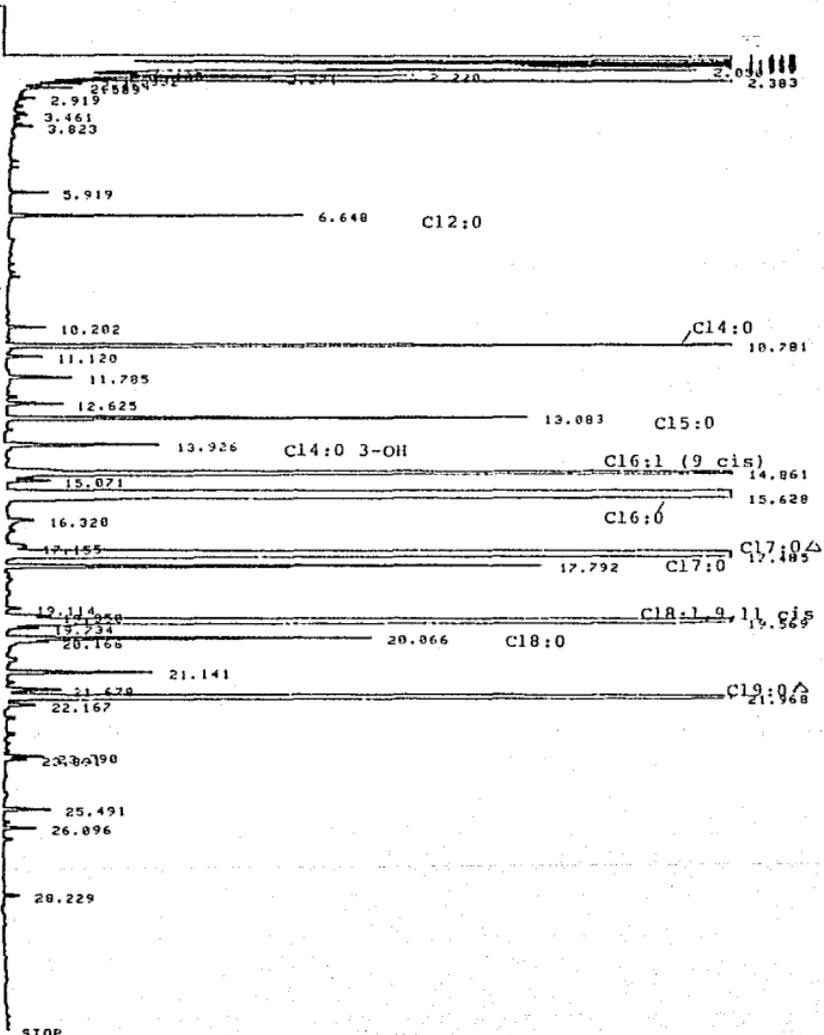


Reacciones de la biosíntesis de los ácidos grasos de bacterias.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

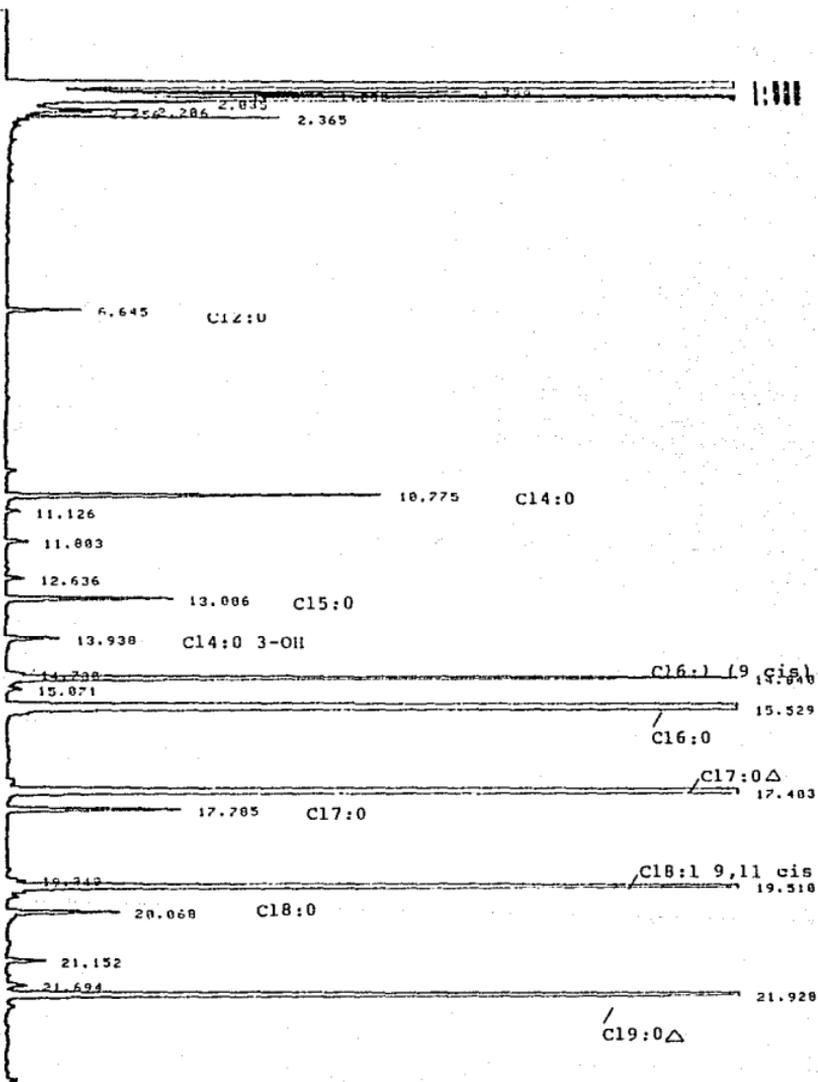
CROMATOGRAMAS GAS-LIQUIDO DE LOS ACIDOS GRASOS
DERIVADOS DE Klebsiella oxytoca ATCC 13182
CRECIDA EN AGAR NUTRITIVO.

