

*UNIVERSIDAD DE CÁDIZ*  
*FACULTAD DE MEDICINA*

**ANÁLISIS QUÍMICO DE  
NAFTOQUINONAS EN MICOBACTERIAS DE  
CRECIMIENTO RÁPIDO.  
UNA CONTRIBUCIÓN A SU ESTUDIO  
TAXONÓMICO.**

TESIS presentada para optar al grado de Doctor por Fernando Paredes Salido.

Director: Prof. Dr. D. José Mira Gutiérrez.

D. José Mira Gutiérrez, Catedrático de Microbiología de la Facultad de Medicina de Cádiz.

CERTIFICA:

Que Fernando Paredes Salido ha realizado bajo mi dirección en este Departamento los estudios correspondientes a su tesis doctoral “Análisis químico de naftoquinonas en micobacterias de crecimiento rápido. Una contribución a su estudio taxonómico.”

Y para que así conste, expido la presente certificación en Cádiz a quince de abril de 2008.

Fdo. Prof. Dr. José Mira

A la memoria de mi hijo Fernando (q. e. p. d.) que nos dejó prematuramente.

## AGRADECIMIENTOS:

Al Prof. Dr. D. José Mira Gutiérrez mi admiración por su amistad y continuo aliento a lo largo de la realización de este trabajo.

Al Prof. Dr. D. José Manuel Igartuburu Chinchilla por su inestimable ayuda en la realización de la separación por HPLC y estudio por RMN de los extractos obtenidos.

A la Cátedra de Bioquímica de la Facultad de Medicina de Cádiz por la ejecución en sus laboratorios de los espectros UV-Vis.

A D. Primitivo Sasián Macías, por su trabajo infatigable en gran parte de esta tesis, por su apoyo incondicional y por su amistad.

A Dña. Francisca Martín Morales por su metódica organización y constante aliento.

A D. Carlos Mira Gordillo por su aportación a la Taxonomía Numérica.

A todos los compañeros del Departamento de Microbiología por su valiosa ayuda.

Finalmente, a mi familia por haber sabido entender y tolerar mi inquietud investigadora.

## ÍNDICE

1.- Introducción.....	1
1.1.- Estructura y Análisis.....	2
1.2.- Análisis de las quinonas bacterianas.....	6
1.3.- Espectroscopía Ultravioleta-Visible.....	7
1.4.- Espectrometría de Masas.....	13
1.5.- El cultivo bacteriano.....	17
1.6.- Separación e identificación de menaquinonas.....	18
1.7.- Separación e identificación de menaquinonas por Cromatografía en Capa Fina (CCF).....	27
1.8.- Presencia de quinonas en microorganismos.....	28
1.9.- Componentes quinónicos de Micobacterias.....	29
1.10.- Análisis de las quinonas isoprenoides para la clasificación e identificación bacteriana.....	34
1.10.1.- Métodos de Extracción.....	34
1.10.2.- Biosíntesis.....	41
2.1.- Micobacterias de crecimiento rápido.....	45
2.1.1.- Micobacterias atípicas.....	45
2.1.2.- Clasificación de las micobacterias atípicas.....	45
2.2.- Espectros de quinonas.....	63
2.3.- Fórmulas de menaquinonas.....	64
2.4.- Cromatogramas.....	66
3.- Análisis físico-químico.....	68
3.1.- Análisis de menaquinonas en Micobacterias.....	78
3.2.- Interés clínico de las menaquinonas en micobacterias.....	78
4.- Material y métodos.....	84
4.1.- Cepas.....	84
4.2.- Medios de cultivo.....	86
4.3.- Preparación de las muestras (método de extracción).....	87
4.4.1.- Cromatografía en capa fina de los extractos quinónicos obtenidos.....	89
4.4.2.- Cromatografía HPLC.....	91
4.4.3.- Cromatografía gaseosa de las muestras.....	132
5.1.- Predicción de los espectros RMN de los productos.....	133
5.2.- Resultados experimentales de RMN de las cepas analizadas.....	140
6.- Resultados experimentales de espectroscopía UV-V y Espectrometría de masas en las cepas analizadas.....	146
7.- Discusión de resultados.....	245
8.- Espectrometría de masas.....	252
9.- Diagramas de Espectros de Masas.....	256
10.- Taxonomía numérica.....	261
11.- Conclusiones.....	264
12.- Bibliografía.....	267

## **1.- INTRODUCCIÓN.**

El estudio quimiotaxonómico de géneros y especies bacterianas, constituye uno de los objetivos de la Microbiología, aunque esté menos extendido que otros como las pruebas bioquímicas o la analogía del ADN.

Uno de los métodos más socorridos dentro de este tipo de estudios, ha sido el estudio de los componentes de tipo quinónico.

Fueron Collins, Jones, Piroux, Goodfellow y Minnikin (1, 2, 3), los primeros autores que trabajaron en este sentido, continuando así en el campo de las quinonas isoprenoides los trabajos que con anterioridad pusieron en marcha acerca de los componentes lipídicos constitutivos de la pared de microorganismos (4,5).

Las quinonas isoprenoides, son constituyentes de la membrana plasmática (6), y juegan un importante papel en el transporte electrónico, en la fosforilación oxidativa y en el transporte activo.

Las membranas del plasma bacteriano se componen de los lípidos polares anfipróticos asociados a las proteínas específicas de la membrana. Los lípidos anfipróticos polares están constituídos generalmente por los grupos principales hidrofílicos unidos a dos cadenas hidrofóbicas de ácido graso. Los fosfolípidos son los lípidos polares más comunes, pero los glicolípidos y las amidas ornitina acilada o lisina, también entran dentro de esta categoría. Estos lípidos anfipáticos se combinan para formar una bicapa, con el interior hidrofóbico que puede proporcionar un ambiente idóneo para la localización de las quinonas isoprenoides. Hasta la fecha, las menaquinonas son el único tipo de quinonas isoprenoides respiratorias encontradas en *Actinomicetos* y las variaciones en el número de las unidades del isopreno y de los enlaces dobles hidrogenados hacen que estos

componentes de la membrana, sean de un valor considerable para la quimiotaxonomía.

### 1.1 Estructura y Análisis.-

Las quinonas se dividen en dos grandes grupos, las naftoquinonas y las benzoquinonas. Las naftoquinonas se dividen a su vez en filoquinonas (Fig. 1, compuesto I), también denominada fitomenaquinona K-1 y en menaquinonas K-2 (Fig. 2, compuesto II).

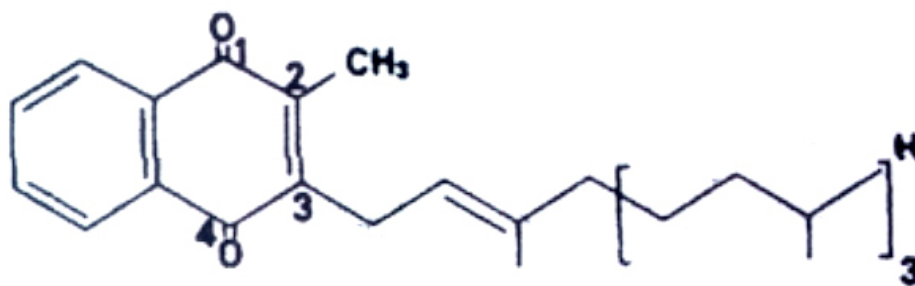


Fig. 1, compuesto I: Filoquinona.

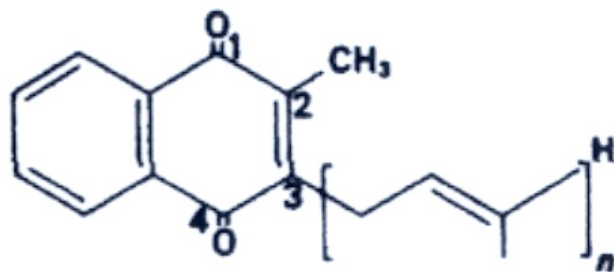


Fig. 2, compuesto II: Menaquinona.

La fitomenaquinona o vitamina K 1, fue la primera de las quinonas de este tipo aislada, procedente de la alfalfa, que realizaron MacCorquodale y colaboradores (7), con la degradación y estudios de síntesis de 2-metil-3-fetil-1,4-naftoquinona, también denominada filoquinona.

Normalmente las fitomenaquinonas se asocian con las partes verdes de las plantas.

La vitamina K-2, fue aislada por Mckee et al. (8), con el nombre de 2-metil-3-farnesil-farnesil-1,4-naftoquinona, pero no fue hasta 1958, cuando se sistematizaron las menaquinonas, estableciendo de manera abreviada el nombre y el número de isoprenos constitutivos de las mismas como MK-6, MK-7, etc.

En 1948, Tishler y Sampson (9), encontraron en el *Bacillus brevis*, la menaquinona de 35 átomos de carbono, conteniendo el grupo (farnesil-geranil-geranilo), como cadena lateral.

El grupo de investigación pionero en el estudio de menaquinonas en micobacterias, fue el de Francis (10), que junto a Noll et al. (11), ponen de manifiesto la presencia de menaquinonas de 45 átomos de carbono (solanesilo), en el bacilo tuberculoso, variando en longitud la cadena lateral, desde 1 hasta 14 unidades de isopreno.

Fueron Gale, Arison, Trenner, Page y Folkers (12), los investigadores que en 1963, pusieron de manifiesto que el *Mycobacterium phlei*, posee en su composición una cadena de 45 átomos de carbono, con una unidad de isopreno saturada MK-9(H-2).

Otra quinona isoprénica, la Clorobiunquinona (Fig. 3), es generada por la bacteria verde fotosintética *Chlorobium thiosulphatofilum* (13).

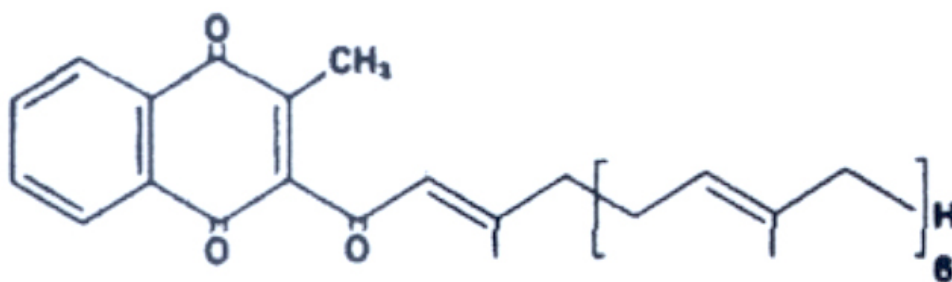


Fig. 3, Clorobiunquinona.

Este compuesto, es el único, dentro de las quinonas naturales, que posee un grupo carbonílico en la cadena lateral.



En la Demetilmenaquinona (DMK-n) varía la longitud de la cadena poliprenílica, siendo aislada de algunas bacterias fotosintéticas por Powlis y estudiadas por Moore y Folkers (14), y asignada su estructura a 4-O-metil-2-heptaprenil naftoquinol.

Las siguientes quinonas en importancia, son las benzoquinonas (Fig. 4), dentro de las cuales, estructuralmente hay dos tipos, las Plastoquinonas (compuesto I) y las Ubiquinonas (compuesto II, Fig. 5).

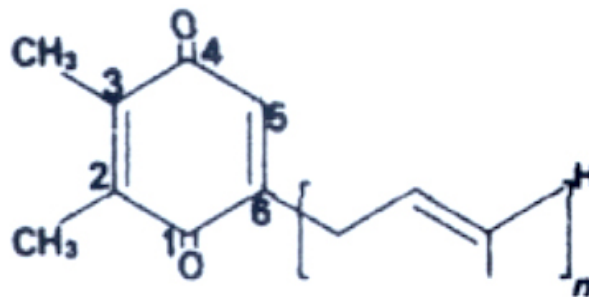


Fig. 4, Compuesto I: Plastoquinona.

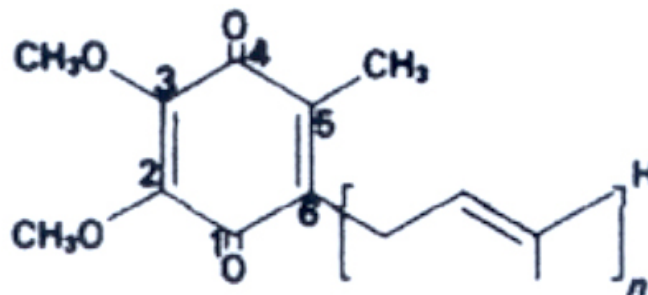


Fig. 5, Compuesto II: Ubiquinona.

La Plastoquinona fue aislada originariamente por Kofler en 1946, procedente de la alfalfa, aunque no pudo ser identificada químicamente, hasta que Lester y Crane en 1959 y Kofler et al., le asignan su estructura de 2,3-dimetil-6-solanesil-1,4-benzoquinona, de manera abreviada PQ-9 (15, 16).

Las ubiquinonas (también llamadas Coenzima Q), contienen un núcleo 2,3-dimetoxi-5-metil-1,4-benzoquinónico, con una cadena poliprenílica en posición 6, y como las menaquinonas, se encuentran ampliamente distribuidas por la naturaleza. En la Rodoquinona, quinona púrpura, aislada del *Rhodospirillum rubrum*, por Glover y Threlfall, el grupo metoxilo en posición 3 de la ubiquinona, es reemplazado por un grupo amino (17).

Más recientemente, la Caldarielaquinona, aislada de la bacteria acidófila y termofílica *Caldariella acidophila* (18), por De Rosa, Gambacorta y Millonig, fue asignada como 6-(3,7,11,15,19,23-hexametiltetracosil)-5-metiltiobenzo-b-tiofen-4,7-quinona (Fig. 6). Ésta, hasta la fecha, es la única quinona natural que posee azufre.

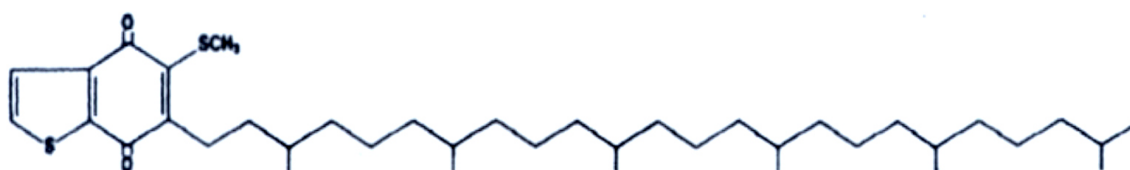


Fig. 6, Caldarielaquinona.

El primer estudio sobre las menaquinonas en actinomicetos que empleó espectrometría de masas fue realizado por Yamada et al. en 1976 y por Collins et al. en 1977, pero se han obtenido datos cuantitativos fidedignos usando HPLC (Kroppenstedt et al. 1981; Collins 1982; Tamaoka et al. 1983). En la mayoría de los casos, las mezclas de menaquinonas pueden ser separadas y las menaquinonas individuales ser identificadas, aunque hay casos donde la identificación de picos individuales en mezclas complejas es difícil. Así en *Termomonosporas* y en ciertas especies de *Actinomadura* se sintetizan mezclas de menaquinonas altamente saturadas. En tales casos, una fase estacionaria adicional, con un comportamiento

diferente en la separación, debe de ser aplicada (Kroppenstedt 1982). Alternativamente, los picos individuales eluidos por HPLC, se pueden recoger e identificar por espectrometría de masas (Tamaoka et al. 1983).

La mayoría de las bacterias contienen menaquinonas, ubiquinonas o ambas. Las bacterias Gram-positivas, incluyendo *Actinomicetes* sintetizan solamente menaquinonas (Collins y Jones 1981). Las menaquinonas de actinomicetos y de las bacterias relacionadas, sin embargo, se diferencian en su grado de saturación. Están parcialmente saturadas y abarcan de ocho a diez unidades de isopreno. Dos excepciones hay no obstante, *Gordonia aurantica* y *Corynebacterium paurometabolum*, que tienen cadenas laterales isoprenílicas completamente insaturadas (Goodfellow et el al. 1978; Collins & Jones 1982; Meisel 1982; Lemmer & Kroppenstedt 1984). Este tipo de menaquinonas de los actinomicetos también se encuentra en *Micrococcus* (Yamada et el al. 1976b). Una taxonomía reciente, las relaciona con las artrobacterias (Stackebrandt y Woese 1981).

## 1.2 Análisis de las quinonas bacterianas.-

En cuanto a la extracción y purificación de las quinonas, se puede afirmar que estos compuestos isoprénicos, son sensibles a las condiciones ácidas o alcalinas, siendo fotooxidadas en presencia de oxígeno o de luz potente (19).

Son solubles en los disolventes lipídicos ordinarios, como el éter dietílico, acetona, acetona y éter de petróleo (20).

Existen pues diversidad de protocolos de extracción para procesarlas posteriormente por técnicas cromatográficas.

En cromatografía en capa fina (CCF), se utiliza en muchos casos Silica Gel G impregnada con nitrato de plata, desarrollando con disolventes del tipo metanol-

benceno (5:95, vol/vol) y separando los diversos compuestos constitutivos en función del número de insaturaciones.

Cromatografía en capa fina con incorporación de indicadores como la Rodamina 6G en las placas, permite la visualización rápida de los cromatogramas.

Se utilizan fases normalmente reversas y a semejanza con los ensayos en capa fina, las columnas usadas en HPLC, son de naturaleza poco polar, asociadas a detectores UV-V.

### 1.3 Espectroscopía Ultravioleta-Visible.-

Las quinonas isoprenoides, pueden ser analizadas fisicoquímicamente por diversas técnicas (21), siendo una de las más utilizadas la espectroscopía ultravioleta-visible.

En la Tabla 1, se ponen de manifiesto las absorciones características de menaquinonas, ubiquinonas y de compuestos estructuralmente relacionados.

TABLE 1. *Ultraviolet absorption characteristics of menaquinones, ubiquinones, and related compounds*

Compound	Solvent	$\lambda_{\max}$ (nm) <sup>a</sup>	Reference(s)
Phylloquinone	Isooctane	242, 248, 260, 269, 326, 238 (inf)	65
Menaquinone	Isooctane	242, 248, 260, 269, 326, 238 (inf)	65
Demethylphyloquinone	Isooctane	243, 248, 254, 263, 326, 238 (inf)	65
Demethylmenaquinone	Isooctane	243, 248, 254, 263, 326, 238 (inf)	65
Chlorobiumquinone	Ethanol	254, 265 (inf)	78, 181
Plastoquinone	Isooctane	254, 262	207
Ubiquinone	Ethanol	275, 405	207
Rhodoquinone	Cyclohexane	251, 280, 320, 500 (inf)	87
Rhodoquinone	Ethanol	253, 283, 320, 500 (inf)	87
Caldariellaquinone	Methanol	241, 283, 333, 471	59

Tabla 1. Absorciones en el ultravioleta; características de quinonas.

Las bandas de absorción a 242, 248 y 238 nm, son debidas a las contribuciones de los anillos bencénicos, mientras que las que aparecen a 260 y 269 nm, son debidas a los grupos quinónicos (22). Esta técnica espectroscópica permite de forma fácil y asequible, distinguir fitomenaquinonas de sus compuestos demetilados. Así la clorobiunquinona (1'-oxomenaquinona-7), presenta una absorción característica, que la distingue de las menaquinonas y de las demetilmenaquinonas, con un máximo de absorción a 254 nm en etanol, y un punto de inflexión a 265 nm. (23).

Las plastoquinonas, presentan máximos de absorción a 254 y 262 nm en isooctano. Las ubiquinonas, una primera absorción entre 270 y 275, y una segunda entre 405 y 407 nm. La sustitución del grupo metoxilo en posición 3 por un grupo amino, como en la rodoquinona (2-metil-3-amino-5-metil-6-npnaprenil-1,4-benzoquinona), aislada de *R. rubrum*, ocasiona un marcado cambio en el espectro, con máximos a 251, 253, 280, y 500 nm, y un punto de inflexión a 320 nm.

Como se puede apreciar en la tabla que se reproduce en el apartado de análisis físico-químico, los máximos de absorción, están localizados a 242, 248, 260, 269 y 326 nm, con puntos de inflexión a 238 nm. Las bandas a 242, 248 y 238 nm, son debidas a las contribuciones bencénicas, mientras que las que aparecen a 260 y 269 nm, son debidas a los grupos quinónicos.