* RUN # 3 JAN 5. 1991 17:37:15
START

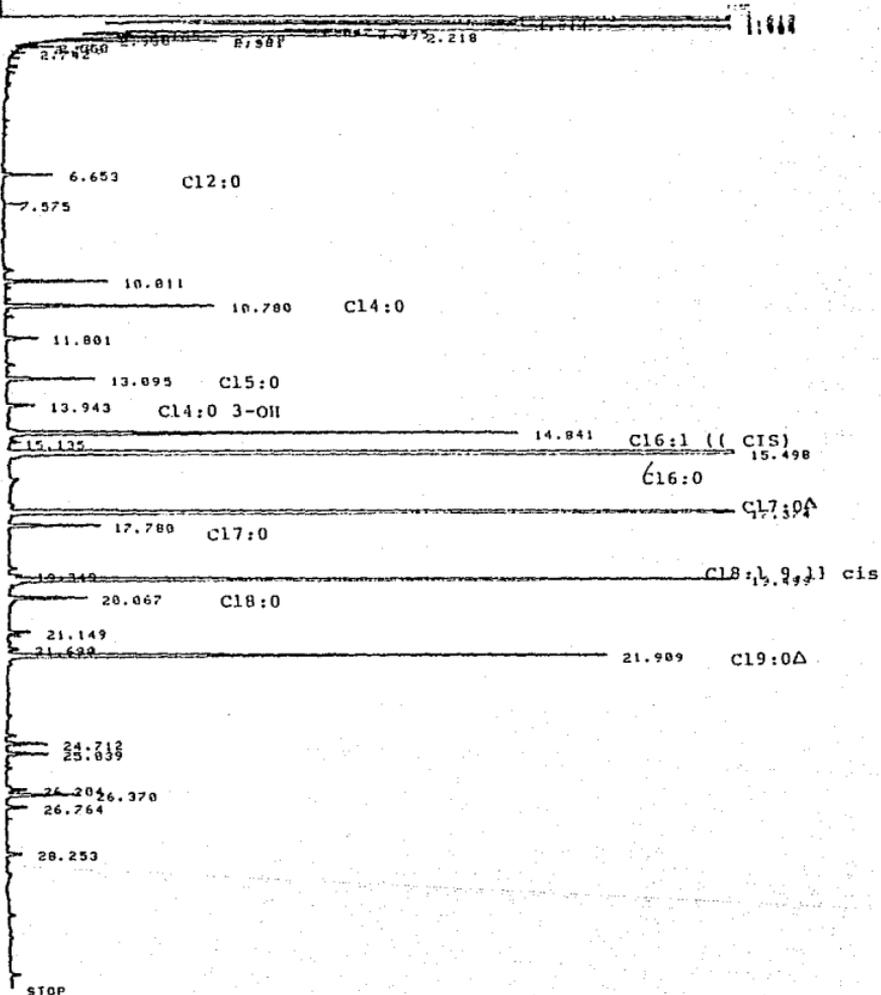


STOP

* RUN # 3 FEB 1. 1991 13:52:51
START



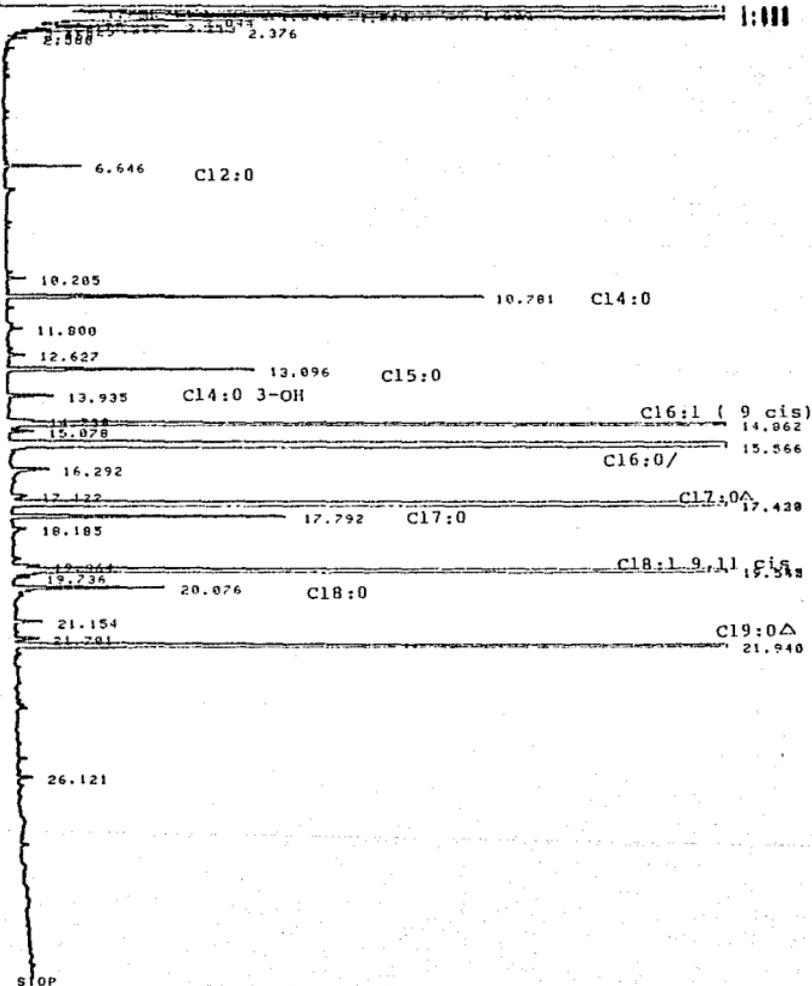
START



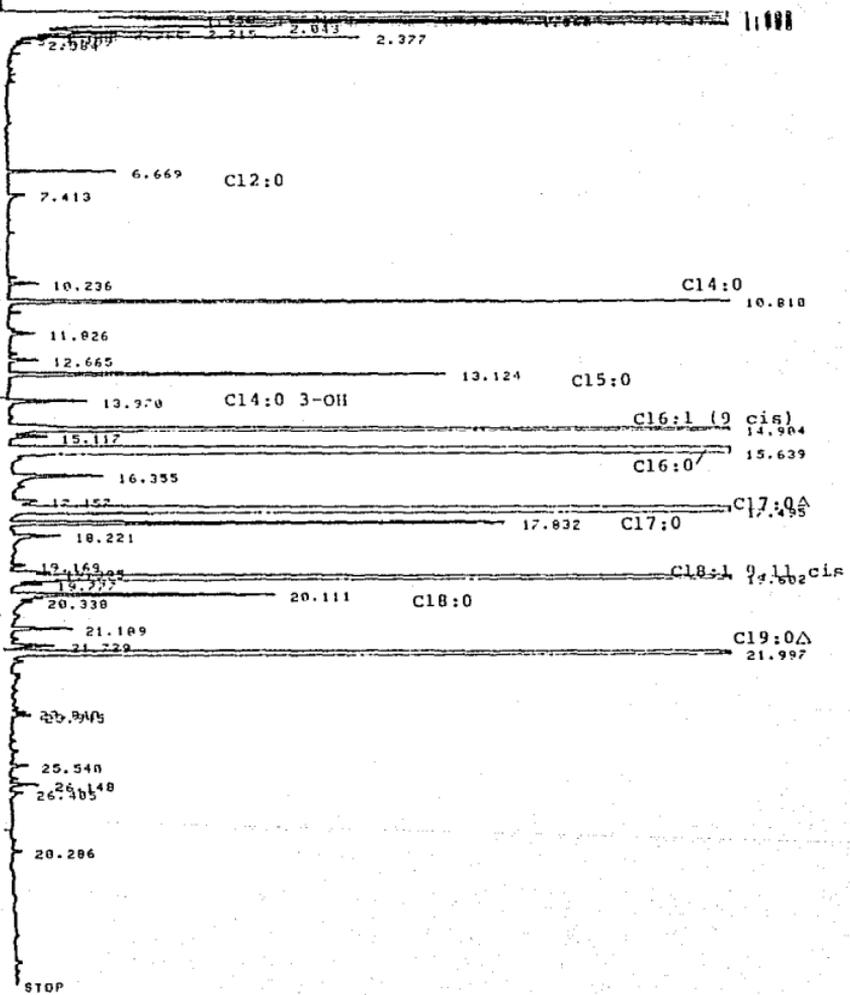
STOP

START