La presencia de grupos metilos sustituyentes C-2 o de grupos naftoquinónicos, puede ocasionar desplazamientos batocrómicos.

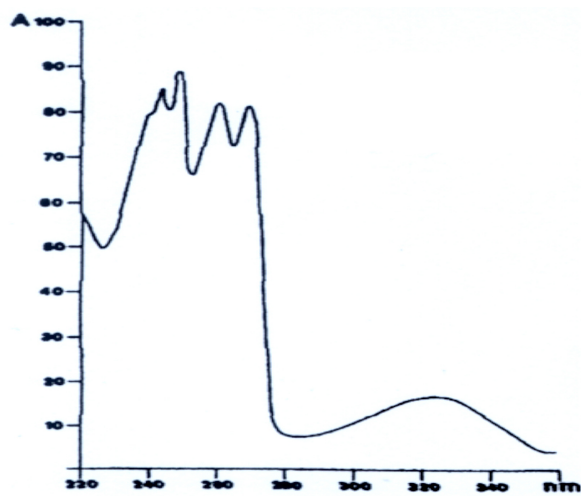


Fig. 7, Espectro ultravioleta de MK-6 en isooctano.

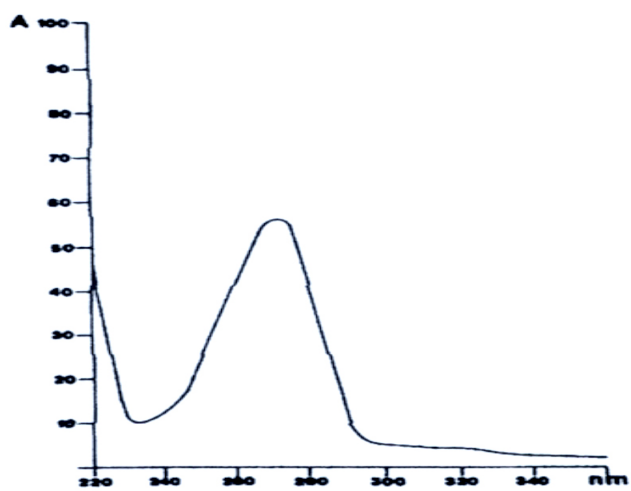


Fig. 8, Espectro ultravioleta de G-10 en isooctano.

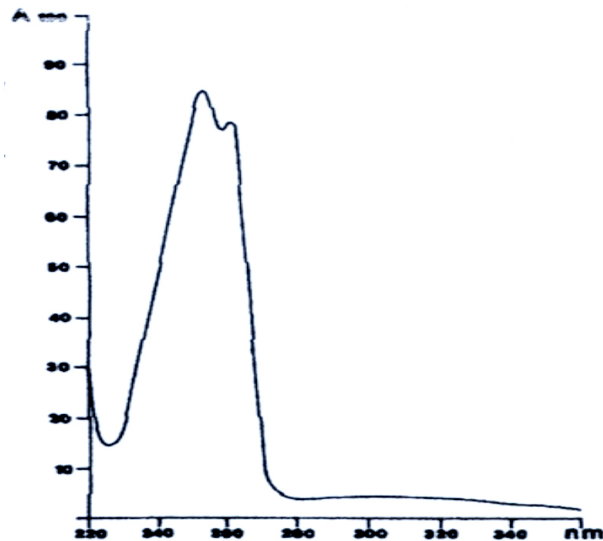


Fig. 9, Espectro ultravioleta de PQ-9 en isooctano.

Estos métodos espectrofotométricos, suministran una alternativa sencilla y práctica para distinguir entre menaquinonas y fitomenaquinonas.

Aunque la importancia fisiológica de las quinonas isoprenoides se ha sabido desde hace mucho tiempo, hace sólo dos décadas que su importancia en taxonomía microbiana se ha puesto de manifiesto. Jeffries et al. fueron los primeros en demostrar el valor taxonómico de estos compuestos durante el examen de la composición de la menaquinona de algunos cocos aerobios Gram-positivos (Jeffries et al. 1967). Algunos años más tarde, Yamada y su equipo (1968,1969) demostraron que las ubiquinonas tenían un valor similar al utilizado en la clasificación de las bacterias acéticas.

A partir de estas investigaciones tempranas, una gran cantidad de estudios sistemáticos, han establecido la importancia de las quinonas isoprenoides en la clasificación y la identificación de muchos grupos taxonómicos (Collins y Jones 1981), siendo posiblemente los más notables los de Yamada et al. 1976,1977 y

1982 y Collins, Minnikin y colaboradores (Collins et al. 1977, 1979, 1980, 1981, 1982; Collins & Jones 1979, 1980; Shah & Collins 1980).

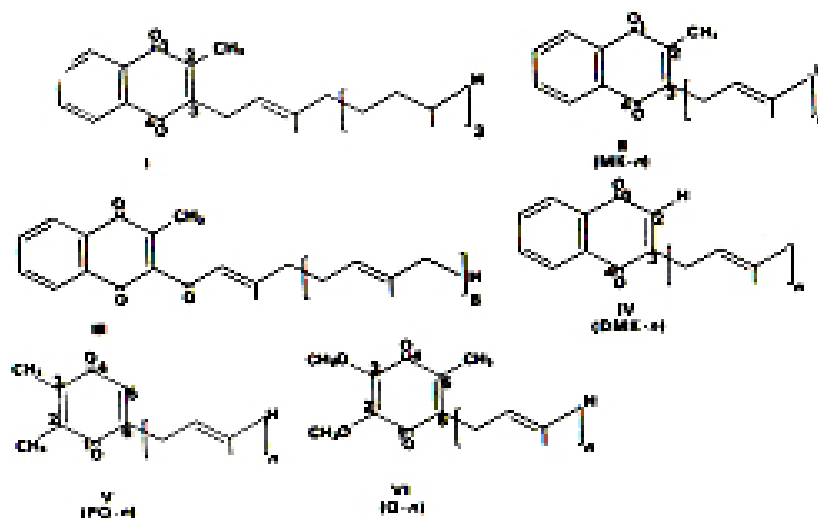


Fig.10, Estructuras de la fitomenaquinona (I), menaquinona (II), clorobiumquinona (III), demetilmenaquinona (IV), plastoquinona (V) y ubiquinona (VI).

Los dos tipos principales de quinonas respiratorias bacterianas son las menaquinonas (vitamina K2) y las ubiquinonas (o coenzima Q). Las menaquinonas (2-metil-3-poliprenil-1,4-naftoquinona) y las ubiquinonas (2,3-dimetoxi-5-metil-6-poliprenil-1,4-benzoquinona), forman grandes moléculas, en las cuales la longitud de las cadenas laterales de poliprenilo varía entre 1 y 14 unidades de isopreno. Además, de variaciones en la longitud de la cadena lateral, se ha estudiado la variación del grado de saturación o de hidrogenación del C-3 de cadena lateral multiprenílica de las menaquinonas (Collins y Jones 1981).



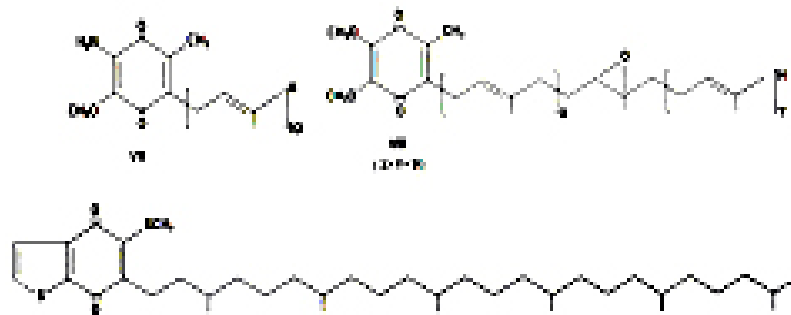


Fig.11, Estructuras de la rodoquinona (VII), epoxiubiquinona (VIII) y caldariellaquinona (IX).

La importancia de las menaquinonas y de las ubiquinonas como criterios taxonómicos de clasificación se encuentra básicamente en la variación en cuanto a la longitud y el grado de saturación de las cadenas laterales. Además de estas variaciones, otras modificaciones se encuentran de vez en cuando en las menaquinonas y las ubiquinonas. Así las demetilmenaquinonas, que carecen del sustituto metílico del anillo en posición C-2 (compuesto IV), se han aislado en muchas bacterias. Hasta la fecha, en las demetilmenaquinonas con las cadenas laterales de poliprenilo, se han descrito variaciones en longitud de una a nueve unidades de isopreno (Collins & Jones 1981). Una modificación inusual de la cadena lateral multiprenílica de las menaquinonas se ha visto en la clorobiumquinona (compuesto III), que es producido por ciertas bacterias fotosintéticas verdes. La clorobiumquinona (1'-oxomenaquinona-7), es el único ejemplo de una quinona isoprenoide bacteriana que contiene un grupo carbonilo en la cadena lateral. En la rodoquinona, una quinona púrpura aislada del *Rhodospirillum rubrum* por Glover & Threlfall (1962), el grupo metoxi en la posición 3 de la ubiquinona es reemplazado por un grupo amino (compuesto VII). La extremadamente termofílica y acidofílica arcobacteria *Sulfolobus*, posee una quinona muy inusual, designada como calderiellaquinona [6-(3, 7,11,15,19,23-hexametiltetracosil)-5-metiltiobenzo-(b)-

tiopen-4,7-quinona] (De Rosa et al. 1977; Collins & Langworthy 1983). Hasta hace poco tiempo, la calderialaquinona (compuesto IX), era la única quinona respiratoria con azufre conocida. Ishii et al. (1983), sin embargo, han descrito la 2-metil-1,4-naftoquinona, designada como "metionaquinona" de una bacteria termofílica.

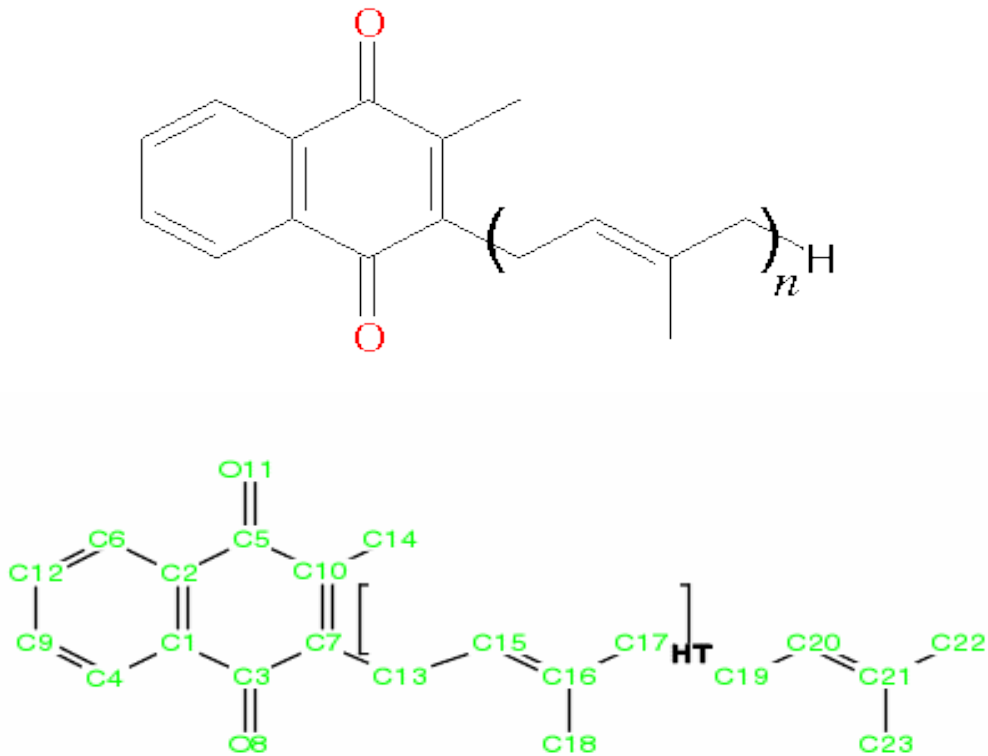


Fig. 12, Estructura general de las quinonas analizadas.

#### 1.4 Espectrometría de Masas.-

Sin duda alguna, el método físico-químico más sensible para la elucidación estructural y la detección cualitativa de quinonas en micobacterias, es la espectrometría de masas, por la fragmentación característica de las mismas.

Las ubiquinonas, generan un pico base a m/e de 235, con un pico intenso a m/e de 197, que corresponden a iones pirilio y bencilio respectivamente, producidos ambos por la benzoquinona.

Los picos en el espectro de masas de las menaquinonas (incluidas las filoquinonas), están localizados a m/e 225, con un segundo pico, de considerable intensidad a m/e 187, derivado del núcleo de la naftoquinona y que se pone de manifiesto en la Figura 13.

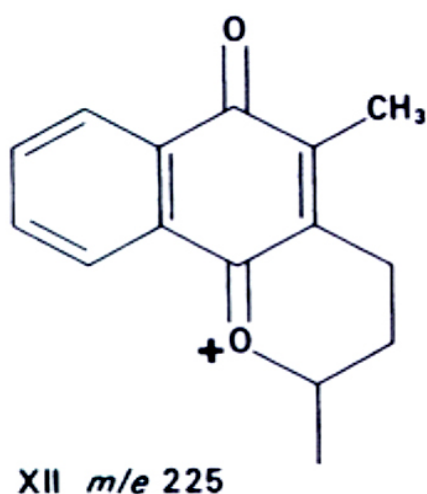


Fig. 13, Masa espectral correspondiente al fragmento m/e 225, derivado del núcleo de la naftoquinona.

Las demetilmenaquinonas, poseen fragmentos nucleares a m/e 211 y a 173. el pico más intenso, correspondiente al ión positivo (M<sup>+</sup>) que se observa en ubiquinonas, menaquinonas y estructuras afines. El pico correspondiente a la pérdida de 15 unidades, se correlaciona con la pérdida de un grupo metilo.

Las pérdidas de M-69 unidades, pone de manifiesto la fragmentación de grupos isoprenilo, seguida de pérdidas de (M-69)- 868xN), siendo N el número de unidades de isopreno que se pierden, menos uno.

En la Figura 14, se especifica en la MK-6 aislada a partir de ciertos microorganismos, la pérdida de inicial de 69 unidades correspondientes al isoprenilo

extremo, y las pérdidas sucesivas de 68 unidades, correspondientes a los isoprenilos siguientes, dándonos a partir del estudio de la fragmentación, una idea de la longitud de la cadena lateral.

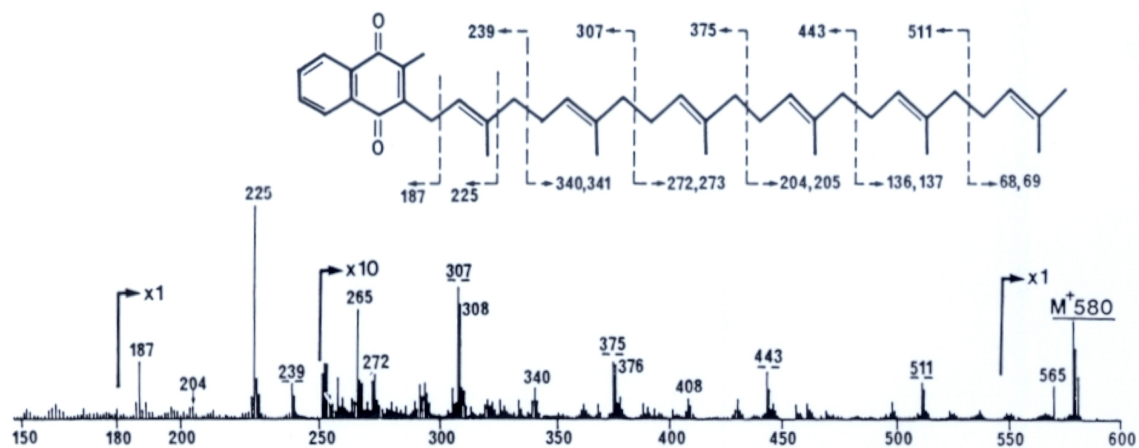


Fig. 14, Espectro de masas de MK-6 aislada de *Capnocytophaga pchraea*.

La calderaquinona, que contiene en su estructura azufre, posee un curioso y característico espectro de masas, con un pico molecular a m/e 225 y otros de gran intensidad a m/e 192 y 193, ocasionados por la pérdida del grupo sulfhidrilo SH y de azufre S, respectivamente con 32 unidades menos, como pusieron de manifiesto los trabajos de De Rosa et al. en 1977 (24) y de Collins y Langworthy en 1983 (25).

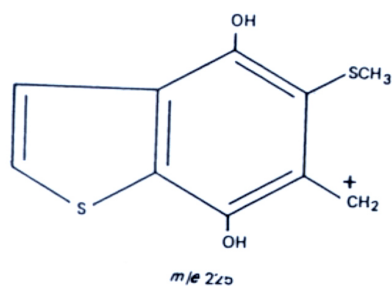


Fig. 15, Ión molecular correspondiente al fragmento m/e 225 de caldariaquinona.

Estudios estructurales orgánicos, convierten las quinonas en acetatos de comenilo por posterior ozonolisis. La reducción de los ozónidos mediante dimetilsulfóxido,

genera los correspondientes aldehídos, que sometidos a espectrometría de masas, nos dan información acerca del grado de saturación de la cadena lateral, como puso de manifiesto Yamada et al. (26).

La técnica de la espectrometría de masas, se debe de conjugar, si es posible, con las cromatográficas.

Por otro lado, el pico base que aparece a  $m/e$  225, que puede ser debido al catión señalado con anterioridad, también se le atribuye al reseñado a continuación:

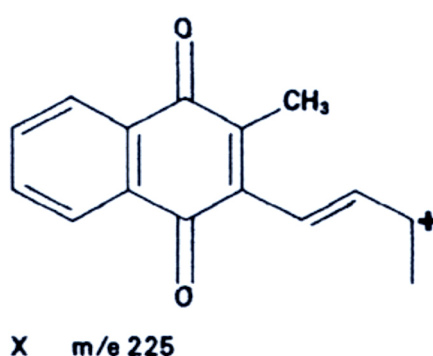


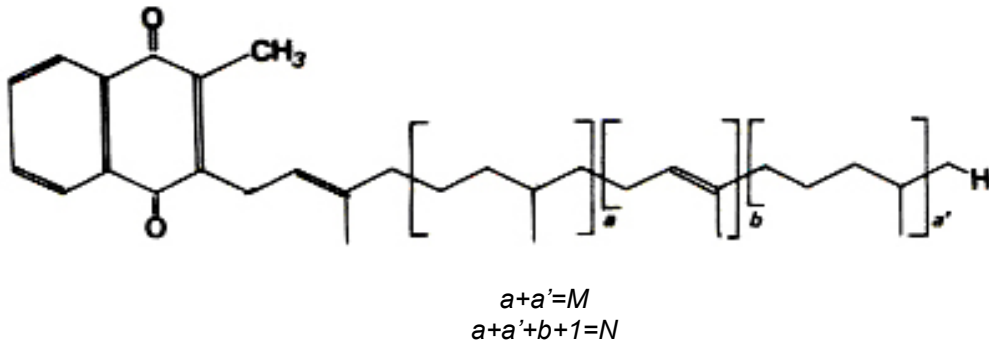
Fig. 16, Fragmento nuclear  $m/e$  225 correspondiente al núcleo naftoquinónico, proveniente de menaquinonas.

Estos picos, han sido estudiados por Sommer y Kofler (27), así como los picos a  $m/e$  225 y 189 característicos de ubiquinonas y de plastoquinonas

Por otro lado, podemos deducir a través del detallado análisis del espectro de masas, acerca de la posición de la hidrogenación (28).

Las fracciones obtenidas de quinonas isoprenoides (menaquinonas, filoquinonas, plastoquinonas y ubiquinonas), son muy semejantes entre sí, pero la determinación de sus pesos moleculares reviste un gran interés para su conocimiento y estudio.

En relación con este método, nos permite ver la relación  $e/m$  de las distintas fracciones generadas. El fragmento  $m/e=225$ , es el más significativo dentro del análisis de las quinonas por esta técnica, y representa el fragmento derivado del núcleo de naftoquinona, con carga positiva.



*Streptomyces olivaceus*

Fig.17, Fórmula estructural de las menaquinonas (2.metil-5-II, III, IX-hexahidromultiprenil-1,4-naftoquinona, de acuerdo con la nomenclatura de la IUPAC.

### 1.5 El cultivo bacteriano.-

Según la literatura, las cepas de las muestras eran cultivadas en un medio líquido de un volumen aproximado de 70 ml. y opacos para que no los alterase la luz. Los representantes de los géneros *Actinomycetes* y *Arachnia* fueron incubados anaerómicamente. El medio de crecimiento y los regímenes de incubación fueron elegidos para potenciar el buen crecimiento de las cepas de la muestra y en todos los casos las células fueron obtenidas en la primera fase después de ser comprobada su pureza. Las células esterilizadas fueron centrifugadas, lavadas dos veces con agua destilada y liofilizadas. Las muestras liofilizadas fueron utilizadas inmediatamente o guardadas a temperatura ambiente en la oscuridad hasta su uso. Poco se sabe sobre el efecto de los regímenes del cultivo en la composición de la menaquinona, pero la influencia de tales condiciones en perfiles de los ácidos grasos en *Actinomycetes* ha sido estudiada por Kroppenstedt (29).

Algunos investigadores como Saddler et al. (30), Tamaoka (31) y Yassin et al. (32), demuestran que las menaquinonas estructurales de ciertos actinomicetos, varían según el tiempo de cultivo de los mismos. Así, la composición de menaquinonas de

*Nocardiosis dassonvillei*, se ve incrementada en menaquinonas insaturadas o hidrogenadas en el transcurso de su fase de crecimiento exponencial.

Especies de Enterobacterias, poseen en su contenido estructural ubiquinonas, menaquinonas y demetilmenaquinonas.

La influencia que ejerce la presencia de la presión parcial de oxígeno en cuanto a su contenido de quinonas, fue estudiado por Whistance et al. (33). Así, cuando se suprime este compuesto, las cantidades de ubiquinonas y de demetilmenaquinonas, disminuyen, mientras que por el contrario, crecen las de menaquinonas. Cepas de *Escherichia coli* recrecidas en atmósfera de nitrógeno, contienen una considerable cantidad de menaquinona junto con trazas de ubiquinona, según pone de manifiesto Polglase et al. (34).

Hiraishi y Kogamata (35), observaron que cepas de *Micococcus luteus*, que crecen en medios ordinarios de cultivo, poseen MK-8 mayoritariamente, mientras que aquellas que crecen en medios químicamente enriquecidos, aumentan la proporción de esas mismas menaquinonas hidrogenadas hasta alcanzar el rango de concentración de las MK-8 no hidrogenadas.

*Micrococcus varians* IAM 12146, también posee diferente composición de quinonas, en función de la naturaleza de los medios de cultivo en los que se realice el mismo, según han demostrado Hiraishi et al. (36) y la aplicación de la taxonomía numérica en el género *Nocardia*, relacionado con *Mycobacterium* y llevado a cabo entre otros por Grund y Kroppenstedt (37), ha supuesto un considerable avance en este campo.

#### 1.6 Separación e identificación de menaquinonas.-

Los actinomicetos demuestran un grado muy alto de variación en la composición de la menaquinona. Así sus menaquinonas se diferencian considerablemente en la

longitud y el grado de saturación de la cadena isoprenílica, hecho puesto de manifiesto por Collins y Jones (38 y 39). Además, los isómeros de posición, con diferencias en la colocación de las unidades del isoprenilo, pueden tener en parte las cadenas laterales hidrogenadas según las investigaciones de Batrakov et al. 1976; Kroppenstedt 1982a; Yamada et al. (40 y 41). Además, las menaquinonas altamente saturadas en *Actinomicetes*, se destruyen fácilmente durante la preparación y el almacenaje, y algunos de los productos alterados se eluyen a partir de las fases RP-18, al mismo tiempo que las menaquinonas de cadena corta.

Por lo tanto, para la separación y la identificación de menaquinonas altamente saturadas, solamente la cromatografía en capa fina (fase inversa y con argentación) y la HPLC en fase reversa, alcanzan la separación y la identificación de estas menaquinonas. Una vez más aunque los pesos moleculares de las menaquinonas se pueden obtener por espectrometría de masas, el grado de saturación de la cadena lateral isoprenílica no se puede detectar de esta manera ni pueden ser exactos los datos cuantitativos obtenidos. Es pues necesario complementar la información cromatográfica con la obtenida a través de la espectrometría de masas.

El uso de fases estacionarias con diversas polaridades en la separación, es útil para la identificación de las complejas mezclas de menaquinonas. Dos fases estacionarias fueron desarrolladas: separación en una fase inversa lipofílica (RP-18) con el acetonitrilo-tetrahidrofurano (70:30 v/v) (Kroppenstedt 1981(29) o el acetonitrilo-isopropanol (75:25 v/v) como fases móviles y un cambiador de plata cargado del ión  $\text{Ag}^+$ -cromatografía compleja con el metanol (100%) como fase móvil a temperatura elevada (40-60°C). El perfil de elución de las menaquinonas



completamente insaturadas, se lleva a cabo en octadecilsilano (RP-18), y con cambiador de plata, cargado con dicho ión.

Para estas menaquinonas, ambas columnas demuestran el mismo comportamiento en la retención. En RP-18 esto es debido al carácter lipofílico de la cadena lateral, la cual depende del número de átomos de carbono y del número de las unidades saturadas de isoprenilo dentro de la cadena, pero en la columna de  $Ag^+$  la separación es debida a la formación del complejo entre la plata en el cambiador del ión y los electrones de los enlaces dobles. Además, la separación de los isómeros cis-trans en la fase  $Ag^+$  puede verse en la Fig. 18.

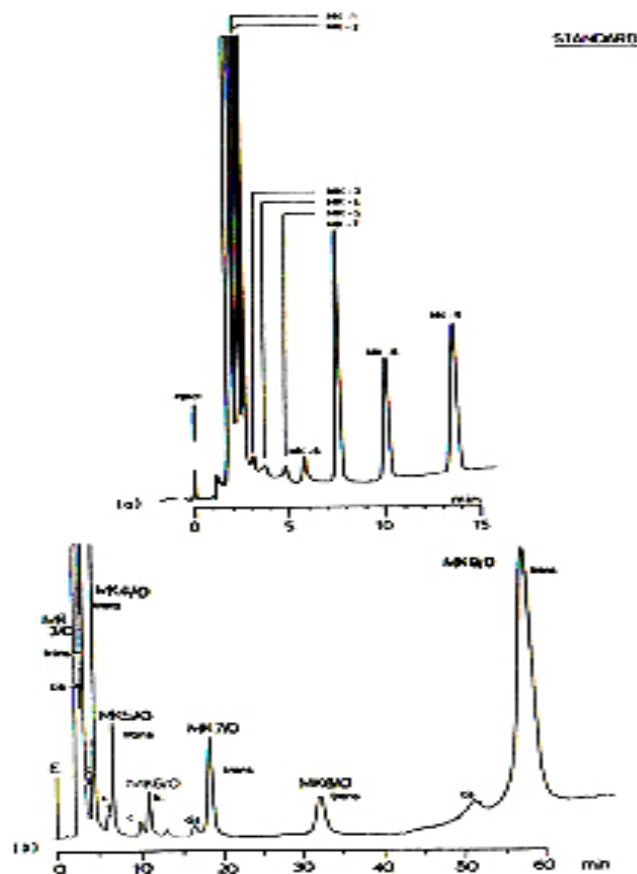


Fig.18, Separación de mezclas estándar de menaquinonas por HPLC sobre diferentes fases estacionarias.

El comportamiento contrastado de las menaquinonas parcialmente saturadas se pone de manifiesto, demostrándose que en columna RP-18 estas menaquinonas

son eluidas más tarde que sus homólogas insaturadas, mientras que en la columna de Ag<sup>+</sup> aparecen antes. Las menaquinonas con la misma longitud de cadena y grado de saturación de hecho varían con las posiciones de sus unidades de isoprenilo (unidades de isoprenilo saturadas). Se distinguen por su diverso comportamiento en el RP-18 y en la columna de Ag<sup>+</sup>. La MK-9 (II, III, IX-H<sub>6</sub>) del *Streptomyces griseus* y la MK-9 (II, III, VIII-H<sub>6</sub>) del *Actinomadura madurae* tienen casi el mismo tiempo de retención en RP-18, pero se pueden separar antes en la columna de Ag<sup>+</sup>. Un fenómeno similar se observa con la *Nocardia brasiliensis* y la *Nocardia autotrophica*, las cuales contienen el MK-8(H<sub>4</sub>). Así la menaquinona de *N.brasiliensis* tiene un tiempo de retención más largo en RP-18 que el de la *Nocardia autotrophica*, pero más corto en la columna de plata. Los datos cromatográficos indican que el MK-8(H<sub>4</sub>) de *N.autotrophica* es MK-8(II, III-H<sub>4</sub>). La estructura de la otra menaquinona es desconocida pero se encuentra solamente en la *Nocardia sensu stricto* (*N.asteroides*, *N.brasiliensis*, *N.brevicatena* y *N.otitidis-caviarum*).

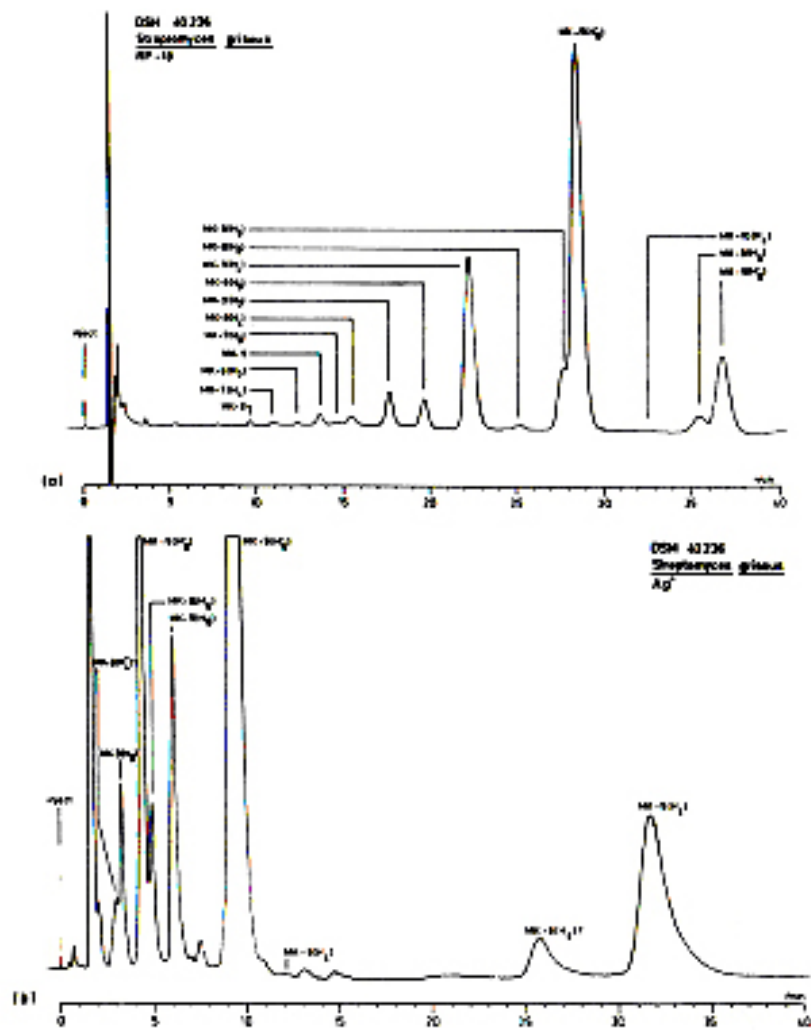


Fig.19, Separación de menaquinonas bacterianas por HPLC sobre diferentes fases estacionarias.

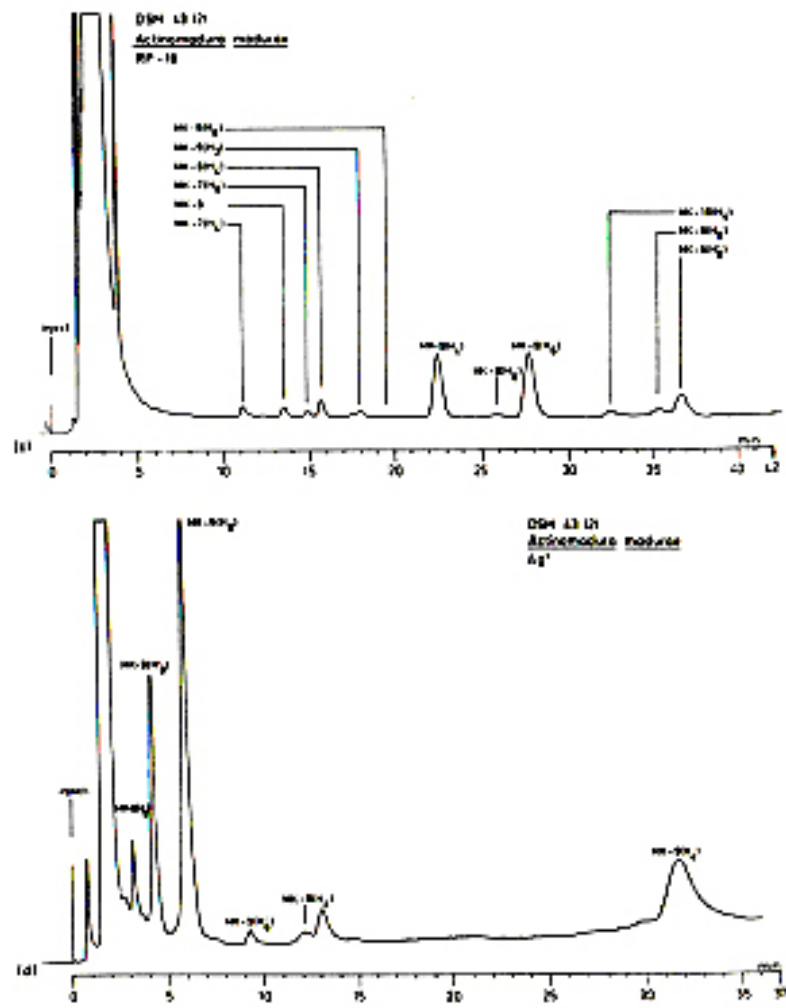


Fig. 20,

Fig.20, Separación de menaquinonas bacterianas por HPLC sobre diferente fases estacionarias.

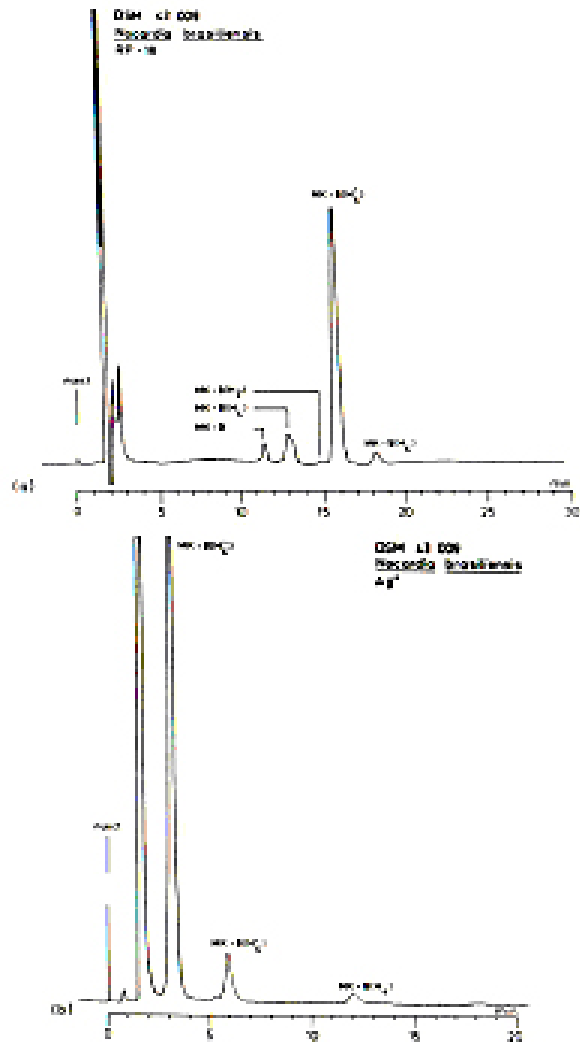


Fig. 21, Cromatografia para análise de menaquinonas.

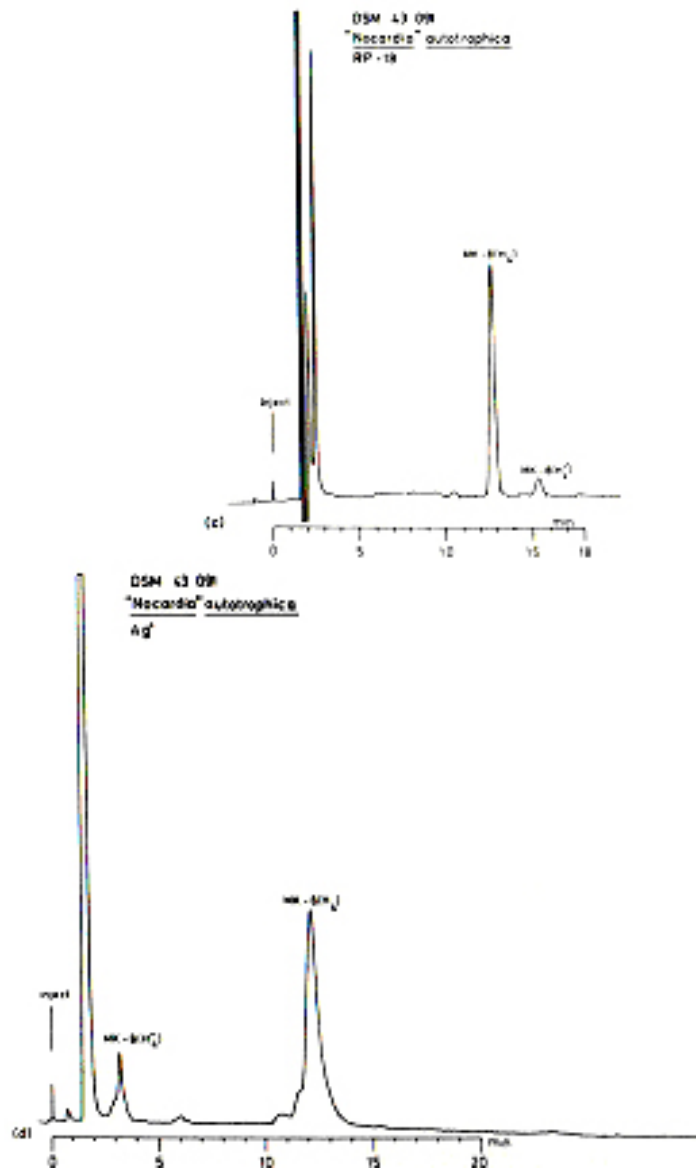


Fig. 21, Cromatografía para análisis de menaquinonas en *Nocardia autotrophica*.

Las menaquinonas se identifican por sus tiempos de retención, ya que los estándares son comercialmente inasequibles. Las preparaciones de menaquinona de las cepas bacterianas pueden ser utilizadas como patrón según está descrito en la literatura por Collins & Jones (38 y 39). Con sólo algunos estándares de menaquinona, los tiempos de retención del resto de los menaquinonas se obtienen gráficamente, trazando los tiempos netos de retención (el tiempo para el volumen de elución se extrae a partir del tiempo para el volumen vacío) de los homólogos de la

menaquinona frente a su número de unidades isoprenílicas. Las líneas rectas se obtienen en papel semilogarítmico. Se aprecian en la Fig.22, que las cinco series (1 a 5) de menaquinonas homólogas se diferencian solamente en su grado de saturación de un grupo de cinco líneas paralelas. Otro grupo de cuatro líneas paralelas de diversa pendiente, está formado por cuatro series de menaquinonas homólogas que se diferencian en su número de unidades de isoprenilo. Por interpolación o extrapolación, los datos de retención para las menaquinonas desconocidas se pueden obtener por este método. Alternativamente, los datos que faltan de la retención de menaquinonas homólogas se pueden calcular por regresión lineal (Tamaoka et al.) (42).