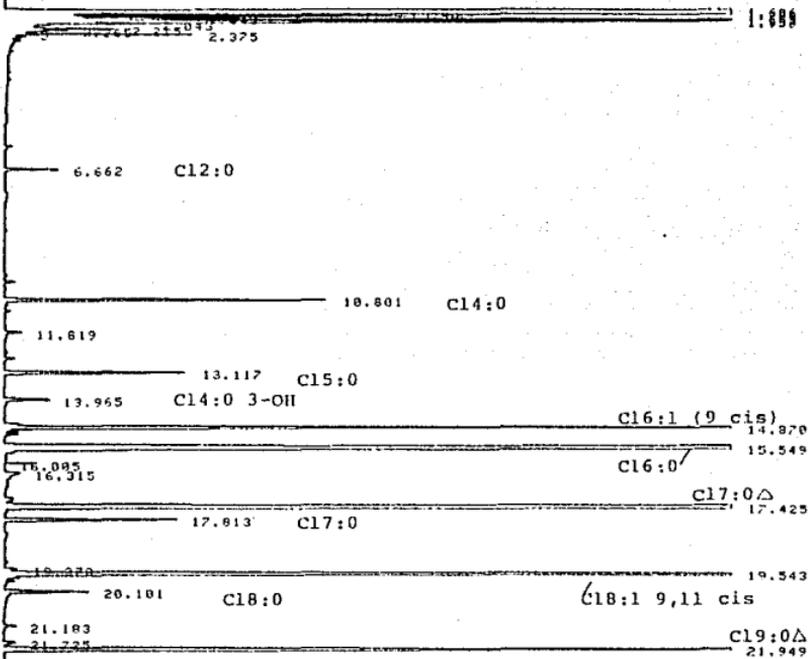
56



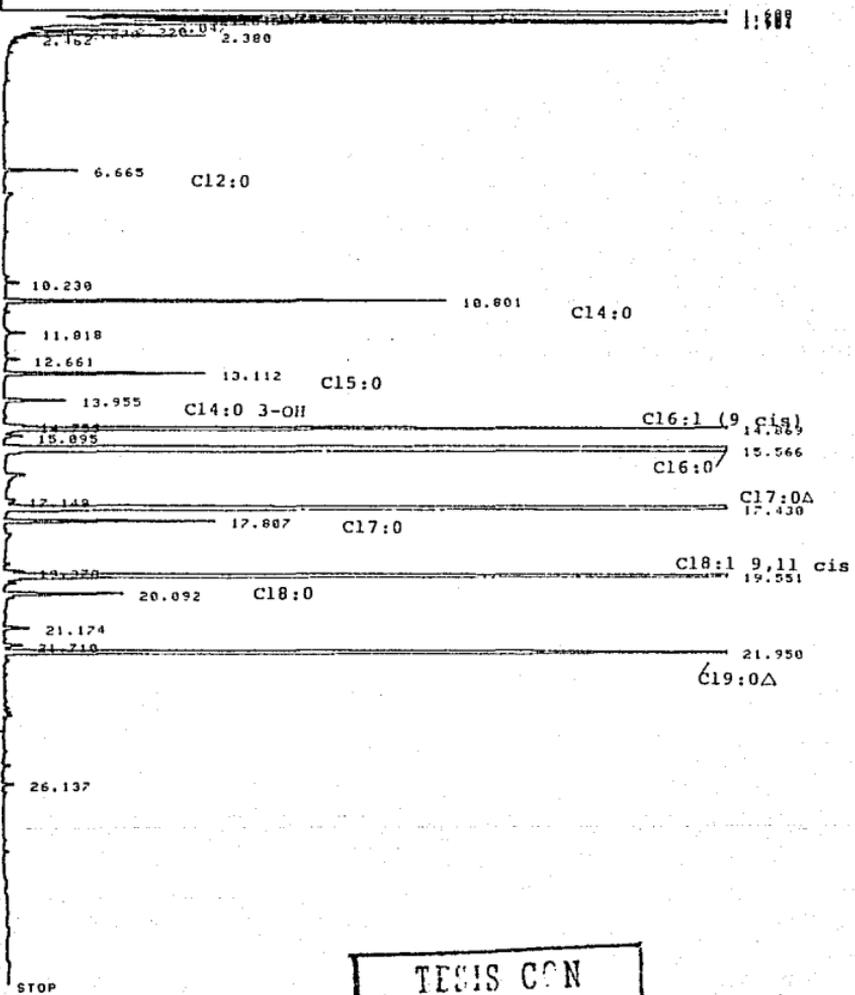
START



STOP



STOP

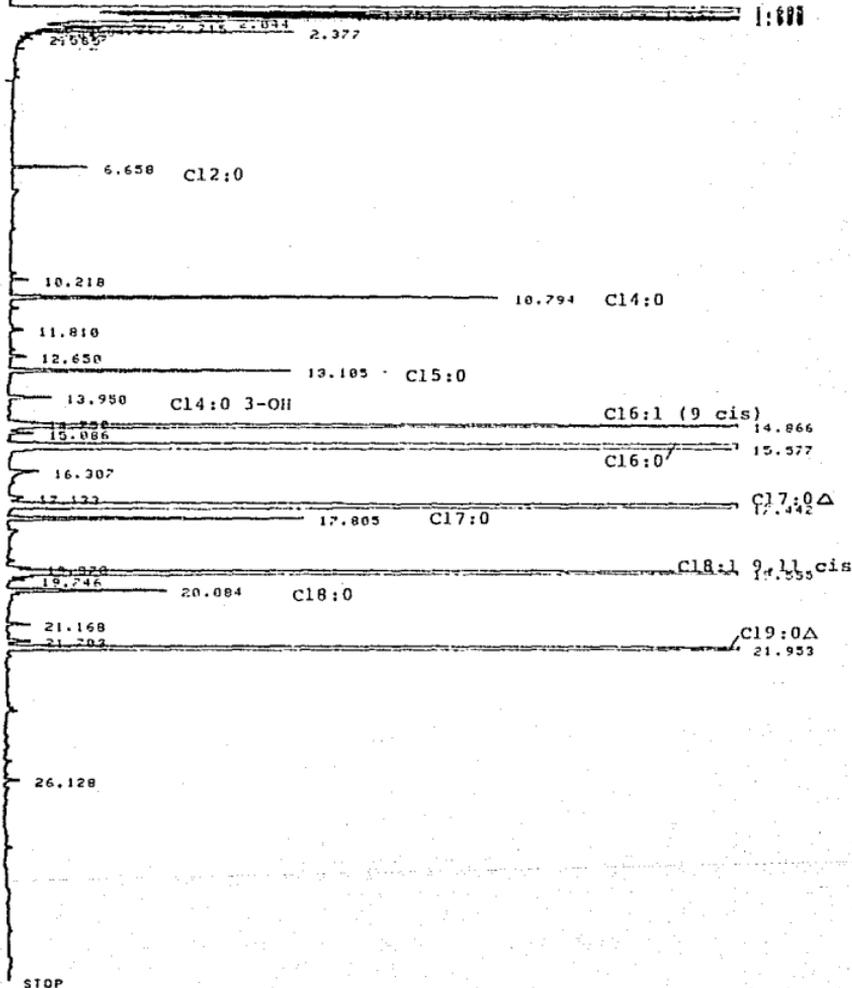


STOP

TESIS CON
FALLA LE ORIGEN

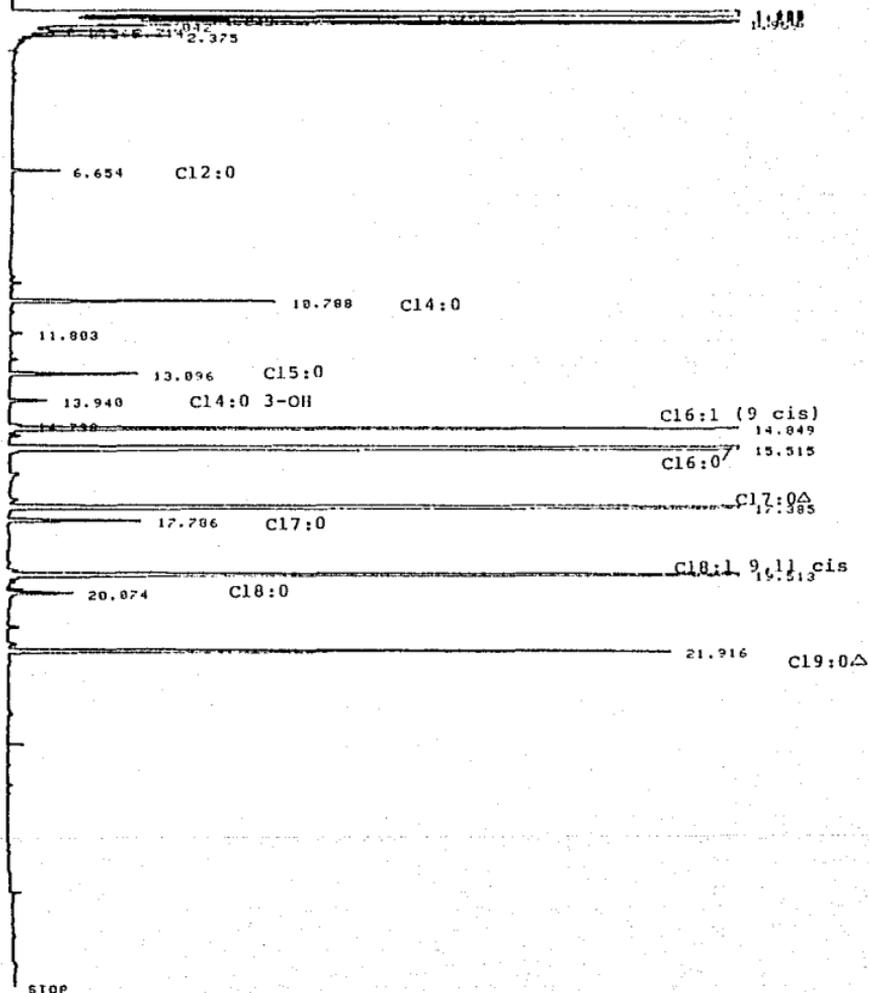