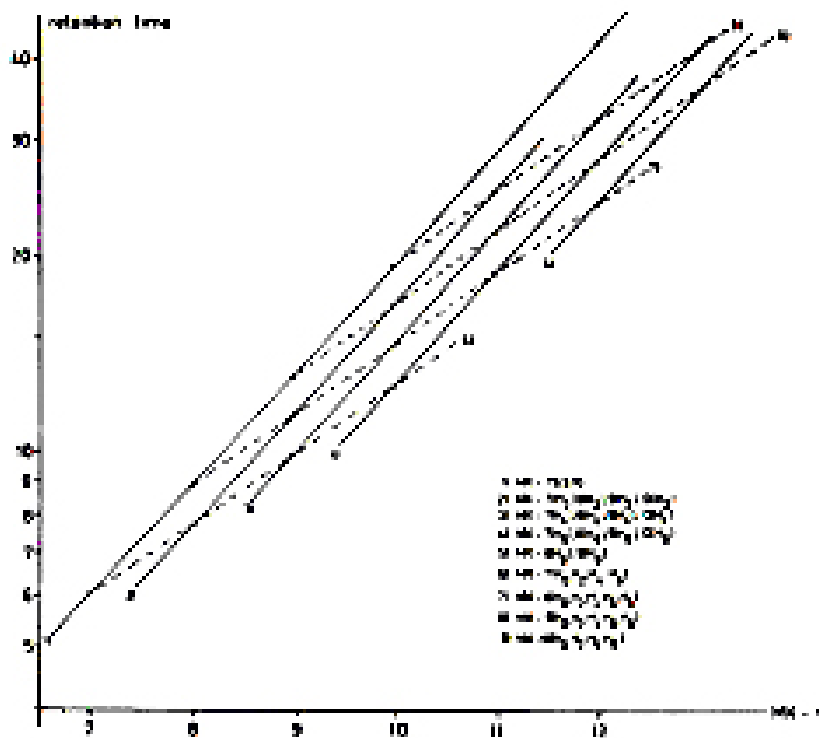


Fig 22, Relación entre el número de unidades de isopreno y los tiempos de retención ( $t_r$ ) para series de menaquinonas homogéneas, trazado sobre papel semilogarítmico (fase inversa en columna de HPLC).

### 1.7 Separación e identificación de menaquinonas por Cromatografía en Capa Fina (CCF).-

Inicialmente, y en ausencia de la cromatografía líquida de alta presión (HPLC), se utilizaron métodos cromatográficos para la separación e identificación de las menaquinonas extraídas de los microorganismos.

De hecho, la literatura científica, está ampliamente documentada en revisiones que van por esta línea (43, 44, 45 y 46), poniendo de manifiesto las peculiaridades de los diferentes métodos, escasamente utilizados en la actualidad, con esas características ya obsoletas, pero de indudable interés experimental.

La fase estacionaria utilizada es en todos los casos la gel de sílice, con adición de sales argénticas o rodamina, que una vez eluidas y desarrolladas, permiten la visualización de las diferentes fracciones obtenidas.

Esta visualización se lleva a cabo bajo lámpara UV, o con solución al 1% de fluoresceína en etanol.

La fase móvil, está constituida en muchos casos por n-butilo y hexano en proporción 10:90 o bien mezclas de éter dietílico-pentano, metanol- benceno 5:95, butanona-hexano o éter de petróleo-acetato de etilo, de polaridades variables, sin excluir la dimetilformamida-agua o acetona-agua, en las fases más polares.

El catión argéntico ha sido muy usado en este tipo de cromatografía, como soporte de separación de menaquinonas con diferente grado de saturación (47).

De hecho, se ha podido separar, gracias a estas placas impregnadas en plata, utilizando una fase móvil de alcohol metílico en acetona, las menaquinonas que se ponen de manifiesto en la Figura 23.



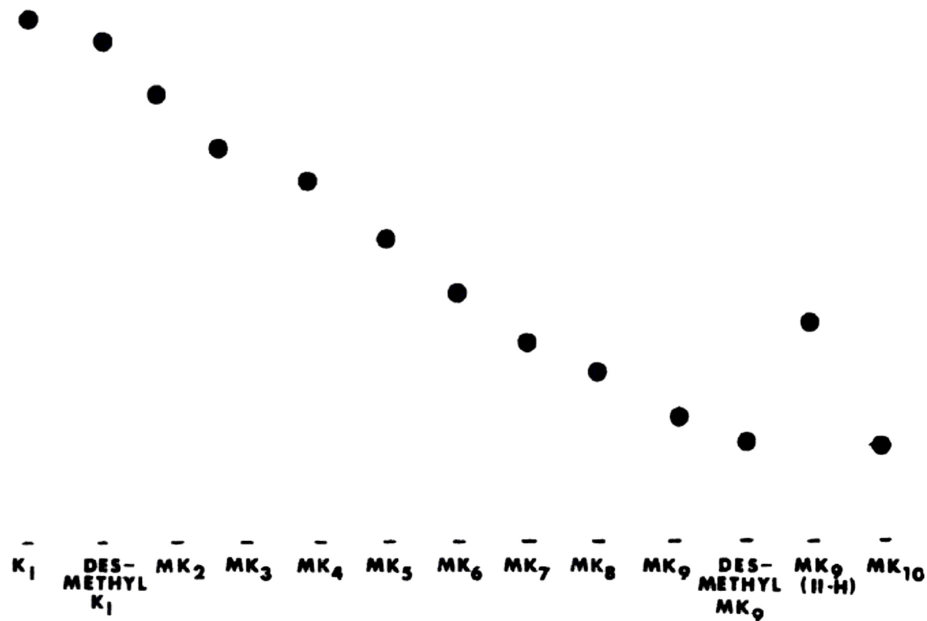


Fig 23, Cromatografía en capa fina de menaquinona en metil-etil-cetona 15% en hexano.

También se han utilizado columnas de Sephadex (LH-20) para el estudio de estas menaquinonas (48 y 49).

### 1.8 Presencia de quinonas en microorganismos.-

La distribución de quinonas isoprenoides en microorganismos es amplia y variada, como amplios y variados son el número de géneros y especies involucrados. Así, dentro de la Enterobacterias, se han descrito la presencia de menaquinonas demetilmenaquinonas y ubiquinonas en *Escherichia*, *Klebsiella* y *Proteus*, observándose que las proporciones relativas de las mismas pueden estar influenciadas por el grado de aireación a los que sean sometidos los cultivos bacterianos. Así en *Escherichia coli*, se incrementa el contenido de menaquinonas y se reduce el de ubiquinonas en estas circunstancias (50, 51).

*Actinobacillus*, *Cytophaga*, *Acinetobacter*, *Azotobacter*, *Flavobacterium*, *Haemophilus* y *Pasteurella*, han sido ampliamente estudiados por Makula et al,

Marcus et al. y Mannheim et al. (52, 53 y 54); dentro de estos géneros, *Actinobacillus* y *Pasteurella*, contienen demetilmenaquinonas (54).

*Pseudomonas denitrificans* y *Pseudomonas spp.*, contienen Q-9, Q-10 y Q-11, teniendo como curiosidad, el hecho de que estas quinonas isoprenoides de más de 10 unidades de isopreno, se encuentran solo descritas hasta el momento, en ciertas bacterias fotosintéticas (55, 56 y 57).

*Acetobacter*, contiene Q-9 como componente mayoritario en su composición, mientras que *Gluconobacter* y *Acetobacter xylinum*, contienen Q-10 (58, 59 y 60).

#### 1.9 Componentes quinónicos de Micobacterias.-

*Mycobacterium flavum* y *Mycobacterium phlei*, junto con *Corynebacterium autotrophicum*, fueron estudiados por Collins, Goodfellow y Minnikin en 1979 (1). Collins et al., detectaron picos correspondientes a quinonas saturadas y no saturadas mediante cromatografía en fase reversa.

*Mycobacterium avium* fue estudiado por Azerad y Cyrot-Pelletier (61) y por Beau et al. (62), poniendo de manifiesto la presencia de MK-9.

*Mycobacterium bovis* fue estudiado por Collins et al. en el año 1977 (3), poniendo de manifiesto la presencia de MK-9 y MK-8.

*Mycobacterium farcinogenes* fue estudiado también por Collins y su equipo (3), observando en esta especie la presencia de MK-8 hidrogenada y de MK-9.

*Mycobacterium fortuitum* fue estudiado por Beau, Azerad y Lederer en 1966 (62), apreciando en su estructura la presencia de MK-9, pero no de MK-8.

*Mycobacterium intracellulare* fue estudiado también por el equipo de Collins (3), apreciándose en su estructura la presencia de MK-8 y de MK-9.

*Mycobacterium johnei* fue estudiado por el equipo de Collins (3), detectándose en el mismo la presencia de MK-8 y de MK-9.

*Mycobacterium kansasii* fue estudiado por Azerat y Cyrot-Pelletier (61), apreciándose la presencia solo de MK-9.

*Mycobacterium smegmatis*, también fue estudiado por Collins y su equipo (3), detectándose la presencia de MK-8 y de MK-9.

El bacilo tuberculoso, *Mycobacterium tuberculosis*, por su importancia patológica, ha sido uno de los más estudiados, destacando los equipos de Truglio (66), Dunphy (67), Beau (62) y de Yamada (64), que detectan en su estructura la presencia de MK-7, MK-8 y de MK-9.

Por su semejanza con las micobacterias, cabe destacar *Nocardia farcinica*, estudiada por el equipo de Yamada (65), la *Nocardia asteroides*, estudiada por el equipo anterior (64, 65) y el *Rhodococcus bronchialis*, estudiado por Collins y colaboradores (3).

Con relación a los patrones utilizados, la menadiona 2-metil-1,4-naftalenodiona; 2-metil-1,4-naftoquinona; menaftona; vitamina K-2; de peso molecular 172 (18) fue ya descrita en 1940 por Fieser (68). Monitor y Robinson, se centraron en su estudio de toxicidad (69) y su farmacocinética la llevaron a cabo Taggart y Matschiner (70).

La menaquinona 4, posee un peso molecular de 484 y su denominación según las normas de la IUPAC, es (E,E,E)-2-metil-3-(3,7,11,15-tetrametil-2,6,10,14-hexadecatetraenil)-1,4-naftalenodiona; menatetrenona: MK 4.

La menaquinona 6, posee un peso molecular de 580 y su denominación es la de (todo-E)-2-(3,7,11,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,,22-tetracosaeenil)-3-metil-1,4-naftalenodiona; 2-difarnesil-3-metil-1,4-naftoquinona; farnoquinona o MK 6.

La menaquinona 7, de peso molecular 648, es denominada (todo-E)-2-(3,7,11,15,19,23,27-heptametil-2,6,10,14,18,22,26-octacosaeptaenil)-3-metil-1,4-naftalenodiona o MK 7.

En general acerca de las quinonas en microorganismos, la biosíntesis de las cadenas isoprenílicas, también parecen seguir los caminos definidos que conducen a la formación de los patrones en las menaquinonas especiales de los diversos grupos. El tipo 1 de menaquinona, agrupa a las que no poseen los átomos adicionales de hidrógeno (tipo de la Eubacteria). Es muy rara su presencia en los actinomicetos, pues se encuentran solamente en la *Gordonia aurantiaca* (Goodfellow et al. 1978), *Corynebacterium paurometabolum* (Collins 1978; Collins & Jones 1982) y la inusual *Agromyces ramosus* (Collins 1982b; Döper et al. 1982). La presencia de endosporas y de MK-7 en *Thermoactinomyces* (Cross et al. 1968; Collins et al. 1982), es constante agrupando a la familia *Bacillaceae* (Stackebrandt & Woese 1983). El tipo 2 de Menaquinona, con sólo un tipo de menaquinona parcialmente saturada, se encuentra generalmente en el género representativo que contienen ácido micólico (*Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* y *Rhodococcus*). El tipo 3 alberga a las menaquinonas del mismo grado de hidrogenación pero que se diferencian en la longitud de la cadena isoprenílica, mientras que el tipo 4 de organismos que sintetizan las menaquinonas, lo hacen de la misma longitud de cadena isoprenílica pero que tenga diverso grado de saturación.

TABLE 4  
Menaquinone types in members of the order Actinomycetales

Type	Main menaquinones	Main representatives
<i>Eubacteria</i> (no hydrogenation of the isoprene units)	1 a { MK-7 b { MK-9	<i>Thermotoga</i> <i>Gordonia</i>
<i>Mycobacterium</i> (only one type of menaquinone occurs, mainly dihydrogenated or tetrahydrogenated quinones with eight or nine isoprene units)	2 a { MK-8(H <sub>2</sub> ) b { MK-8(H <sub>4</sub> ) <sup>*</sup> c { MK-9(H <sub>2</sub> ) d { MK-9(H <sub>4</sub> )	<i>Rhodococcus</i> <i>Nocardia</i> <i>Mycobacterium</i> <i>Geodermatophilus</i>
<i>Saccharomonospora</i> (tetrahydrogenated multi-prenyl menaquinone)	3 a { MK-8(H <sub>4</sub> ), MK-9(H <sub>4</sub> ) b { MK-9(H <sub>4</sub> ), MK-10(H <sub>4</sub> )	<i>Saccharomonospora</i> <i>Actinoplanes</i> <sup>*</sup>
<i>Streptomyces</i> (menaquinones with same chain length but different degree of saturation)	4 a { MK-9(H <sub>2</sub> ), MK-9(H <sub>4</sub> ), MK-9(H <sub>6</sub> ) b { MK-9(H <sub>4</sub> ), MK-9(H <sub>6</sub> ), MK-9(H <sub>8</sub> ) <sup>*</sup> c { MK-10(H <sub>4</sub> ), MK-10(H <sub>6</sub> )	<i>Micromonospora</i> <i>Streptomyces</i> <i>Novosphingia</i>

<sup>\*</sup>May be differentiated into subgroups.

<sup>\*</sup>Overlapping may occur to group two sometimes in *Micromonospora*.

*actinomycetales* may be demonstrated by using a few examples drawn from morphologically similar organisms. Thus true corynebacteria are difficult to distinguish from rhodococci, which also synthesize short-chain mycolic acids; both groups of organisms have many morphological, physiological (Seiler 1983) and chemical properties (Minnikin *et al.* 1978) in common. However, while tuberculostearic acid is invariably found in rhodococci, it is not synthesized by most corynebacteria. Similarly, corynebacteria lack phosphatidylethanolamine (PE) (Table 2, phospholipid type 1) whereas rhodococci always contain this lipid. The separation of *Dermatophilus* and *Geodermatophilus* strains on the basis of their fatty acid profiles (Table 1) is further evidence

Tabla 2, Tipos de menaquinonas dentro de los actinomicetales.

De especial interés es el caso de las menaquinonas con la misma longitud de la cadena del isoprenilo y el grado de saturación (estereoisómeros), que parecen poseer taxonomía-específica entre actinomicetos, e.g.; *Nocardia autotrophica* MK-8(II, III-H<sub>4</sub>) frente a *Nocardia asteroides* MK-8 o *Streptomyces griseus* MK-9(II, III, IX-H<sub>6</sub>) frente a *Actinomadura madurae* MK-9(II, III, VIII-H<sub>6</sub>).

190

Taxa	Type	Fatty acid pattern						Menaquinone-type (number of isoprenyl units/additional H-atoms) Type
		Saturated	Unsaturated	Number of carbons			10-Methyl 17/18	
				Iso-16	Iso-15/17	Anteiso-15/17		
<i>Thermomonospora curvata</i>	3c	-	-	+++	+	+	+ -	4c 10/4, 10/6
<i>Thermomonospora mesophila</i>	3c	-	-	+++	+	+	+ -	4a 9/2 9/4 9/6
Polysporic actinomycetes:								
<i>Actinomadura flexuosa</i> <sup>b</sup>	3c	+	+	+	++	+++	+ -	4a 9/0, 9/2, 9/4
<i>Actinomadura madurae</i>	3a	+++	++	+	-	-	+ ++	4b 9/4 9/6* 9/8
<i>Actinomadura pusilla</i>	3c	+++	(v)	+++	+	-	++(+)	4a 9/2 9/4 9/6*
<i>Exciliospora</i>	3d	+++	+	+++	+++	+	+ ++	4b 9/4 9/6* 9/8
<i>Microbispora</i>	3c	++	-	+++	(v)	(v)	+++	4a 9/0 9/2 9/4
<i>Microbispora angiospora</i>	3c	++	++	-	-	-	(+)++	4a 9/2 9/4 9/6*
<i>Microbispora faeni</i>	2d	+	-	+++	++	++	++(+)	3b 9/4, 10/4
<i>Microbispora internatus</i>	2d	++	(+)	+++	+	++	- -	4a 9/0 9/2, 9/4
<i>Microtetraspora</i>	3c	++	(v)	+++	(v)	-	++(v)	4a 9/2 9/4 9/6*
"Nocardia" autotrophica	3b	++	++	+++	++	+	++-	2b 8/4
<i>Nocardioflavis</i>	3d	+	++	+++	(+)	+	- +	4c 10/4 10/6
<i>Pseudonocardia</i>	2b	(+)	-	++	+++	+	- -	2b 8/4
<i>Saccharopolyspora Actinoplanaceae</i>	2d	++	-	++	++	++	- -	4a 9/2 9/4

191

<i>Actinoplanes</i>	2c	+	++	++	++	++	- -	3b 9/4, 10/4
<i>Ampulloporangium</i>	2c	++	-	+	++	++	- -	2d 9/4
<i>Ampullariella</i>	2d	+	+	+++	++	+	- -	3b 9/4, 10/4
<i>Dactyloporangium</i>	2d	(v)	(v)	++	++	+	- -	4b 9/4, 9/6 9/8
<i>Pilimelia</i>	2b	+	+	(v)	+++	(v)	- -	4a 9/2, 9/4
<i>Planobispora</i>	3c	++	++	(+)	-	-	+++	4a 9/0 9/2, 9/4
<i>Planomonospora</i>	3a	++	++	(v)	(v)	-	- ++	4a 9/0 9/2 9/4
<i>Spirilluspora</i>	3a	++	++	+++	-	-	(+)++	n.d.
<i>Streptosporangium</i>	3c	++	+	++	(v)	(v)	++ +	4a 9/0 9/2, 9/4
Streptomycetaceae								
<i>Kitasatoa</i>	2c	+	(v)	+++	+	+++	- -	4a' 9/6 9/6, 9/8
<i>Microlobosporia</i>	2c	+	(v)	+++	+	+++	- -	4a' 9/4 9/6, 9/8
<i>Streptomyces</i>	2c	+	(v)	+++	+	+++	- -	4a' 9/4 9/6, 9/8
<i>Streptovorticillum</i>	2c	+	(v)	+++	+	+++	- -	4a' 9/4 9/6, 9/8
Actinomycetaceae								
<i>Actinomyces bovis</i>	1a	+++	+++	-	-	-	- -	4c 10/2, 10/4
<i>Actinomyces israelii</i>	1c'	+++	++	-	-	-	- -	4c 10/2, 10/4
<i>Agromyces</i>	2c	(+)	(+)	(+)	(+)	+++	- -	1c 11/0, 12/0
<i>Arachnia</i>	2c	+	+	+	+	+++	-	n.d.
Genera in search of a family								
<i>Intrasporangium</i>	2b	+	+	+++	+++	++	- -	1 8/0
<i>Nocardioides</i>	3a	+	+	+++	+	(v)	+ ++	2b 8/4
<i>Promicromonospora</i>	n.d.							2d 9/4
<i>Sporichthya</i>	3c	+	++	+	-	-	++ +	n.d.

Note: +, positive; v, variable; ( ), less than 5% and n.d., not determined. \* and ', stereoisomers, 8/4' = MK-8 (II, III H<sub>4</sub>), 8/4\* = MK-8 (? H<sub>4</sub>), 9/6\* = MK-9 (II, III, VIII-H<sub>4</sub>), 9/6' = MK-9 (II, III, IX-H<sub>2</sub>).

<sup>a</sup>Contain 2-OH-iso-C16 in addition.

<sup>b</sup>2-OH-iso/anteiso fatty acids.

<sup>c</sup>Contain cyclopropane fatty acids.

Tabla 3, Composición en ácidos grasos y menaquinonas de distintos géneros y especies bacterianas.

## 1.10 Análisis de las Quinonas Isoprenoides para la clasificación e identificación bacteriana.-

### 1.10.1 Métodos de Extracción.

Hasta hace poco tiempo, la sistemática bacteriana se edificó en base a un patrón de características morfológicas y de comportamiento de los microorganismos. Las cepas fueron asignadas a los grupos basados en las peculiaridades de las colonias y su micro-morfología, las características de tinción, la presencia y la ausencia de esporas, la capacidad de producir ácido a partir de los azúcares, de crecer en una variedad de compuestos como fuentes únicas de carbono y de crecer en presencia o ausencia de elementos inhibitorios.

Está, sin embargo ya claro que el poder discriminatorio de los criterios químicos puede variar entre los distintos grupos taxonómicos. Así, por ejemplo, la composición de la menaquinona de los aerobios, de las bacterias que forman endosporas y las muestras de los lípidos polares de *Staphylococcus*, son bastante uniformes, pero los menaquinonas y los lípidos polares son de interés en la clasificación de especie del *Staphylococcus* y del *Bacillus*, respectivamente. Es también posible que ciertas diferencias químicas puedan tener más significación taxonómica que otras.

Las quinonas respiratorias se oxidan rápidamente en presencia de oxígeno, siendo extremadamente sensibles a las condiciones de alcalinidad del medio. Para su extracción, es necesario evitar pH extremos y la luz potente, no siendo necesario trabajar en atmósfera de nitrógeno.

Las quinonas isoprenoides, son solubles en los disolventes lipídicos habituales, como son el éter de petróleo, el éter dietílico, acetona, cloroformo etc.

Existe un procedimiento de extracción a base de cloroformo-metanol. Para ello, se parte de unos 50 mg. de células bacterianas secas, que se someten a extracción con un volumen de unos 25-50 mililitros de una mezcla de cloroformo-metanol (2:1 v/v) en un espacio de tiempo que va desde una a dos horas. Algunos géneros como *Streptococcus faecalis* y *Bacteroides spp*, producen rendimientos bajos de quinonas, por lo que para la extracción de estos compuestos, se requieren del orden de 100 a 200 miligramos.

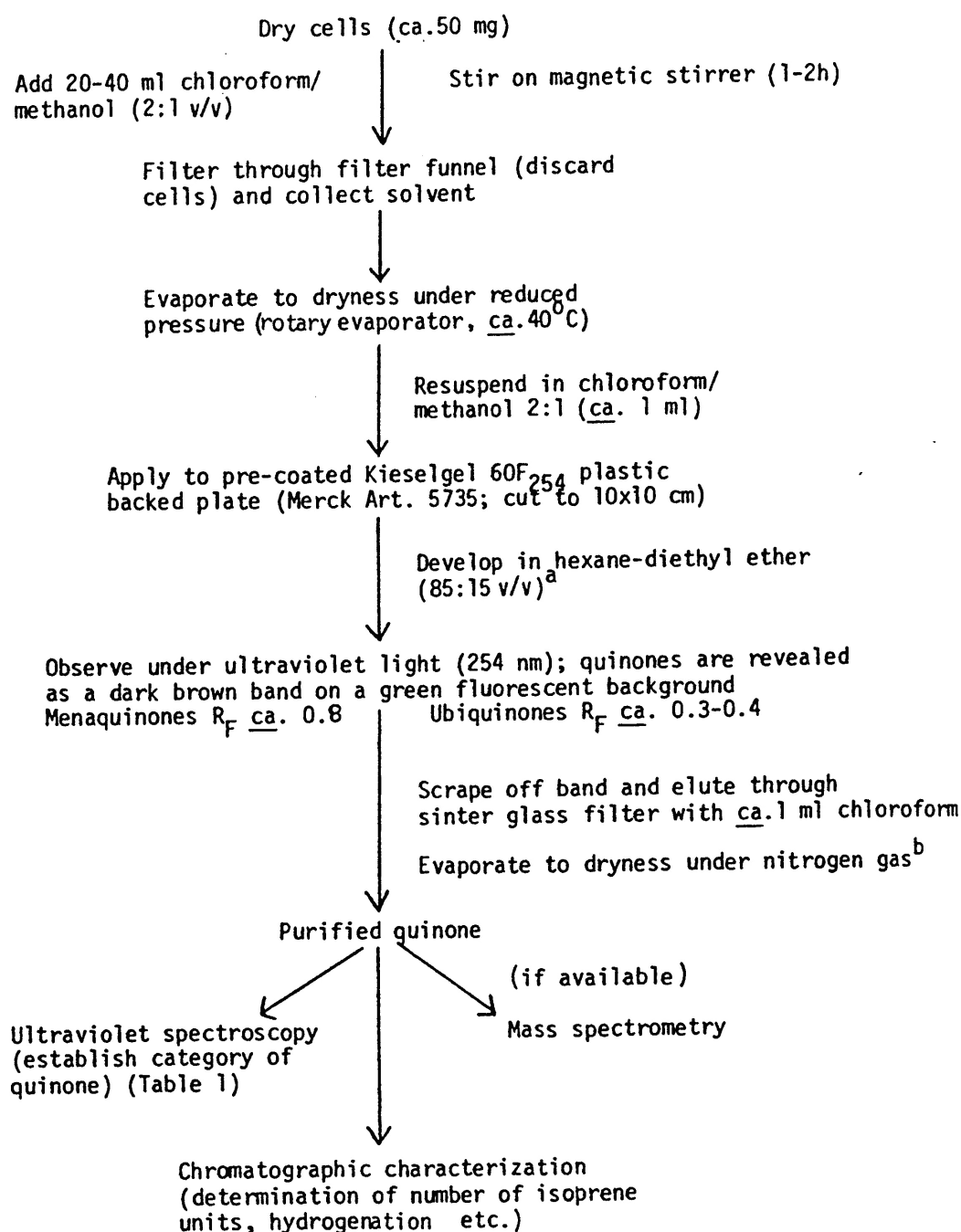
Una vez realizada la extracción, el extracto líquido se filtra a través de papel Whatman, evaporando con posterioridad el disolvente a presión reducida. El extracto lipídico se resuspende en un pequeño volumen de cloroformo-metanol y es aplicado sobre la gel de sílice para realizar la cromatografía.

La placa cromatográfica se eluye en una mezcla de hexano-éter dietílico (85:15, v/v) y son puestas de manifiesto las manchas de las quinonas con luz ultravioleta a 254 nm de longitud de onda. Estas quinonas se rascan y se eluyen con cloroformo.

La elución se realiza rascando la zona en la cual se ha desarrollado la quinona, previamente revelada, con una espátula y se lleva a un matraz erlenmeyer al que se agrega un disolvente orgánico (generalmente éter de petróleo), se filtra si es preciso en filtro de clavo (si existe poca cantidad) y si no en filtro normal o buchner y se evapora a rotavapor procurando que la temperatura del baño no sea elevada.



El esquema general de extracción es el siguiente:



\* Based on the procedure of Collins et al. (1977)

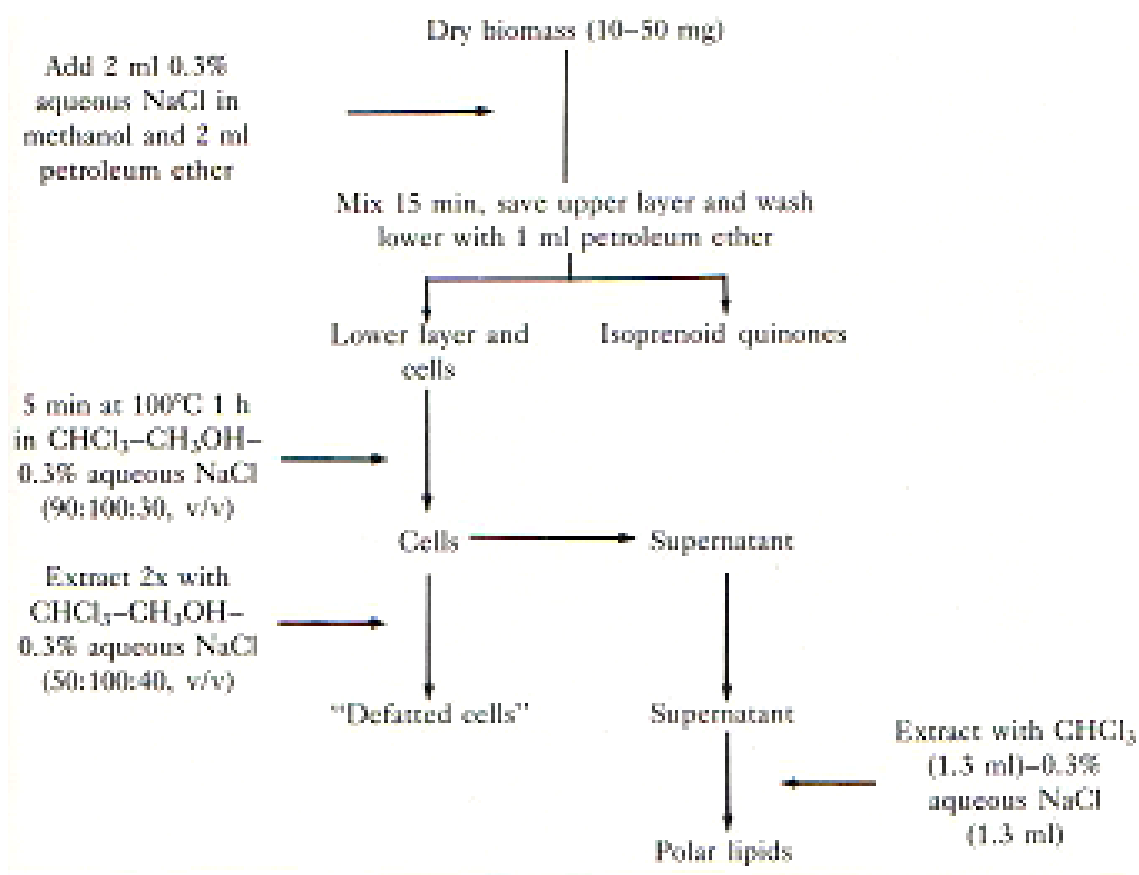
<sup>a</sup> For ubiquinones hexane-diethyl ether (80:20, v/v) is preferred.

<sup>b</sup> Use oxygen-free nitrogen.

Fig. 24, Extracción y purificación de quinonas isoprenoides.

Así, las quinonas isoprenoides aisladas son purificadas en pedazos de 10x10 cm de plástico recubierto de una hoja de gel de sílice (Merks 5735), usando una mezcla obtenida a partir del éter de petróleo (punto de ebullición 60-80° C) - acetona (95:5 v/v). Las quinonas isoprenoides purificadas son detectadas usando la luz UV (254 nm). Las zonas que contienen las quinonas isoprenoides se cortan posteriormente de la placa y se extraen usando el éter dietílico o cloroformo. Para proteger las quinonas isoprenoides extraídas contra las pérdidas debido a los efectos del aire y de la luz, las muestras se transfieren a pequeños viales de cristal, se disuelven en el éter de petróleo, se envuelven en la hoja de plata y se mantienen a -20° C antes del análisis por HPLC-espectrometría de masas o cromatografía en capa fina en fase-inversa.

Este procedimiento es general en todos los procesos en los que se trabaje en cromatografía en capa fina, siendo deseable que esta sea preparativa para obtener la mayor cantidad posible de producto a aislar y de esta forma no estar repitiendo la operación varias veces. La clave para conseguir esta cromatografía preparativa está en aplicar reiteradas veces el extracto a separar en la base de la placa de gel de sílice.



\*From Minnikin *et al.* (1984b).

Fig. 25, Extracción combinada de lípidos polares y quinonas isoprenoides.

Las capas inferiores, después de la extracción de las quinonas isoprenoides se examinan usando una modificación apuntada por Beau, Azerad y Lederer (46), Minnikin et al. (4), así como por el método de Morris (47) Bligh & Dyer, para dar un extracto del lípido polar. Los patrones del lípido polar se obtienen en los trozos de 6x6 cm de las hojas de aluminio recubiertas del gel de sílice (Merck 5554), con la TLC de dos dimensiones.

El sistema de disolventes se muestra en la figura 25. Todos los lípidos son detectados rociando al 5% con el ácido fosfomolibdico etanólico seguido de carbonizado a 180°C.

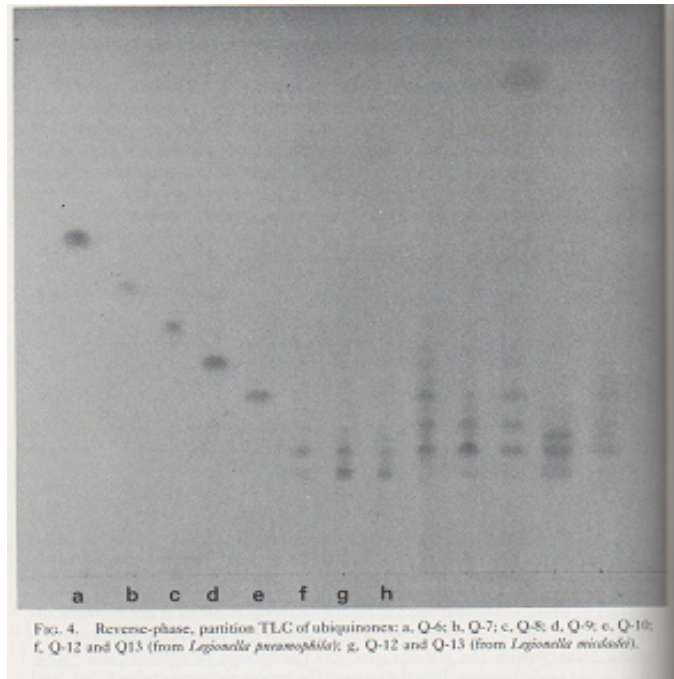


Fig. 26, TLC en fase inversa de Ubiquinonas.

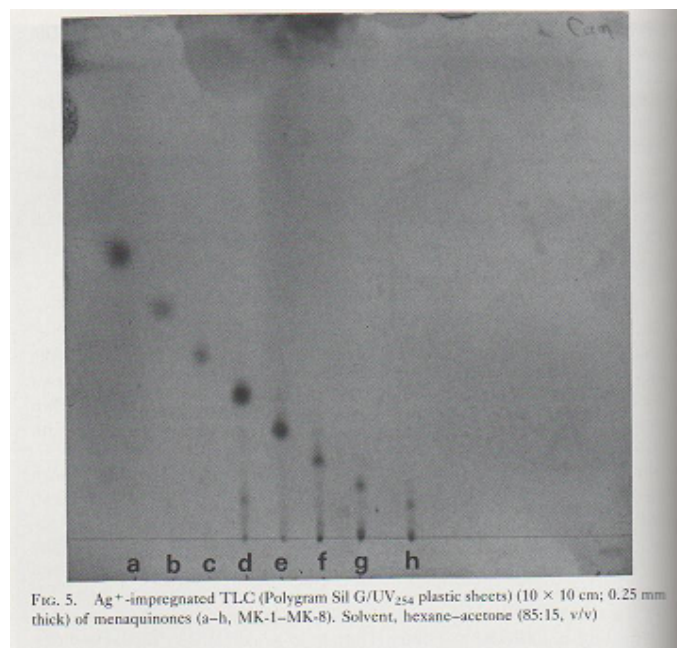


Fig. 27, TLC impregnada con el ión  $Ag^+$  de Menaquinonas. Hexano-acetona (85:15, v/v).

Las quinonas respiratorias son fotooxidadas absoluta y rápidamente en la presencia del oxígeno y con luz intensa, y son también particularmente susceptibles a las condiciones alcalinas. Así es preferible conducir la extracción y procedimientos

subsiguientes de la purificación bastante rápidamente, evitando valores extremos de pH y de la luz intensa. No es necesario realizarlo, sin embargo, trabajando en una atmósfera de nitrógeno o con luz muy débil, como se ha apuntado con anterioridad. Las quinonas isoprenoides son solubles en los disolventes generalmente de los lípidos, tales como éter de petróleo, éter dietílico, acetona y cloroformo. Los procedimientos adoptados para la extracción, utilizan uno de los solventes antedichos o una mezcla de dos de ellos. Los procedimientos de la extracción conducen normalmente a una mezcla de lípidos, más una cantidad pequeña de material no lipídico, de la cual las quinonas se pueden aislar fácilmente con procedimientos cromatográficos simples.

También se utiliza la Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la separación de quinonas en microorganismos. Así Suvarna et al. (130), realiza la separación de quinonas en microorganismos, en un cromatógrafo Waters 670 equipado con un Zorbaax ODS, columnas de 250 x4,6 mms., fase reversa, columna Cromopack Inc. Raritan. N.J. y como líquido de elución metanol-isopropil-éter en proporción 3:1 vol/vol.

Posteriormente y con equipos de HPLC más sofisticados, se han utilizado columnas polares o de fase reversa, en régimen isocrático o de gradiente y con detectores UV-Vis. para conseguir estos objetivos.

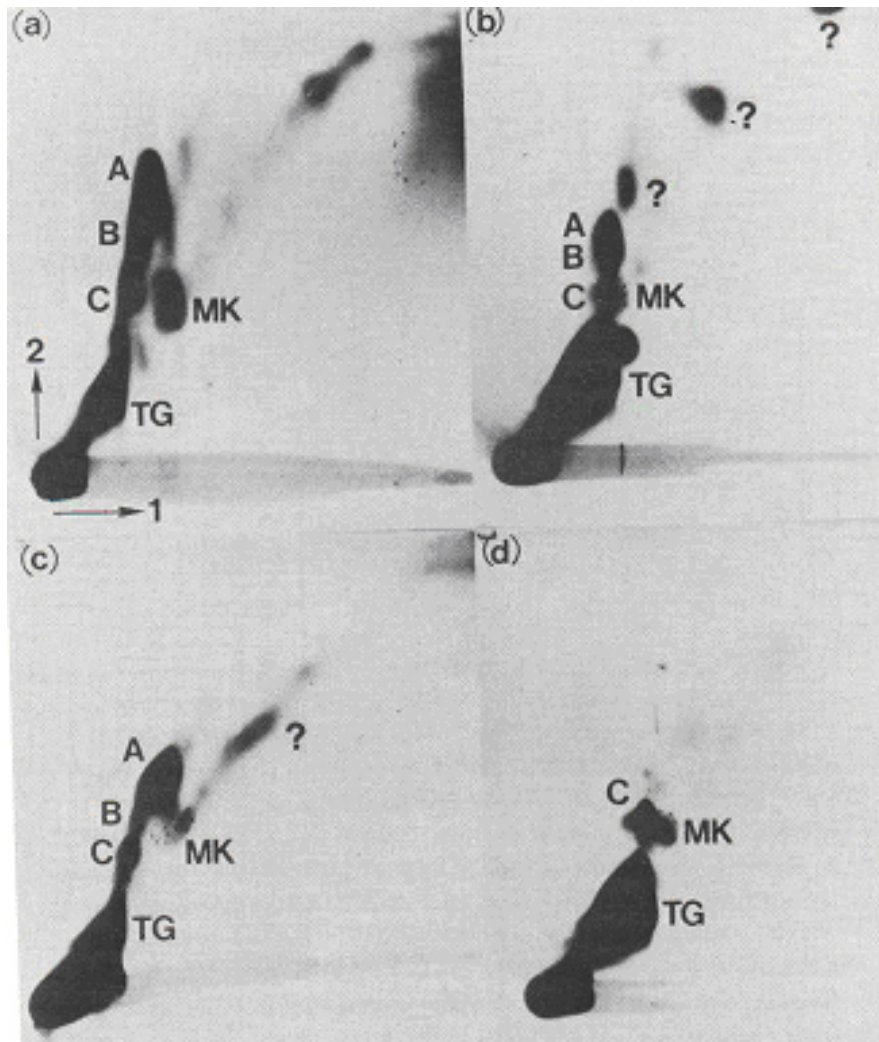


Fig. 28, TLC bidimensional del extracto de lípidos polares y menaquinonas de la pared celular en *Mycobacterium*.

### 1.10.2 Biosíntesis.

Una gama de los derivados de la naftoquinona, incluyendo la filoquinona (vitamina K1) y el menaquinona (vitamina K2), se producen a partir del corismato vía isochorismato 49, 2-succinil-6-hidroxiciclohexa-2,4-dieno-1-carboxilato (SHCHC) 200, el o-succinilbenzoato (OSB) 201, y 1,4-dihidroxynaftoato 203. La síntesis de CoA del o-succinilbenzoil de la enzima que activa OSB por la conversión en su éster alifático 202 de CoA en *E. coli* sobreexpresado y purificado. La enzima que es un homotetrámero, requiere el concurso de ATP y del coenzima A. Su actividad es

estimulada por los iones  $Mg^{2+}$ . Ni el benzoil CoA, ni el ácido benzoilpropiónico (succinilbenzeno) actúan como sustrato para la enzima purificada.