START

60

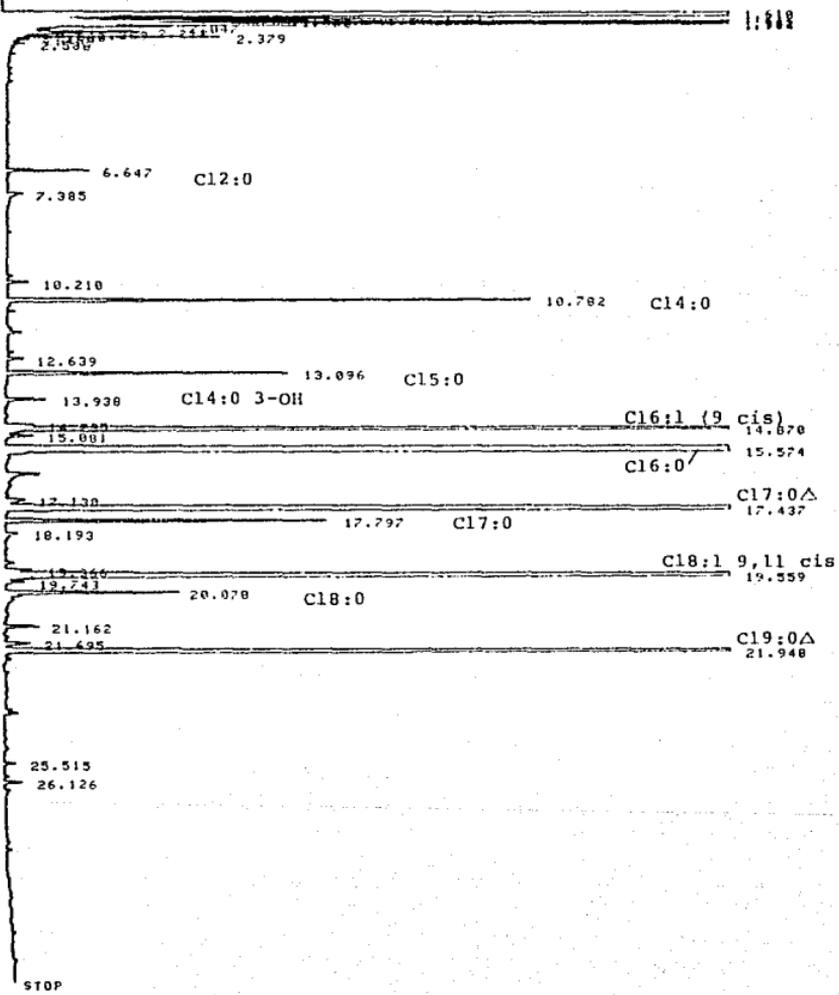


START

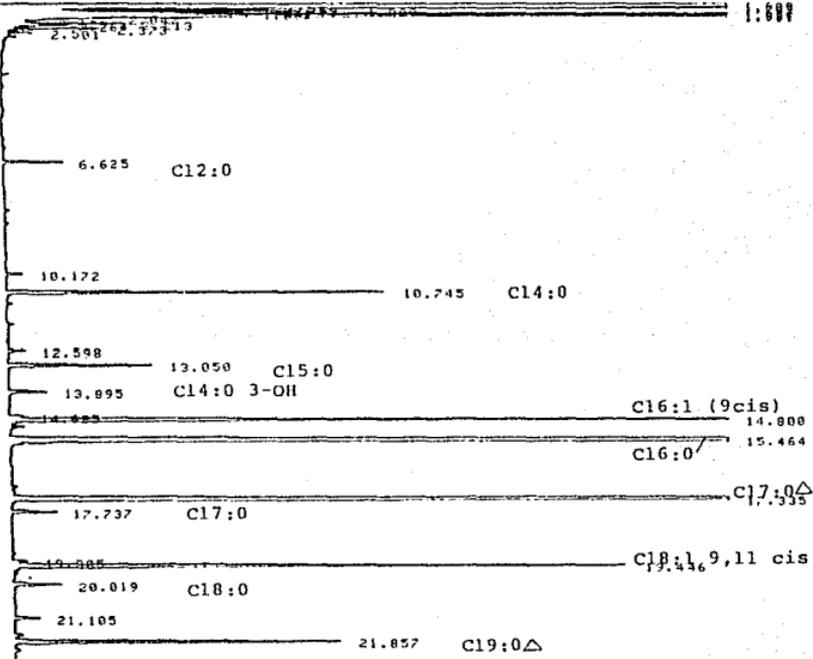
61



STOP



CROMATOGRAMAS GAS-LIQUIDO DE LOS ACIDOS GRASOS
DERIVADOS DE Klebsiella oxytoca ATCC 13182
CRECIDA EN AGAR BHI.