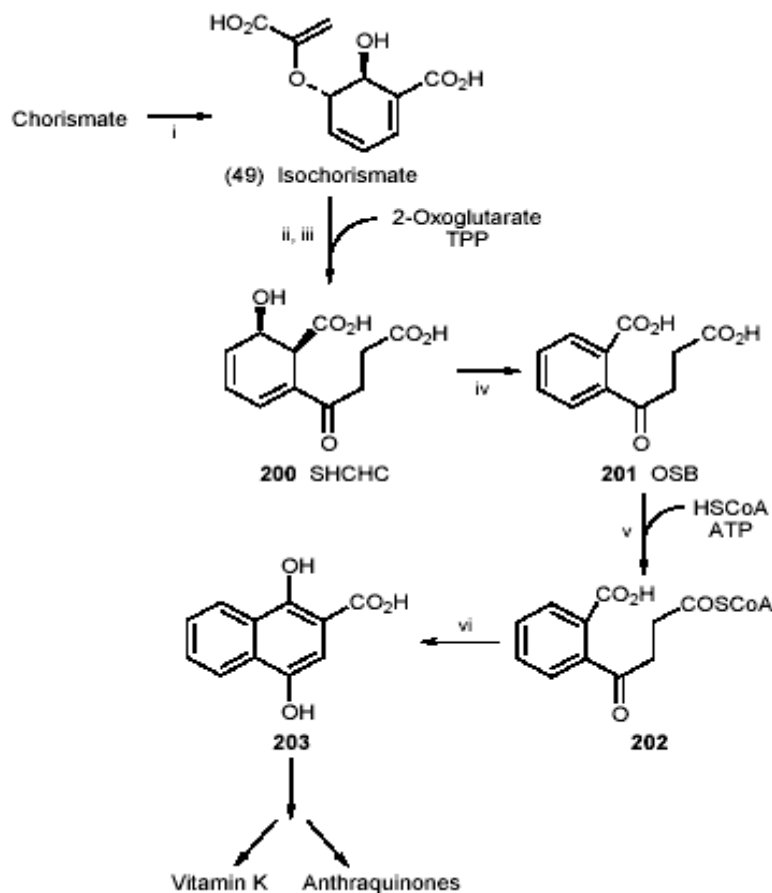


Fig. 29, Biosíntesis de quinonas.

Las ubiquinonas (coenzima Q) 209 también se deriva del corismato, pero vía 4-hidroxibenzoato 79, y la cadena lateral del isoprenoide de una longitud que varía según el organismo, se une a este sustrato temprano en la secuencia biosintética. El camino generalmente aceptado se demuestra en el esquema siguiente a pesar de que todos los productos intermedios estén comprobados en su totalidad. El ácido 3-Hexaprenil-4-hidroxibenzoico 204 ( $n=6$ ) se ha aislado como el material predominante del lípido, en los cultivos de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* provistas del ácido 4-hidroxibenzoico  $^{14}C$  marcado y crecidas bajo condiciones de la

fase-registro. En los cultivos de la fase inmóvil, etiquetadas como 204 también se produjo, pero el producto observado principal era la coenzima Q 209 (n=6). Un mutante de la levadura (coq7-1) deficiente en síntesis del ubiquinona fue encontrado y sintetiza el emetoxiubiquinona intermedio 207 (n=6).<sup>316</sup> La cepa tipo correspondiente al gen de coq7, fue aislado y ordenado, demostrado al crecimiento y la biosíntesis de ubiquinona al mutante. Varios mutantes de la canceladura coq7 entonces generados fueron demostrados para acumular 3-hexaprenil-4-hidroxibenzoico el ácido 204 más bien que 207. El gen coq7 puede codificar así una proteína implicada en uno o más pasos de monooxigenasa/hidroxilasa en la secuencia biosintética. En eucariotas, el primer paso del O-o-metilación es realizado por la proteína Coq3 en 3,4-dihidroxi-5-poliprenilbenzoato 205, mientras que en *E. coli*, el substrato predicho es 2-octaprenil-6-hidroxifenol 206 (n=8), con la enzima todavía que se identificará. El segundo O-o-metilación, conversión del demetilubiquinona 208 (n=8) en la ubiquinona, implica UbiG, una enzima que sea el 40% idéntico en secuencia del aminoácido a la levadura Coq3. Ahora se ha demostrado que UbiG cataliza probablemente pasos del O-o-metilación en *E. coli*.<sup>317</sup> que el gen del ubiG podía restaurar la respiración y la síntesis de ubiquinona en mutantes de la levadura coq3, con tal de que una secuencia mitocondrial del líder también fuera insertada para apuntar la actividad a la mitocondria. Los análisis in vitro demostraron que la enzima de UbiG podía desnaturalizar análogos sintéticos tales como el 3,4-dihidroxi-5-farnesilbenzoato eucariotico 205 (n=3) y el 2-farnesil-6-hidroxifenol procariotico 206 (n=3). La metilación de 3,4-dihidroxi-5-farnesilbenzoato 205 (n=3) también fue logrado usando las mitocondrias de la levadura que contenía el gen coq3, demostrando que la



longitud de cadena no es crítica para el sustrato reconocido 318

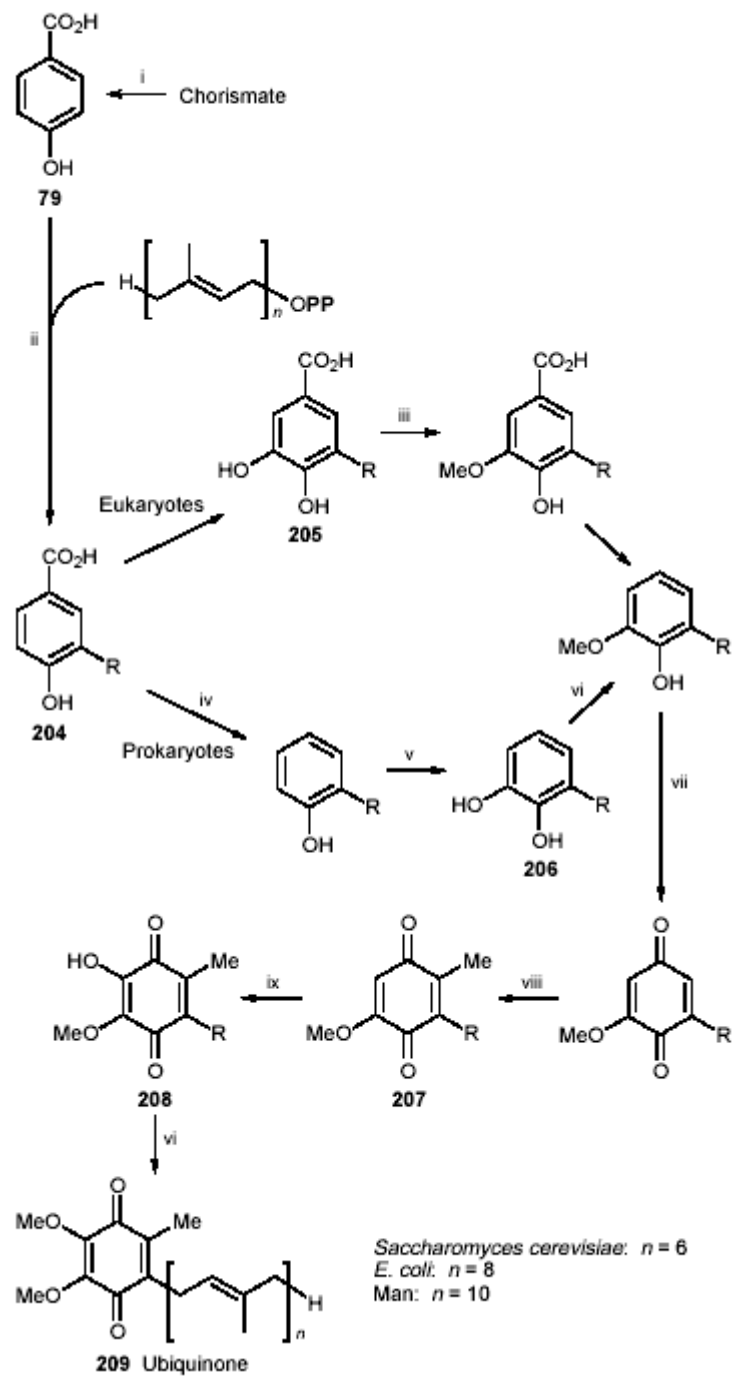


Fig. 30, Biosíntesis (continuación).

El camino biosintético de la ubiquinona en el género *Leishmania* demuestra probablemente características similares a esas en sistemas de mamíferos y de

bacterias. Así en estudios preliminares, el ácido 4-hidroxibenzoico, el acetato y el mevalonato fueron establecidos como precursores de la ubiquinona-9 209 (n=9).

## 2.1.- Micobacterias de crecimiento rapido.

### 2.1.1 Micobacterias atípicas.-

El conjunto de micobacterias, pertenecientes al género *Mycobacterium*, no productoras de tuberculosis y lepra ha recibido numerosas denominaciones: “micobacterias inclasificadas”, “bacilos paratuberculosos”, etc....

Actualmente, los términos más divulgados y quizás más correctos, son los de “micobacterias no tuberculosas” y “micobacterias atípicas”, siendo este último el más usado y aceptado por la comunidad científica.

### 2.1.2 Clasificación de las micobacterias atípicas.-

Los primeros intentos para clasificar estas micobacterias, se deben a Timpe y Runyon en 1954 y Runyon en 1959.

Runyon, teniendo en consideración algunas características comunes a las colonias de estas micobacterias, tales como su velocidad de crecimiento y su pigmentación, propuso su división en cuatro grupos diferenciados:

Grupo I: Fotocromógeno:

Las colonias presentan pigmentación cuando se exponen a la luz (fotoinducción). Si se incuban en la oscuridad, no producen colonias pigmentadas.

Grupo II: Escotocromógeno:

Producen colonias pigmentadas, con o en ausencia de luz.

Grupo III: No Fotocromógeno:

No producen colonias pigmentadas con, o en ausencia de luz.

Grupo IV: De Crecimiento Rápido:

Su característica diferenciadora fundamental es el crecimiento sobre medios de cultivo, que lo hacen en cortos períodos de tiempo; una semana aproximadamente.

Runyon, en esta clasificación, solo abarcaba una veintena de estas micobacterias atípicas que en el transcurso del tiempo fue aumentándose el número de especies a medida que eran reconocidas oficialmente por el ICBS.

- ***Mycobacterium aichiense***.

Tsukamura en 1973 (71), aísla por primera vez esta especie proveniente de Aichi, Japón. Se reconoce oficialmente a partir de 1981.

Ichiyama et al. (72), estudian la formación de carotenos beta en los cultivos de esta bacteria.

Características morfológicas y de cultivo:

Estos microorganismos son bacilos de 2 micras de longitud. Desarrolla colonias de textura lisa amarillo-anaranjadas, cuando se cultiva a una temperatura de 25 a 37°C, en un tiempo aproximado de 3 a 4 días en medios que contienen huevo.

- ***Mycobacterium aubagnense***.

Descrito por Adekambi et al. en 2006 (105), que estudian su secuenciación y concentración mínima inhibitoria (CMI).

Presenta resistencias a las quinolonas, tetraciclinas, macrólidos e imipenem.

- ***Mycobacterium aurum***.

Especie descrita por Tsukamura et al. en 1966 (73). No obstante, su confirmación como nueva especie se realizó muy posteriormente, gracias a los estudios de homología DNA/DNA llevados a cabo por Baes et al. en 1982 (74).

Características morfológicas y de cultivo:

Estos microorganismos son bacilos de 1-6 micras de longitud. Desarrollan colonias amarillo-anaranjadas, cuando se cultivan a temperaturas de 25 a 37°C, en un tiempo aproximado de 5 días en medios que contienen huevo.

- ***Mycobacterium austroafricanum.***

Especie descrita por Tsukamura et al. en 1983 (75).

Características morfológicas y de cultivo:

Estos microorganismos son bacilos de 2-6 micras de longitud y 0,5 micras de grosor.

Desarrollan colonias mucosas y amarillentas, cuando se cultivan a temperaturas entre 28 y 37°C, en un tiempo aproximado de 3 días en medios que contienen huevo. Adquieren una pigmentación más intensa, después de ser expuestas a la luz.

- ***Mycobacterium boenickei.***

Especie descrita por Schinsky et al. (106), y considerada como una variación del complejo *Mycobacterium fortuitum*.

Aislado en estudios clínicos de humanos en los que ocasiona infecciones respiratorias y bacteriemias. Relacionado con *Mycobacterium houstonense* y *Mycobacterium brisbanense* (136)

Se han caracterizado sus ácidos grasos por HPLC así como su genotipo.

- ***Mycobacterium bolleti.***

Descrito por Adekambi et al. (107).

Fue denominado así en honor del eminente microbiólogo clínico y taxonomista Claude Bollet.

Presenta resistencias a quinolonas, tetraciclinas, macrólidos e imipenem. También es resistente a la claritromicina.

Se le ha caracterizado el gen rpo B así como se ha efectuado en estudio de la concentración mínima inhibitoria (CMI) frente a diferentes antibióticos.

- ***Mycobacterium brisbanense***.

Schininsky et al. (108), dan referencia de él en 2004.

Fue denominado así al aislarse de muestras de la zona de Brisbane, Queensland en Australia.

Está relacionado con *Mycobacterium fortuitum* sorbitol negativo y con *Mycobacterium houstonense* y *Mycobacterium boenickei* (136)

- ***Gordonia bronchialis***.

Wermo et al. describieron los accesos producidos por ese microorganismo en 2005 (76) en pacientes inmunocomprometidos.

Por otro lado Garton y Sutcliffe (77), identifican el mananolipoarabinósido y el lipoglicano existente en esta especie.

- ***Mycobacterium canariesense***.

Citado por Jiménez et al. (109).

Fue denominado de esta suerte, al ser aislado en nuestras islas Canarias, a partir de muestras de sangre de pacientes con síndrome febril.

Es una micobacteria no pigmentada que se cultiva entre 30-37°C en el medio de Lowestein-Jensen y de Mac Conkey con cristal-violeta.

Contiene metil-micolato en su pared.

Es una micobacteria oportunista relacionada con *Mycobacterium diernhoferi*.

Se han estudiado sus ácidos grasos por cromatografía gaseosa.

- ***Mycobacterium chlorophenicum*.**

Estudiado por Häggblem et al. en 1994 (110).

Apajalahti lo denominó en 1986 *Rhodococcus chlorophenicus*, observándose con posterioridad que poseía características micobacterianas.

- ***Mycobacterium chubuense*.**

Tsukamura describe por primera vez este microorganismo en 1973 (78), aunque en 1980 no aparece todavía reconocido oficialmente en la lista presentada por Skerman y col. Tsukamura et al. reivindican su inclusión en 1981.

Esta especie se aisló por primera vez del suelo del jardín del hospital de Chubu en Japón, de ahí su denominación.

Características morfológicas y de cultivo:

Fundamentalmente, este microorganismo adopta formas cocoides.

Desarrolla colonias de textura lisa y amarillenta, cuando se cultiva a una temperatura de 25 a 37°C, en un tiempo aproximado de 3 días en medios que contienen huevo.

- ***Mycobacterium conceptionense*.**

Descrita por Adeckambi et al. en 2006 (111), en el Hospital de la Concepción en Marsella (Francia), proveniente de la biopsia de una paciente de 31 años operada de fractura de tibia derecha. Está asociada con osteitis postraumática.

- ***Mycobacterium cosmeticum*.**

Descrita por Cooksey et al. en 2004 (112).

Es parecida a *Mycobacterium smegmatis*, por estudios comparativos de HPLC.

Aislada en los desagües de un local de deportes en Atlanta (USA) y en un granuloma subdérmico de una paciente estudiada en Venezuela.

Relacionada con *M. frederikbergense*, *M. hodleri*, *M. diernohferi* y *M. neoaurum*.

Utiliza el manitol, la xilosa, inositol, arabinosa, trehalosa y da positiva la prueba de la aril-sulfatasa.

Es susceptible al ciprofloxacino, amikacina, tobramicina, cefixima, claritromicina, doxiciclina, sulfametoxiazol y al imipenem.

- ***Mycobacterium duvalii*.**

Especie descrita por Stanford y Gunthorpe en 1971 (79). Su denominación se hizo en honor del profesor Duval.

Se ha aislado en lesiones cutáneas.

Características morfológicas y de cultivo:

Este microorganismo es un bacilo pleomórfico. Desarrolla colonias de textura rugosa o lisa, amarillenta, cuando se cultiva a temperaturas de 25 a 37°C, en un tiempo aproximado de 7 días en medios que contienen huevo.

- ***Mycobacterium elephantis*.**

Especie descrita por Shojaei et al. en el año 2000 (113).

Fue aislado de un absceso pulmonar de un elefante adulto muerto de una enfermedad respiratoria crónica.

Está próximo a *M. confluentis*, *M. madagascariensis*, *M. phlei*, *M. pulveris* y a *M. flavescens*.

El estudio de los ácidos micólicos, permite diferenciarlo de *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. confluentis* y *m. fortuitum*, pero no de *M. madagascariense* y *M. phlei*.

Es un coco-bacilo débilmente ácido-alcohol-resistente. Da positiva la prueba de la catalasa termoestable, la benzamida y succinimida, acidificando la fructosa, el inositol, el manitol y el sorbitol.

Se cultiva de 25-30°C en el medio de Löwetein-Jensen y Midlebrook 7H10. El ciprofloxacino, el etambutol y el cloruro sódico al 5%, no lo inhiben.

- ***Mycobacterium flavescens*.**

Especie descrita por Bojalil, Cerbon y Trujillo en 1962 (80). Los mismos autores describen en el mismo artículo como nueva especie a *Mycobacterium acapulcensis*. Las descripciones originales de ambas especies son muy similares.

Con posterioridad, Pattyn et al. y Tsukaura además de otros autores, sostienen que *Mycobacterium acapulcensis* es idéntica a *Mycobacterium flavescens* (81).

Lechevalier et al. consideran a “*Mycobacterium gallinarum*” y *Mycobacterium flavescens* especies diferentes entre sí, en base a su composición lipídica (82).

Tsukamura y Mizuno en 1979 (83), dividen la especie de *Mycobacterium flavescens* en dos subgrupos, mediante la aplicación de técnicas cromatográficas. De los dos subgrupos, uno incluiría una serie de cepas catalogadas como *Mycobacterium flavescens* y el otro incluiría a *Mycobacterium gallinarum*. Estos subgrupos no son coincidentes con los obtenidos por Tsukamura et al. en 1981(84).

Tradicionalmente *Mycobacterium flavescens* se ha considerado que forma parte de la flora saprofita humana por Casimir et al. (85), aunque otros autores como Bergey et al., la consideran como causantes de infecciones pulmonares (86)

Características morfológicas y de cultivo:



Estos microorganismos desarrollan colonias amarillo-anaranjadas, cuando se cultivan a temperaturas de 25 a 37°C, en un tiempo aproximado de 7 a 10 días en medios que contienen huevo.

- ***Mycobacterium fluoranthenorans.***

Descrito muy recientemente por Hormisch et al. (114).

Una de las primeras cepas tipo estudiadas en el mundo de esta especie, ha sido la estudiada por nosotros.

- ***Mycobacterium fortuitum acetamidoliticum.***

Tsukamura et al. lo estudian en 1986 (115).

Constituye uno de los 85 aislados del complejo fortuitum, que produce patologías respiratorias siendo susceptible a la amikacina, gentamicina, ciprofloxacino, imipenem y sulfametoxazol y resistente a la doxiciclina.

Crece en presencia de sorbitol como fuente carbonada.

Relacionado con *M. houstonense* y *M. boenickei*.

El contenido en quinonas de esta especie fue realizado por Beau, Azerad y Lederer (62), encontrando la presencia de MK-9.

- ***Mycobacterium frederickbergense.***

Estudiado por Willumsen et al. en el año 2001 (116).