STOP

65

1:000

21.688 2.373 2.212 10

6.627 C12:0

10.178

C14:0
10.750

11.764

12.604

13.055 C15:0

13.903 C14:0 3-OH

C16:1 (9 cis)
14.825

C16:0

15.506

C17:0 Δ
17.363

17.741 C17:0

C18:19,11 cis
19.475

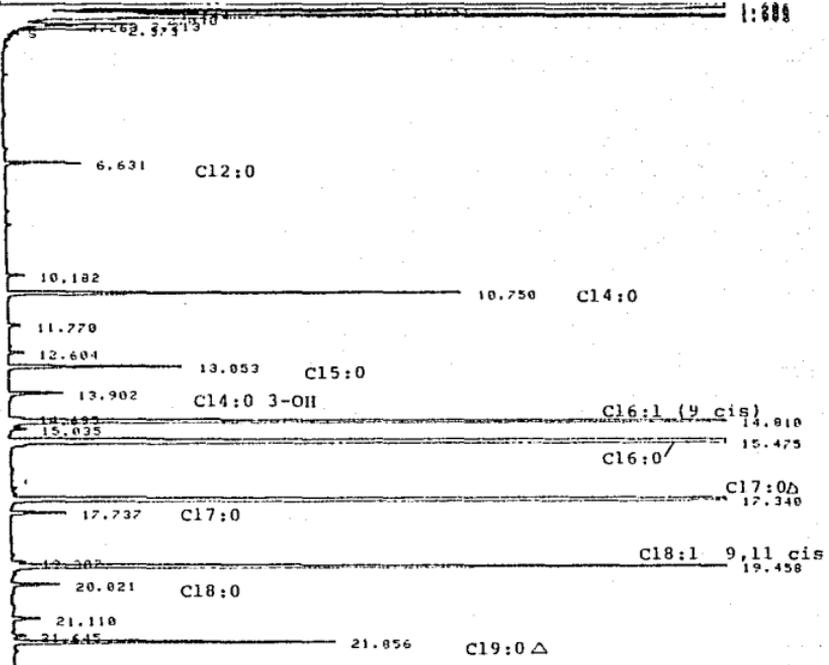
19.013

20.026 C18:0

21.106

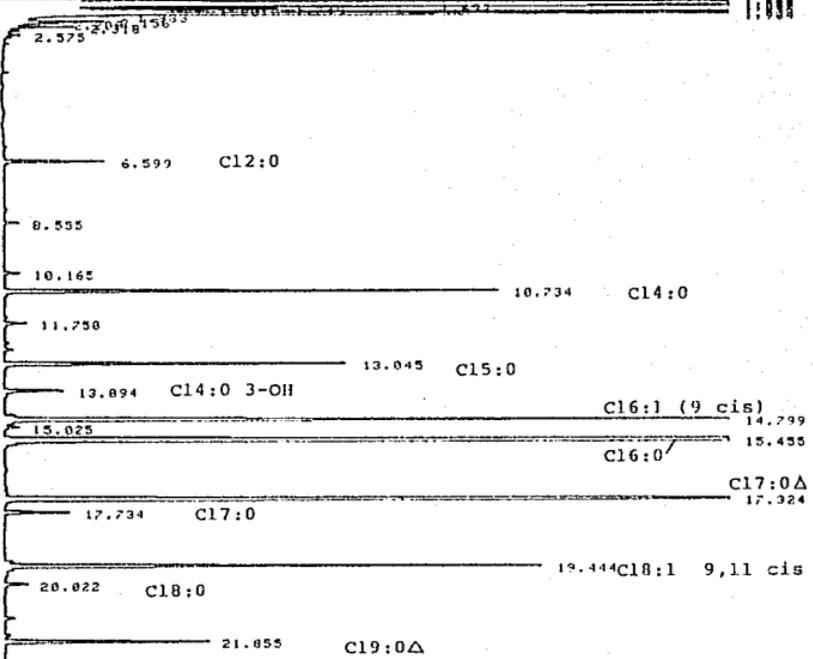
21.648

21.864 C19:0 Δ

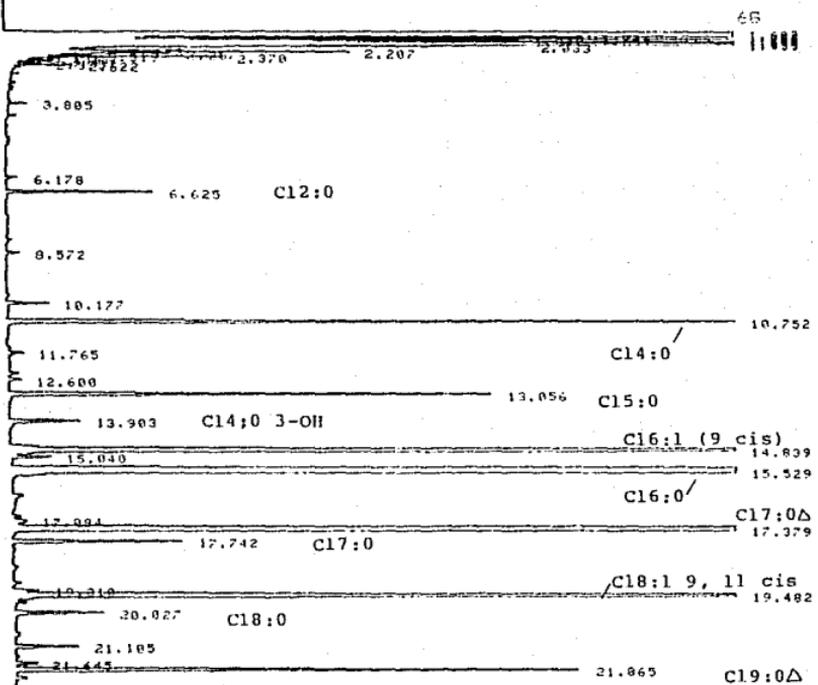


STOP

87
1:038



STOP



STOP

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

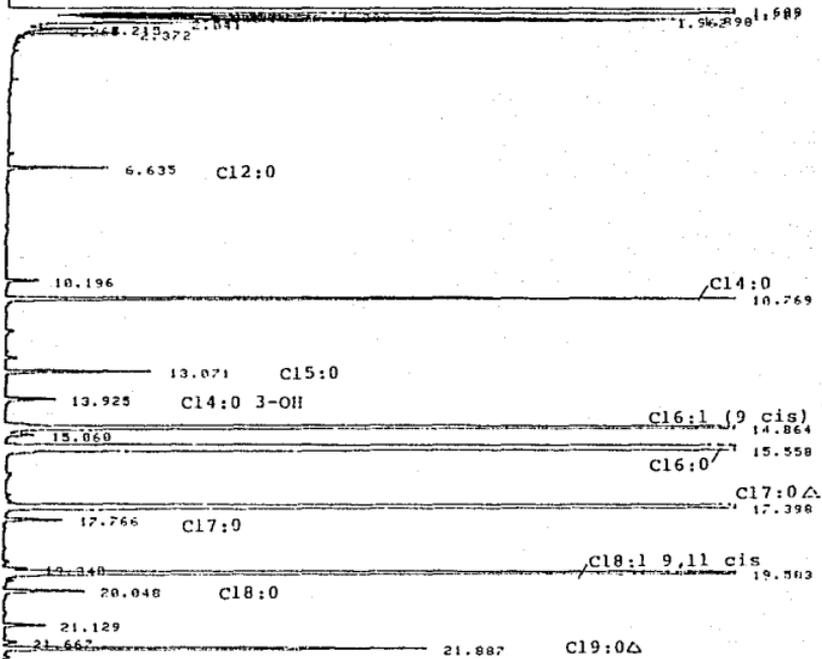
* CHI SP .75 H

+OH

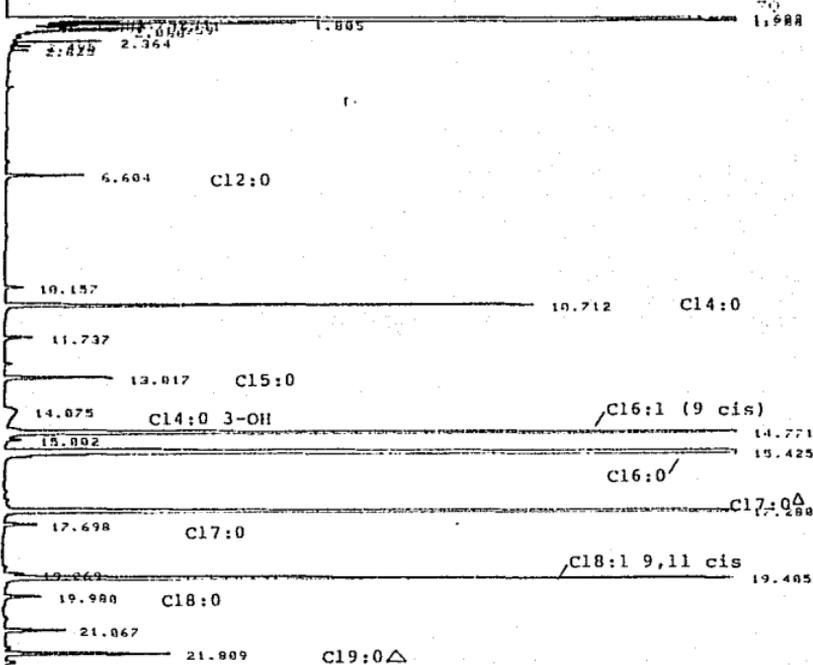
RUN # 6 FEB 18, 1991 11:33:02

START

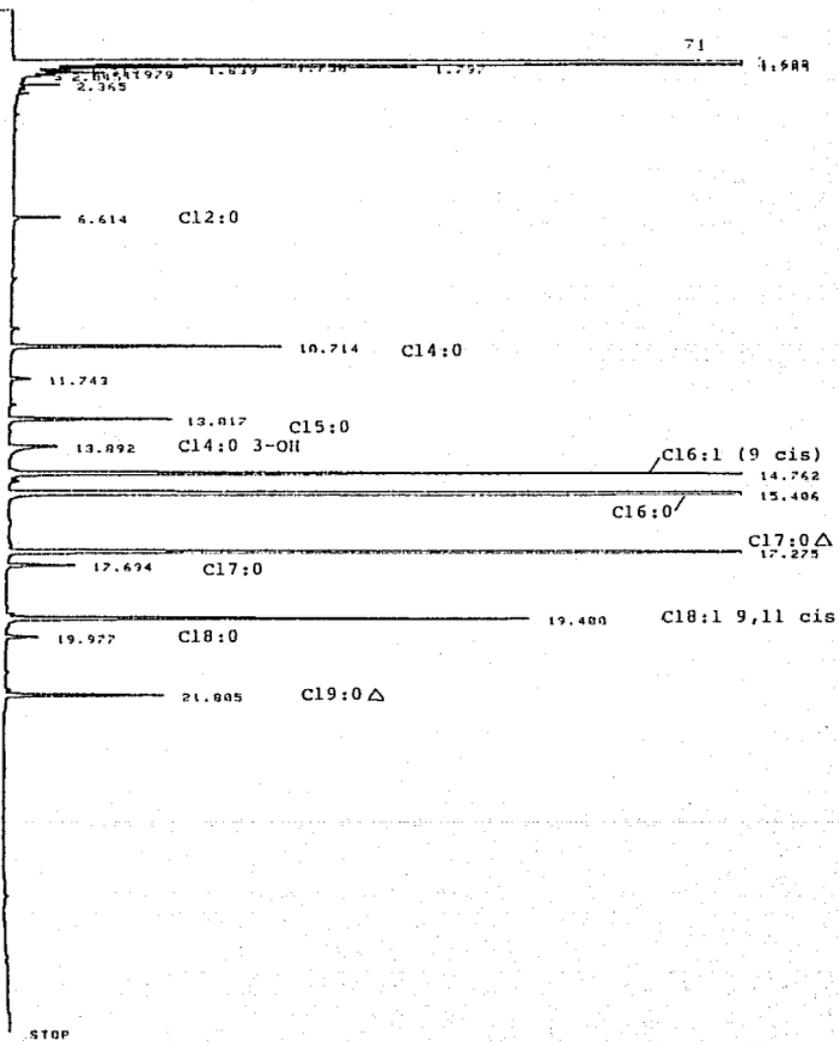
89



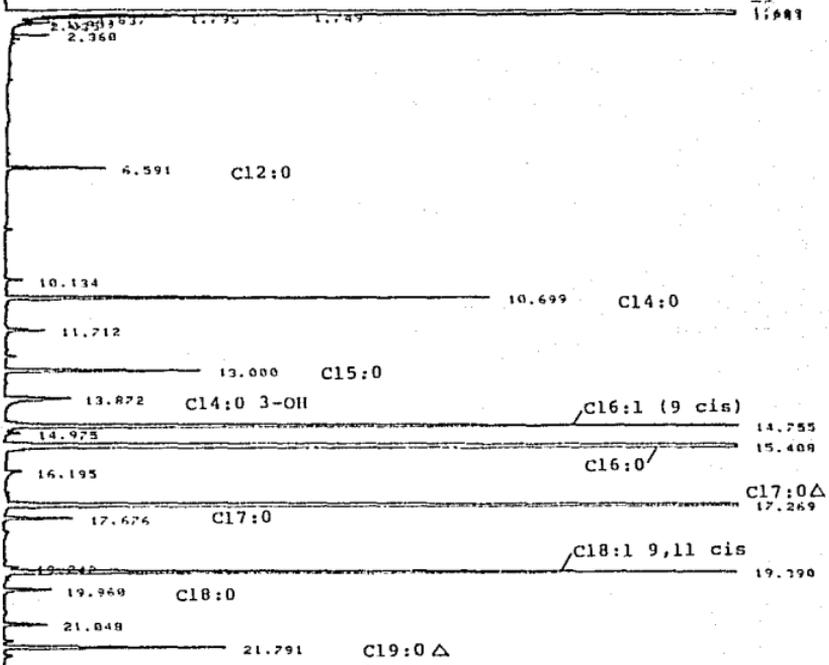
END OF SIGNAL



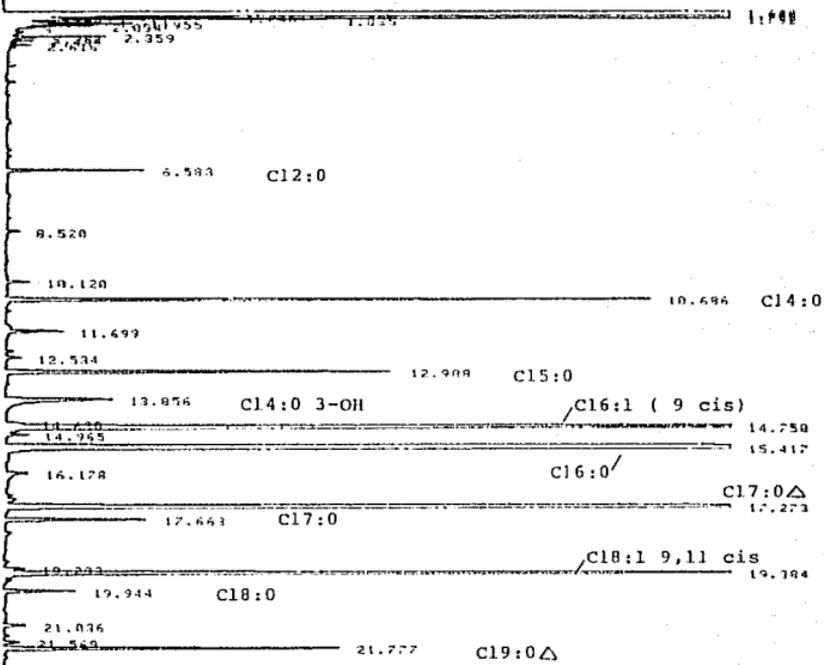
STOP



STOP

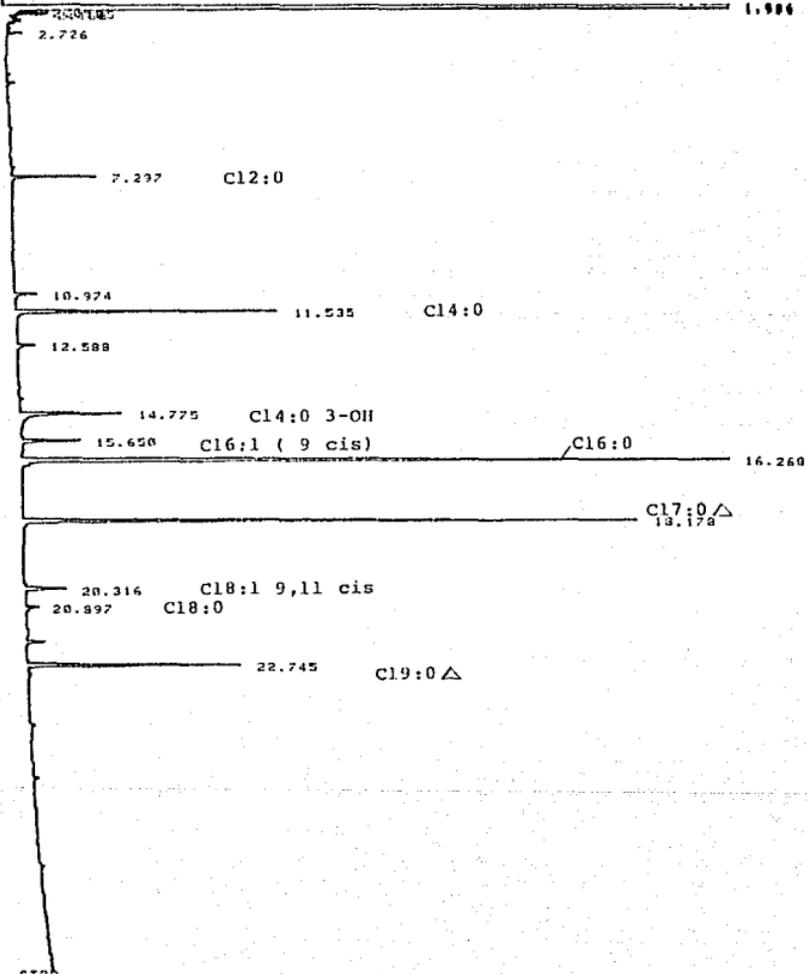


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



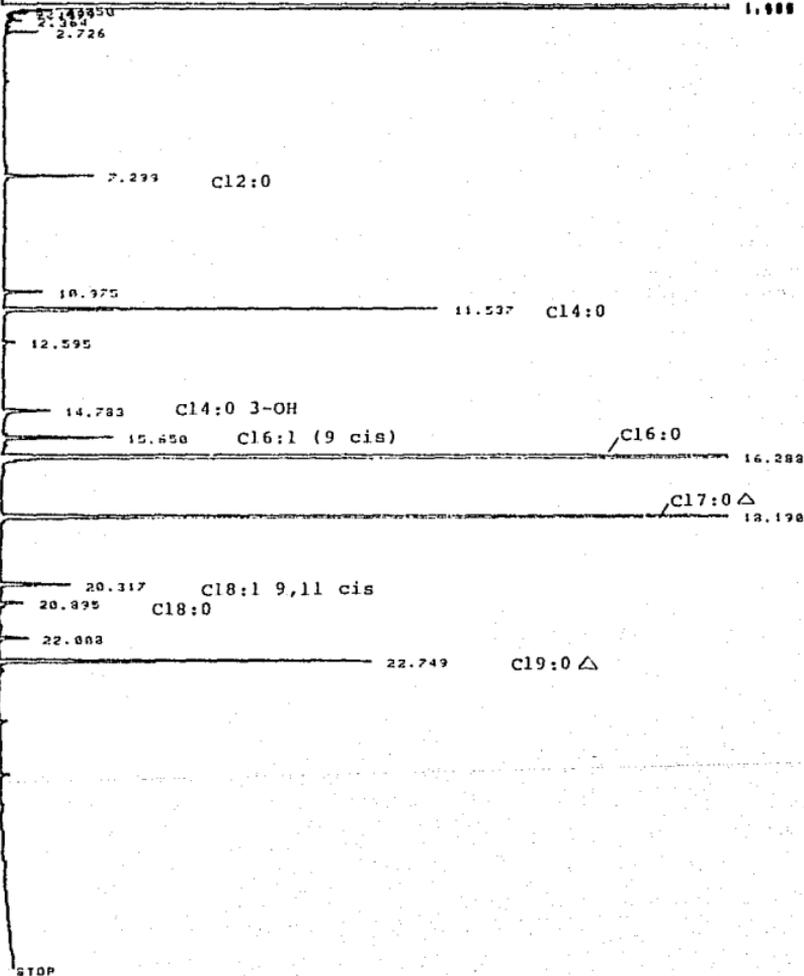
STOP

CROMATOGRAMAS GAS-LIQUIDO DE LOS ACIDOS GRASOS
DERIVADOS DE Klebsiella oxytoca ATCC 13182
CRECIDA EN AGAR YPD.