Aislado en Dinamarca de suelos carbonosos contaminados.

Filogenética y quimiotaxonómicamente es una micobacteria a todos los efectos, poseyendo en su constitución isómeros meso del ácido 2,6-diamino pimélico, a la vez que arabinosa y galactosa en su pared. El citado equipo, detecta en la misma la existencia de MK-9 (H2) y la relaciona con *Mycobacterium diernhoferi*, *Mycobacterium neoaurum* y *Mycobacterium hodleri* (137).

Posee así mismo menaquinonas, siendo la MK-9 (H<sub>2</sub>) la principal de ellas. Al mismo tiempo posee micolatos alfa, cetomicolatos y ésteres micólicos.

Está relacionado con *M. diernhoferi*, *M. neoaurum* y *M. phlei*.

- ***Mycobacterium gallinarum*.**

Especie descrita por Krasilnikov en 1941.

Lechevalier et al.(82) después de realizar estudios de la composición lipídica de *M. gallinarum* y *M. flavescens*, consideran que son especies diferentes entre sí.

- ***Mycobacterium gilvum*.**

Especie descrita por Stanford y Gunthorpe en 1971 (79), como nueva micobacteria de crecimiento rápido escotocromógena.

Se aisló en esputos en líquidos pleurales de enfermos, aunque no se le reconoce como especie patógena.

Características morfológicas y de cultivo:

Este microorganismo es un bacilo pleomófico. Desarrolla colonias de texturas lisa amarilla pálida, cuando se cultiva a temperaturas de 25 a 37°C, en un tiempo aproximado de 7 días en medios que contienen huevo.

- ***Mycobacterium hackesackense*.**

Cepas aisladas cinco veces de catéter venoso central y dos veces de sangre periférica, de una enferma de 6 años con leucemia linfocítica aguda recurrente de células pre-B. Todas las cepas presentaron la misma secuenciación de 500 pb del gen 16S rRNA. Especie de crecimiento rápido, no cromogénico, taxoquímicamente relacionado con *M. smegmatis* [*sensu stricto*] por el patrón de ácidos micólicos por HPLC y filogenéticamente relacionado con *M. diernhoferi* por la secuenciación de 14S rRNA. Infección relacionada con catéter venoso central.

Cultivo y crecimiento.

Las cepas crecieron en primer aislamiento en “pediatric FAN blood culture bottles” (bioMérieux, Durham, N. C.) e “Isolator blood culture tubes”

Crece a 24, 37 y 45° C en agar sangre y L.-J. A 37° C crece en 2 a 4 días. Subcultivos “5% blood and chocolate agar” a 37° C en 5% CO<sub>2</sub>. Colonias visibles, lisas, no pigmentadas, en tres días de incubación. No pigmentación tras prolongada observación.

Cocobacilos grampositivos, parcialmente AAR.

Pruebas fenotípicas.

Las pruebas básicas convencionales efectuadas son la tolerancia a 5% NaCl, catalasa semicuantitativa y termoestable, reducción del telurito, captación del hierro (iron uptake) AS 3 días, MacConkey sin cristal violeta, ureasa, utilización de azúcares y citrato.

Acidos micólicos.

Determinados por HPLC sobre la cepa 147-0552<sup>T</sup> mostrando un patrón muy similar entre *M. hackensackense* y *M. smegmatis* [ATCC 19420<sup>T</sup>], y próximo al de *M. diernhoferi*. Los ácidos micólicos identificados parecen corresponder a  $\alpha$ ,  $\alpha'$  y methoxi micolatos.

Secuenciación de 16S rRNA.

Las cinco cepas estudiadas dan la misma identidad de secuencia, correspondiendo a la misma especie. La comparación de la secuencia en Gen Bank, revela un “similarity value” del 99,1% con *M. diernhoferi* [ATCC 19340<sup>T</sup>], con una diferencia de 13 nucleótidos con la cepa 147-0552<sup>T</sup> de *M. hackensackense*.

Diagnóstico diferencial:

Según los autores (Hong et al. 2003), fenotípicamente debe hacer son *M. smegmatis sensu stricto* y con *M. diernhoferi*.

Acción patógena.

Hasta el momento, salvo el caso descrito que da lugar a la aportación de una nueva especie, no se conoce el potencial patógeno de la misma para el hombre o animales, ni las fuentes naturales de dicha especie.

Susceptibilidad a los antibacterianos.

Las pruebas de susceptibilidad ponen de manifiesto que *M. hackensackense* es susceptible a claritromicina e imipenem, intermedio a amikacina y cefoxitina, y resistente a otros antibióticos, como sulfametoxazol, doxiciclina, tobramicina y ciprofloxacina.

- ***Mycobacterium hodleri*.**

Estudiado por Kleespies et al. en 1996 (117).

Aislado de suelos contaminados con fluorantenos.

Por el estudio de su ADn ribosomal 16 S, se aprecia que es una nueva micobacteria así como pr sus propiedades.

Está relacionado con *M. diernhoferi* y *M. neoaurum*.

- ***Mycobacterium holsaticum*.**

Descrito por Richter et al. en 1996 (118).

Aislado de muestras clínicas.

Crece entre 22 y 40°C dando positivas las reacciones de reducción de los nitratos y del telurito, la fosfatasa, la ureasa, la nicotinamida y la pirazinaminidasa.

Es resistente a la isoniazida y a la rifampicina y sensible a la estreptomina y al etambutol.

- ***Mycobacterium houstonense***.

Descrito por Schisky et al. en 2004 (119). Estudiado en otros trabajos de este grupo de investigación (136), se vio que ocasionaba infecciones respiratorias y que taxonómicamente estaba relacionado con *Mycobacterium boenickei*, *Mycobacterium neworleaense*, *Mycobacterium brisbanense* y *Mycobacterium porcinum*.

Fue caracterizado mediante el estudio del fenotipo convencional, por las susceptibilidades frente a los antimicrobianos, el genotipo y por la quimiotaxonomía de los ácidos grasos de su constitución, estudiados por HPLC. Relacionado con *Mycobacterium brisbanense* y *Mycobacterium boenickei* (136).

- ***Mycobacterium neworleansense***.

Descrito por Schinsky et al. en 2004 (120).

De características parecidas a *M. boenickei*, *M. houstonense*, *M. brisbanense* y *M. porcinum*.

Se extrae de muestras biológicas y del complejo *M. fortuitum*, sorbitol positivo y negativo.

Ocasiona infecciones respiratorias, bacteriemia y enfermedades infecciosas diseminadas.

- ***Mycobacterium phlei***.

Lehman y Newman en 1899 (87), lo denominan así por su procedencia del género de la planta donde se aisló por primera vez.

Se encuentra en la naturaleza, fundamentalmente en plantas.

Características morfológicas y de cultivo:

Son bacilos cortos de 1-2 micras de longitud desarrollan colonias de textura rugosa amarillo-anaranjadas, cuando se cultivan a temperaturas de 22 a 52°C, en un tiempo aproximado de 3 a 5 días en medios que contienen huevo.

Se consideraron sinónimas de esta micobacteria, *Timothee bacillus*, Moeller 1898, *Grassabacillus*, Moeller 1898 (88) y *Mycobacterium moelleri*, Chester 1901 (89).

Sin embargo, los estudios de homología DNA/DNA realizados por Baess en 1982, la confirmaron como especie diferente de las descritas anteriormente. Se le atribuye la existencia en su estructura de MK-9 y de y MK-8 (H) según los trabajos de Collins, Piroux, Goodfellow y Minnikin (132).

- ***Mycobacterium phoceae*.**

Estudiado por Adekambi et al. en 2006 (121).

Su nombre hace referencia a Phoces, una ciudad marítima de Jonia, colonia ateniense cuyos habitantes escaparon de la dominación persa y fundaron Massilia, la actual Marsella en Francia.

Está relacionada con *M. aubagnense* y *M. bolleti*.

Se realizó su secuenciación de genes rpoB.

- ***Mycobacterium poriferae*.**

Mc Intosh y Moshier en 1979 (90), descubren la existencia de microorganismos no fotosintéticos que intervienen en la carotenogénesis de una esponja marina (*Halichondria bowerbanki*). El caroteno de esta esponja forma parte de la pigmentación de la mayoría de las especies pigmentadas del género *Mycobacterium* (91).

Esta coincidencia, indujo a Padgitt y Moshier en 1987 (92), al estudio de la flora bacteriana de esta esponja, aislando de ella una nueva especie de micobacteria de crecimiento rápido, a la que denominaron *Mycobacterium poriferae*.

Características morfológicas y de cultivo:

Estos microorganismos escotocromógenos, son bacilos cortos de 1.1 a 4.9 micras de longitud y 0.7 a 2.5 micras de grosor, generalmente de forma cocoide. Desarrollan colonias de textura lisa color anaranjado, cuando se cultivan a temperaturas de 28 a 30°C, en un tiempo aproximado de 4 días en medios que contienen huevo.

- ***Mycobacterium pyrenovorans*.**

Descrito por Derz et al. en 2004 (122).

Fue aislado de suelos contaminados.

Relacionado con *M. aurum*, *M. austroafricanum*, *M. vaccae* y *M. vanbaalenii*.

Su nombre deriva de su capacidad para usar el pireno como única fuente de energía carbonada.

- ***Mycobacterium psicrotolerans*.**

Descrita por Trujillo et al. en 2004 (123).

Fue aislada de una charca cercana a una mina de uranio, siendo tolerante al frío.

Es análoga a *M. sphagni*.

Su descripción como especie nueva, incluye análisis quimiotaxonómicos con especificación de ácidos grasos existentes en la pared de la misma así como de micólico, resistencia a antibióticos, tolerancia al cloruro sódico, fuentes de carbono etc.

- ***Mycobacterium rhodesiae***.

Tsukamura et al., describen esta micobacteria en 1971(93).

No se incluyó en la lista de nombres de micobacterias aceptadas oficialmente, presentada por Skerman et al., en 1980 (99), por lo que Tsukamura et al., solicitaron su inclusión (100).

Se aisló originalmente en Rhodesia, en pacientes con tuberculosis, aunque no se considera potencialmente patógena.

Características morfológicas y de cultivo:

Estos microorganismos, son bacilos cortos de dos micras de longitud. Desarrollan colonias de textura lisa y color amarillo brillante, cuando se cultivan a temperaturas de 25 a 37°C, en un tiempo aproximado de 5 días en medios que contienen huevo.

- ***Mycobacterium senegalense***.

Especie descrita por Chamoiseau, en 1973, como una subespecie de *Mycobacterium farcinogenes* (94). Más tarde este mismo autor la describe como una especie diferente (95).

Este microorganismo produce linfadenitis e infecciones cutáneas en el ganado bovino africano.

Características morfológicas y de cultivo:

Especie de formas filamentosas incurvadas que se unen formando grupos. Desarrollan colonias de texturas rugosas y circundadas por un halo iridiscente, cuando se cultivan a temperaturas de 25 a 37°C, en un tiempo aproximado de dos días en medios que contienen huevo.



- ***Mycobacterium smegmatis***.

Trevisan en 1889, la describe inicialmente como *Bacillus smegmatis* (96) y posteriormente Lehman y Newman en 1889, la denominan como se conoce actualmente (97).

Originalmente se aisló del esmegma y posteriormente también del agua y el suelo.

Características morfológicas y de cultivo:

Son bacilos de 3-5 micras de longitud, que pueden formar ramificaciones en Y.

Desarrollan colonias de textura rugosa y blanquecina, cuando se cultivan a temperaturas de 25 a 45°C, en un tiempo de 2-4 días en medio Lowenstein-Jensen.

Si se cultiva en medio Agar-Ac. Oleico-Albúmina, las colonias resultantes son menos rugosas (98).

- ***Mycobacterium thamnopheos***.

Micobacteria descrita por Runyon et al., como especie de crecimiento rápido (101).

Más tarde Lechevalier y col (102)., sugieren que esta micobacteria se considere incluida en el género *Nocardia*, tras estudiar su composición lipídica. De la misma manera se pronunció Daffé et al., en 1981 tras estudiar sus ácidos micólicos (103).

Actualmente no está reconocida como micobacteria (104).

Características morfológicas y de cultivo:

Desarrollan colonias rugosas no pigmentadas, cuando se cultivan a temperaturas de 28 a 37°C, en un tiempo aproximado de 7 días en medio Lowenstein-Jensen.

- ***Mycobacterium thermoresistibile***

Descrita por Sherman et al. en 1966 (124).

Así denominada dado el hecho de su capacidad para crecer a 52°C y para sobrevivir a temperaturas incluso superiores a esa.

Aislada en una mujer que presentaba bajo peso, cavitaciones, tos y fiebre.

Fue aislado de muestras pulmonares.

La paciente respondió bien a la combinación de etambutol, rifampicina y estreptomina.

- ***Mycobacterium togolense.***

Fue estudiada por James. Attipou, Blakime, Tignokpa y Abete (133) en lesiones ulcerativas con metástasis en un 9,4% de los casos en un hospital de Togo, con un 20,6% de los casos analizados en niños.

Relacionada con *Mycobacterium ulcerans*, agente causal de la úlcera de Buruli, estudiada esta relación entre otros por Nackers, Jhonson, Glyn, Zinsen, Tonglet y Portaels (134).

- ***Mycobacterium vanbaalenii.***

Estudiada por Khan et al, en 1997 (125).

Aislada de sedimentos de estuario contaminados con petróleo.

Relacionada con *M. aurum*, *M.vaccae* y *M.austroafricanum*.

- ***Mycobacterium wolinskyi.***

Descrita por Brown et al. en 1999 (126).

Relacionada con *M. goodii*, y *M. smegmatis*.

Se aísla de heridas postraumáticas y posquirúrgicas y en de casos de osteomielitis.

Es susceptible al sulfametoxazol, la amikacina, el imipenem y a las tetraciclinas. Es resistente a la claritromicina y moderadamente a la tobramicina.

- ***Nocardia farcinica.***

En 2006 Shin et als. (127) hacen una comunicación acerca de la infección que provoca este microorganismo en hígado.

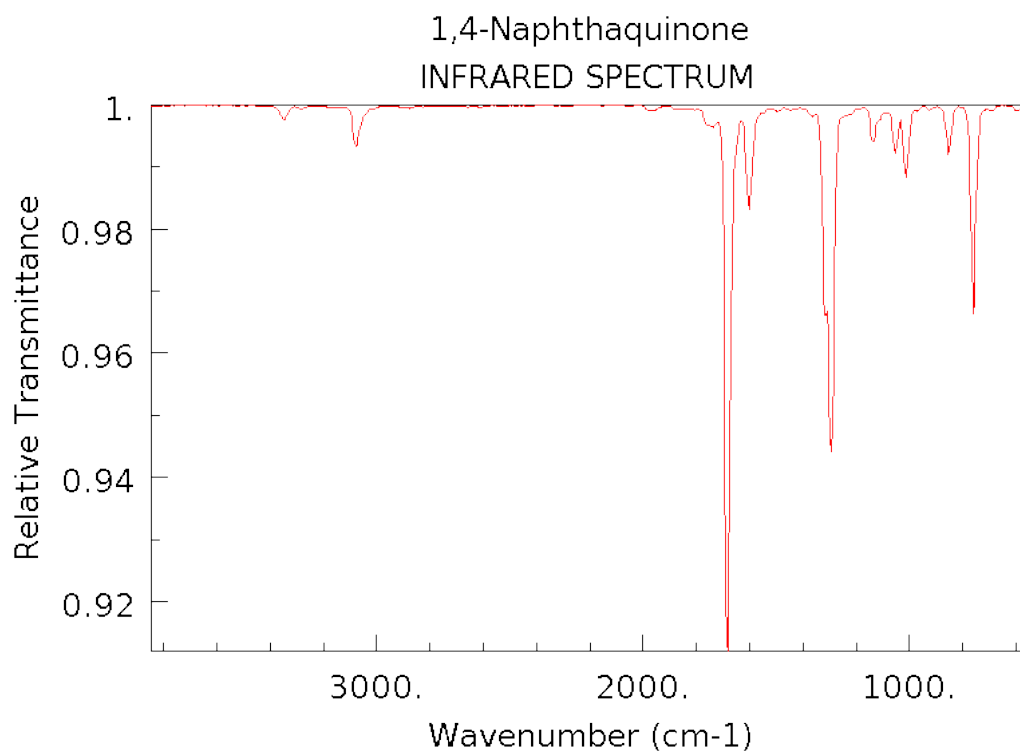
Dodds et als. en 2006 (128), estudian un absceso subretiniano producido por este microorganismo.

El estudio de quinonas en el género *Nocardia*, fue llevado a cabo por diferentes autores. *Nocardia amarae* fue estudiada por Goodfellow, Minnikin y Collins (4), que observaron la presencia en su estructura de MK-9 (H). *Nocardia asteroides* fue estudiada por Collins, Piroux, Goodfellow y Minnikin (3), apreciándose en su estructura la existencia de MK-8(H), aserto este ratificado por Yamada, Inouye, Tahara y Kondo (64) así como por Yamada, Ishikawa, Tahara y Kondo (65). *Nocardia brasiliensis* fue estudiada por Collis, Piroux, Goodfellow y Minnikin (3), asignándole la presencia en su estructura de MK-8 (H), extremo este confirmado por los autores citados en (64) y (65). *Nocardia farcinica* ATCC 3318, fue estudiada por Yamada, Ishikawa, Tahara y Kondo (65), que encontraron en su estructura MK-8 (H) y *Nocardia transvalensis* fue estudiada por los autores citados en (3), asignándole la presencia de MK-8 (H), estando en igual situación y estudiada por los mismos autores *Nocardia vaccinii*.

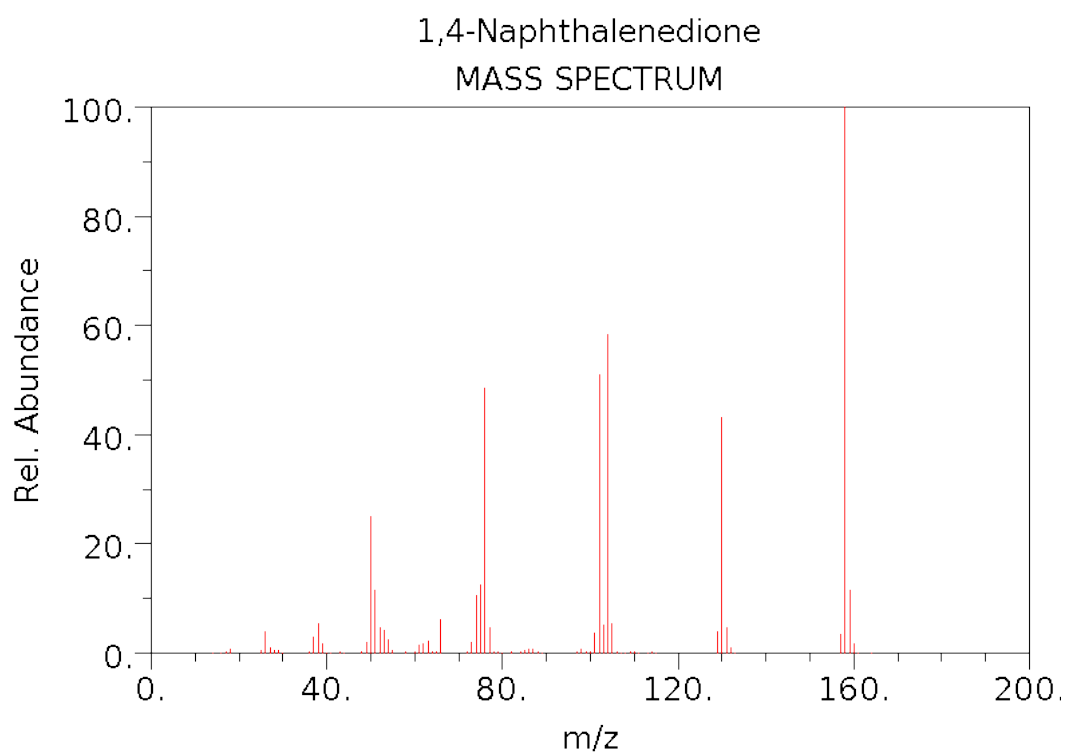
- ***Gordonia rubropertincta*.**

Flaherty y Sutcliffe en 1999 (129), identifican el lipoarabinomanano de este microorganismo. Por otro lado Brandao, Maldonado, Werd, Bull y Goodfellow (135), la aíslan de suelos de Namibia, utilizando para su cultivo sustratos nitrosos y la diferencian fenotípicamente de la *Gordonia namibiensis*.