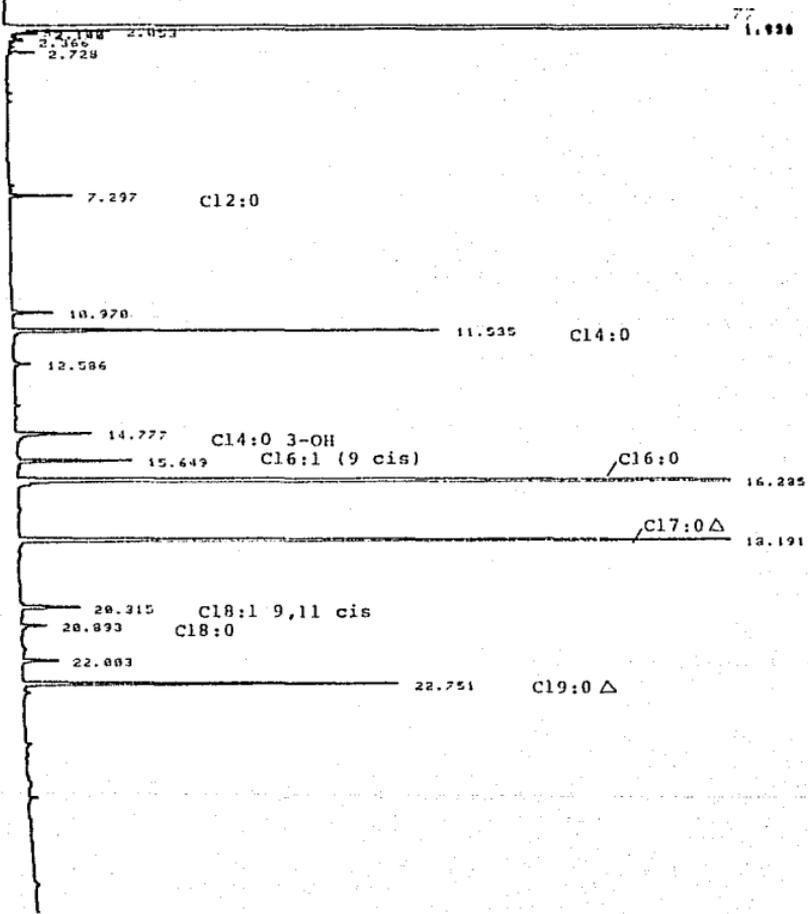


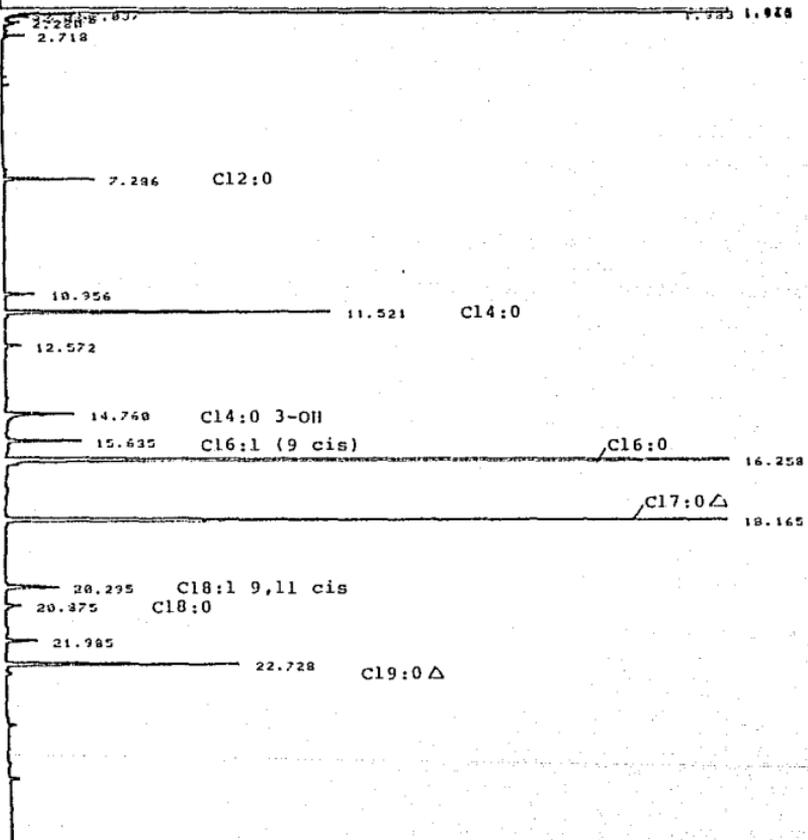
START

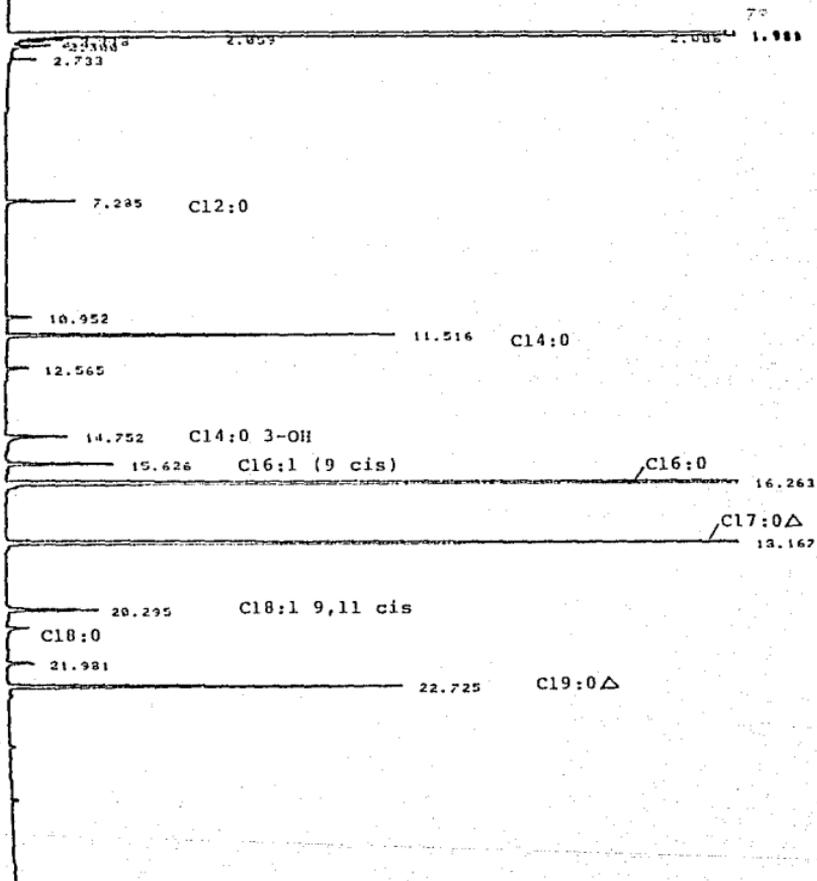
76



START



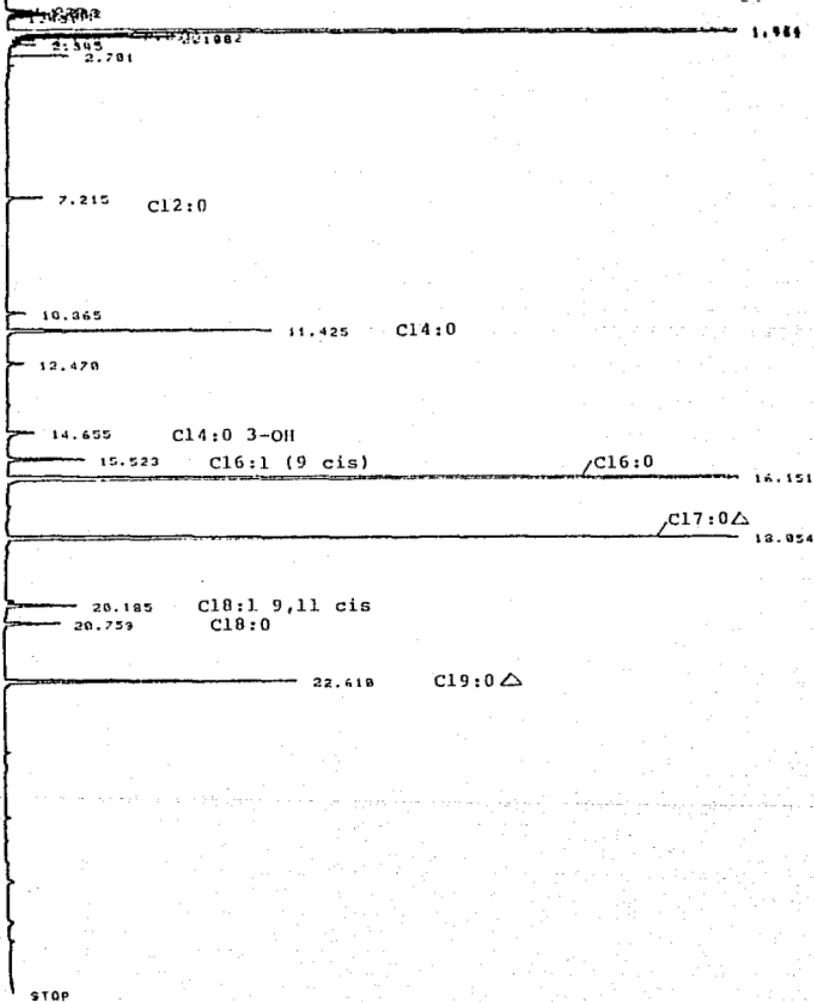




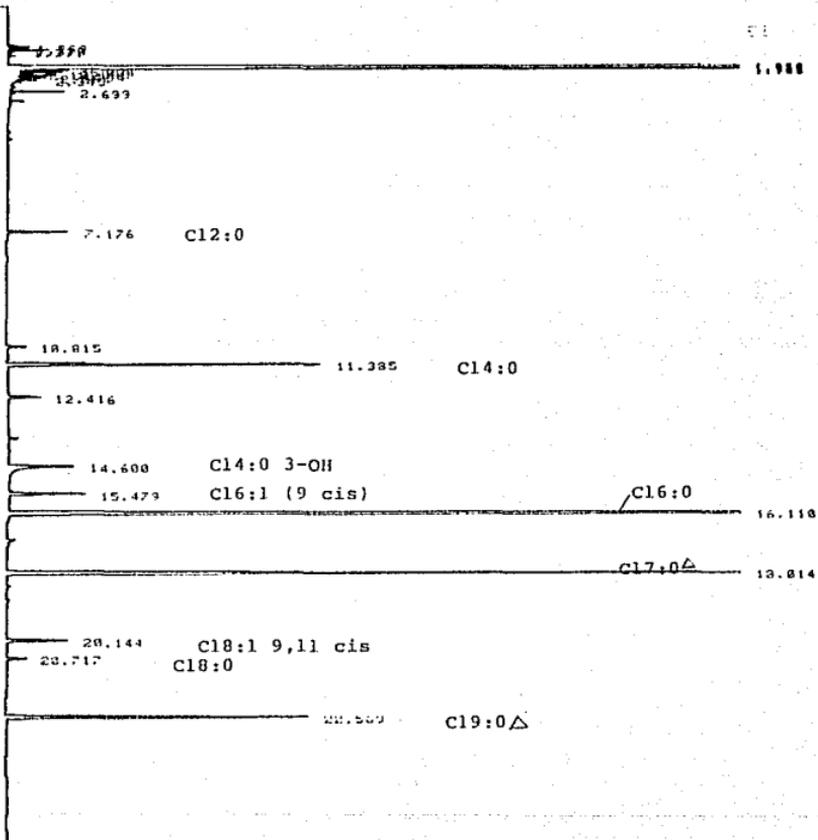
ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

START

20

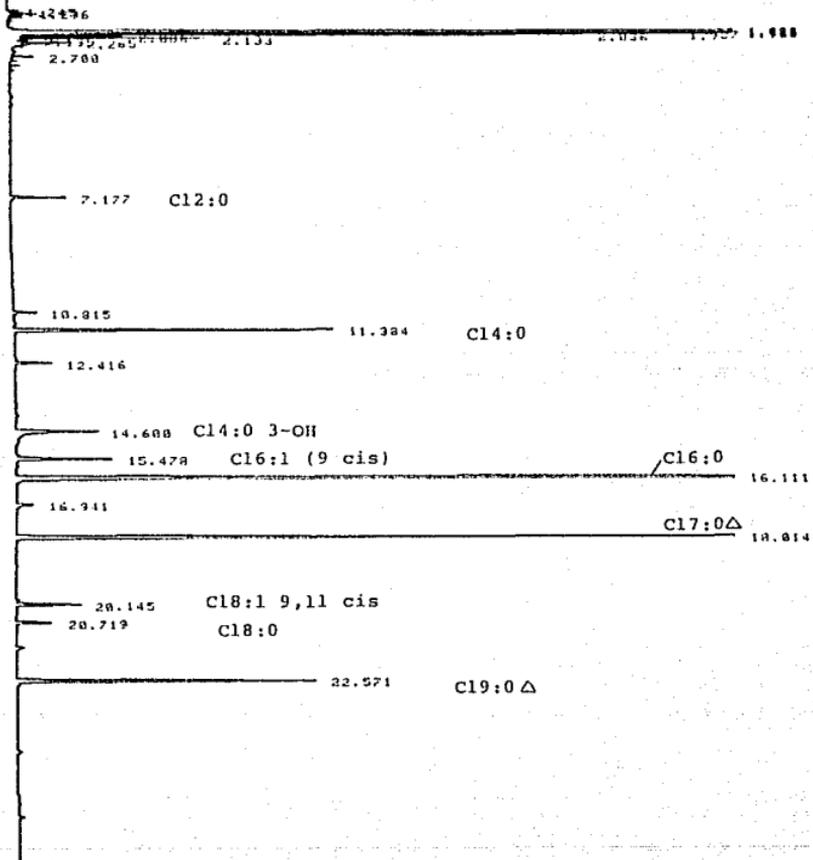


STOP

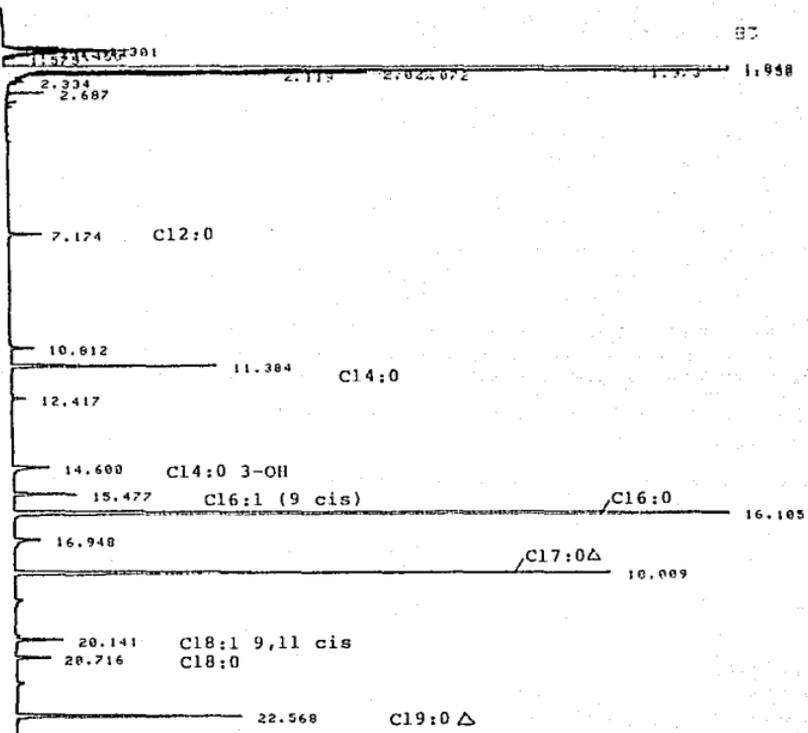


START

BT



+ RUN # 4 JUL 18, 1991 15:37:16
START



STOP