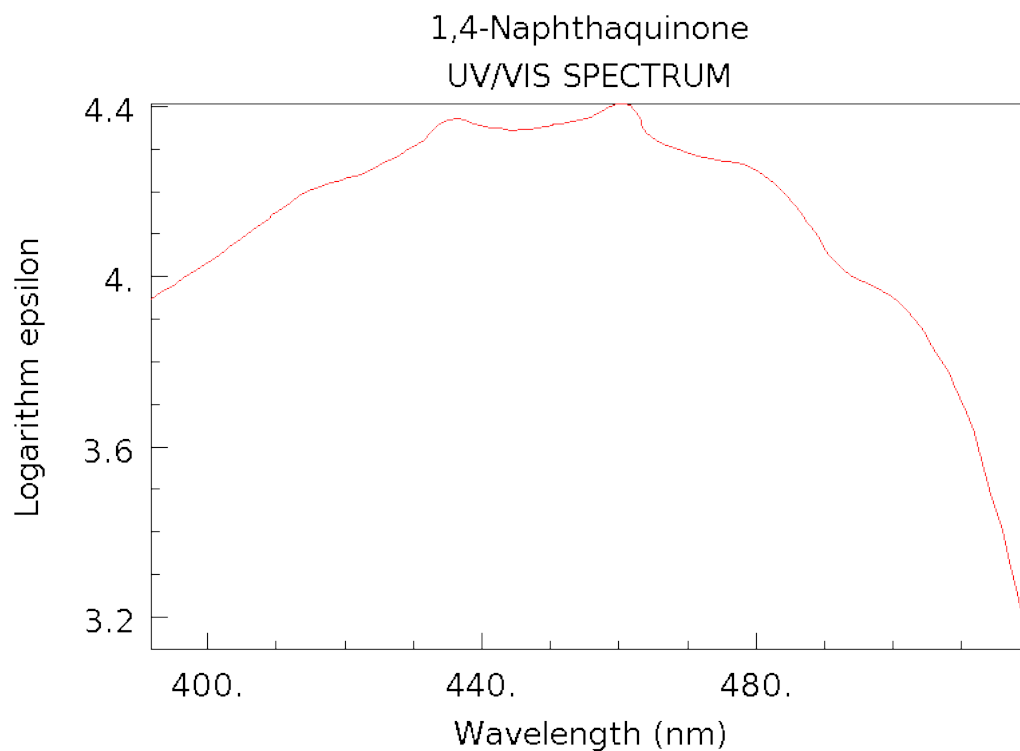
## 2.2.- Espectros de quinonas.



NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

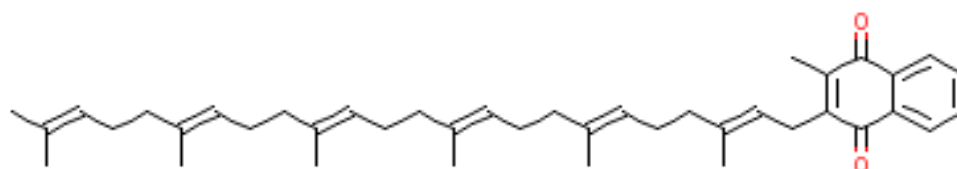


NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

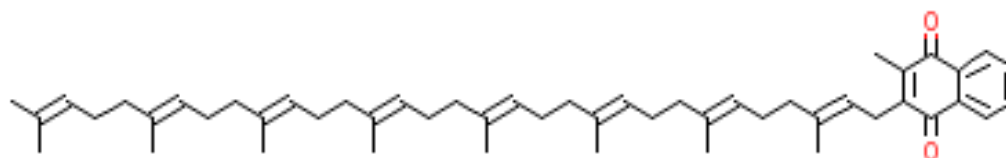


NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

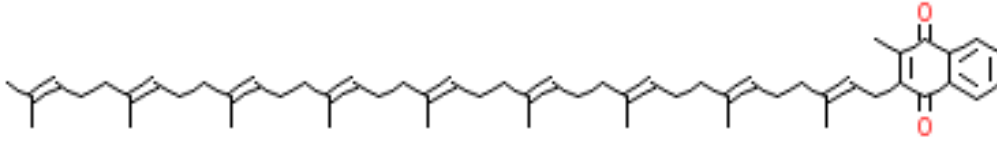
### 2.3.- Fórmulas de menaquinonas:



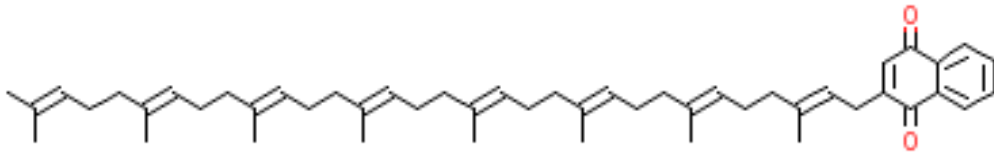
MK-6



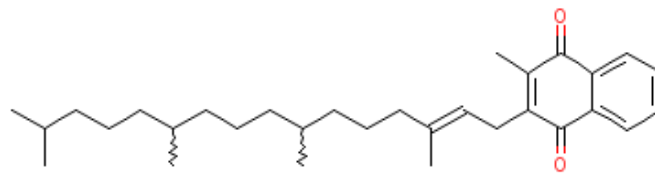
MK-8



MK-9



Demetilmenaquinona



Fitonadiona

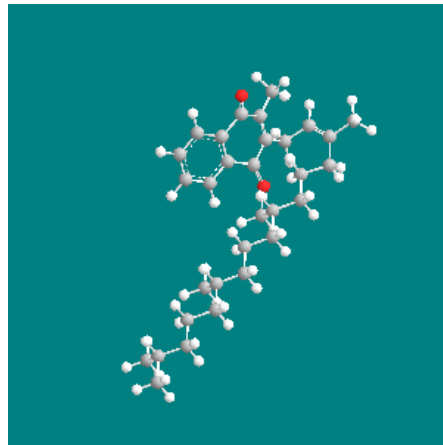


Fig. 31,  $\alpha$ -Filoquinona.

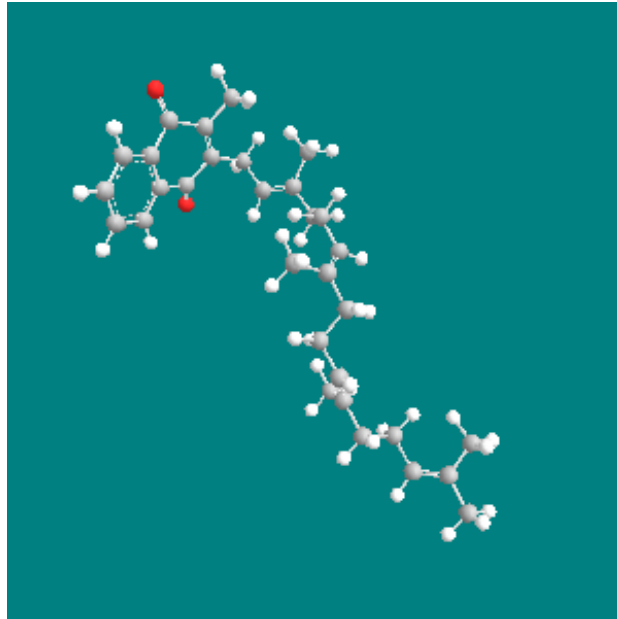


Fig. 32, Menatetrenona (2-Metil-3-tetraprenil-1,4-naftoquinona).

#### 2.4.- Cromatogramas:

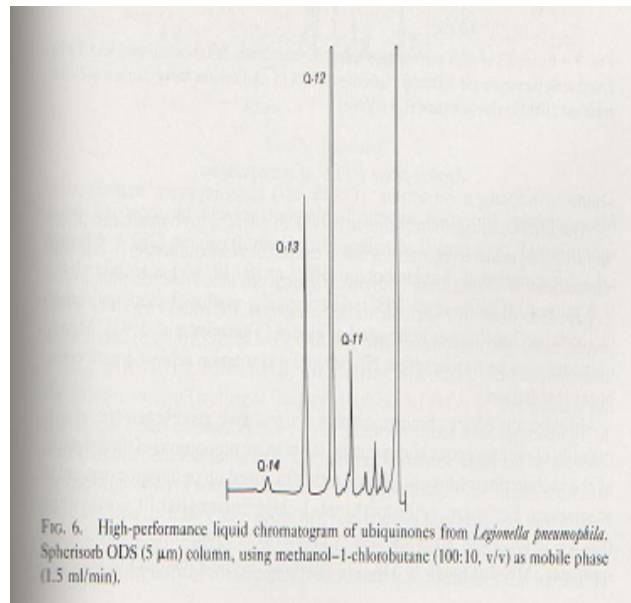


FIG. 6. High-performance liquid chromatogram of ubiquinones from *Legionella pneumophila*. Spherisorb ODS (5  $\mu$ m) column, using methanol-1-chlorobutane (100:10, v/v) as mobile phase (1.5 ml/min).

Fig. 33, HPLC de ubiquinonas de la *Legionella pneumopaila*. Metanol-1-clorobutano (100:10, v/v) como fase móvil.

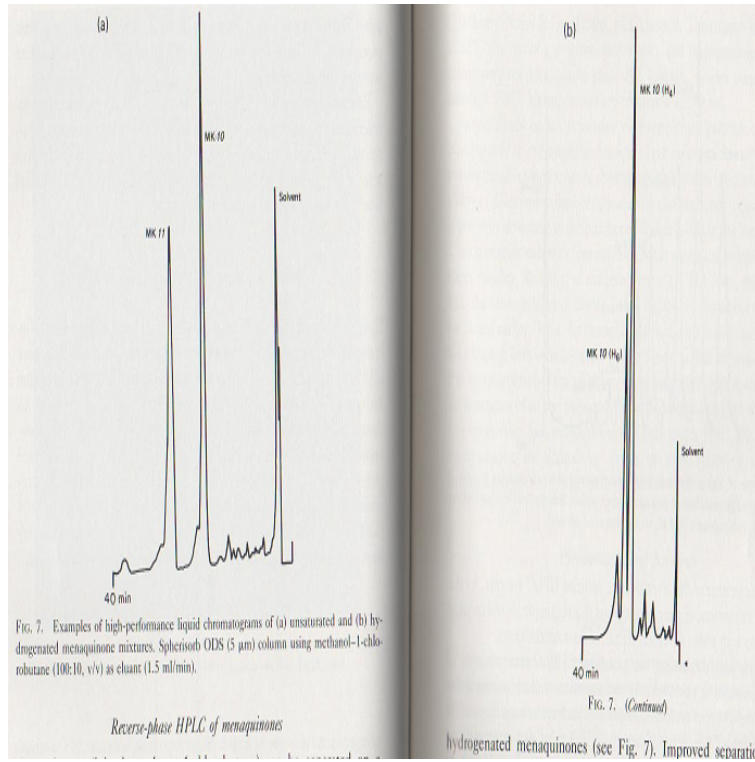


Fig. 34, Ejemplo de HPLC de mezclas de menaquinonas insaturadas. Metanol-1-clorabutano (100:10, v/v).

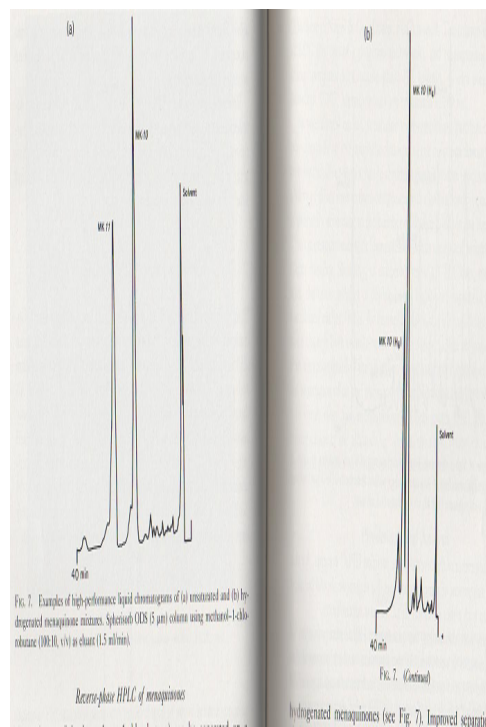


Fig. 35, Ejemplo de HPLC de mezclas de menaquinonas hidrogenadas. Metanol-1-clorabutano (100:10, v/v).



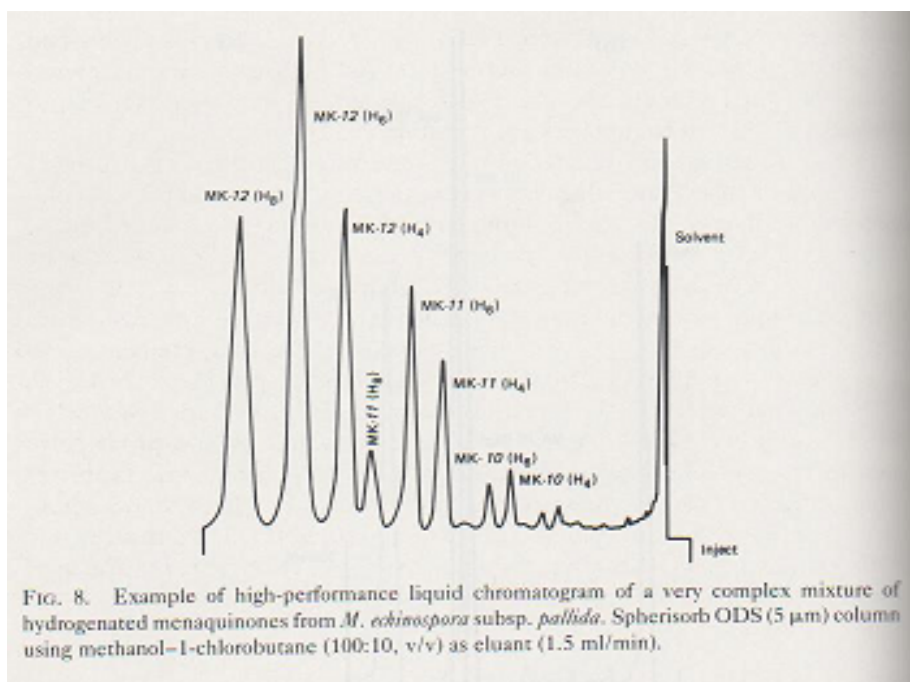


Fig. 36. Ejemplo de HPLC de mezclas de menaquinonas hidrogenadas de la *M. echinospora* subsp. *pallida*. Metanol-1-clorobutano (100:10, v/v).

### 3. ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO.

*Ultraviolet absorption characteristics of menaquinones, ubiquinones, and related compounds*

Quinone	Solvent	$\lambda_{max}$ (nm)*
Menaquinone	Isooctane	242, 248, 260, 269, 326, 238(inf)
Phylloquinone	Isooctane	242, 248, 260, 269, 326, 238(inf)
Demethylmenaquinone	Isooctane	242, 248, 254, 263, 326, 238(inf)
Chlorobimenaquinone	Ethanol	254, 265(inf)
Ubiquinone	Ethanol	275, 405
Rhodoquinone	{ Cyclohexane	251, 280, 320, 500(inf)
	{ Ethanol	253, 283, 320, 500(inf)
Plastoquinone	Isooctane	254, 262
Caldariellaquinone	{ Methanol <sup>†</sup>	241, 283, 333
	{ Isooctane <sup>‡</sup>	257, 272, 278, 322
Methionaquinone**	Ethanol	238, 262, 340

\*Each major peak is in boldface; inf. point of inflection.

<sup>†</sup>Data from DeRosa *et al.* (1977).

<sup>‡</sup>Data from Collins & Langworthy (1983).

\*\*2-methylthio-3-VI,VII-tetrahydroheptaprenyl-1,4-naphthoquinone (Ishii *et al.* 1983).

Tabla 4, Longitudes de onda de absorción de los grupos cromóforas en Quinonas Isoprenoides.

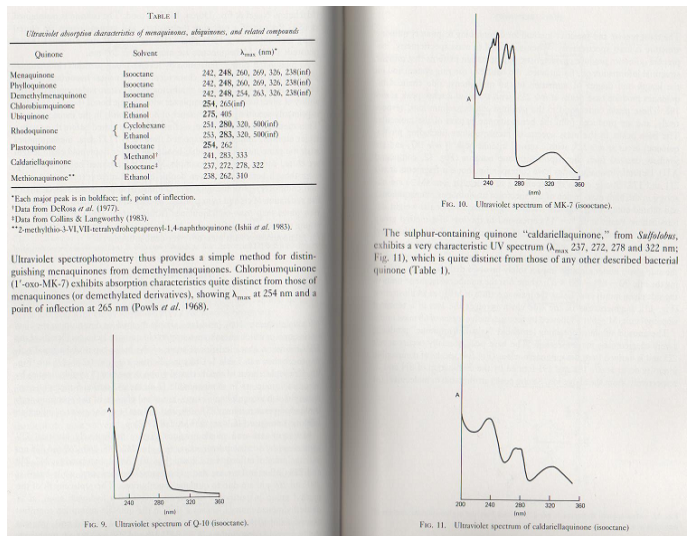


Fig. 36, Espectro ultravioleta de la Q-10 (isooctano).

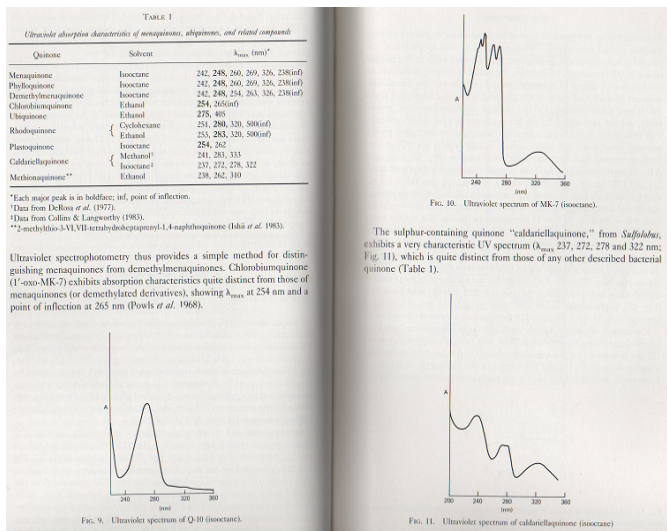


Fig. 37, Espectro UV de la quinona MK-7.

TABLE I  
Ultraviolet absorption characteristics of menaquinones, ubiquinones, and related compounds

Quinone	Solvent	$\lambda_{max}$ (nm)*
Menaquinone	Isooctane	242, 248, 260, 269, 326, 238(inf)
Phylloquinone	Isooctane	242, 248, 260, 269, 326, 238(inf)
Demethylmenaquinone	Isooctane	242, 248, 254, 263, 326, 238(inf)
Chlorobiumquinone	Ethanol	254, 265(inf)
Ubiquinone	Ethanol	278, 403
Riboflavin	{ Cyclohexane	251, 290, 320, 500(inf)
	{ Ethanol	251, 293, 320, 500(inf)
Flavopiquinone	Isooctane	264, 265
Calderiellaquinone	{ Methanol†	241, 283, 333
	{ Isooctane‡	237, 272, 278, 322
Methoxyquinone**	Ethanol	238, 262, 310

\*Each major peak is in boldface; inf. point of inflection.  
 †Data from DeRosa *et al.* (1977).  
 ‡Data from Collins & Langworthy (1983).  
 \*\*2-methylthio-3,6,7,8-tetrahydroheptaprenyl-1,4-naphthoquinone (Ishii *et al.* 1983).

Ultraviolet spectrophotometry thus provides a simple method for distinguishing menaquinones from demethylmenaquinones. Chlorobiumquinone (1'-oxo-MK-7) exhibits absorption characteristics quite distinct from those of menaquinones (or demethylated derivatives), showing  $\lambda_{max}$  at 254 nm and a point of inflection at 265 nm (Povils *et al.* 1968).

Fig. 9. Ultraviolet spectrum of Q-10 (isooctane).

Fig. 10. Ultraviolet spectrum of MK-7 (isooctane).

The sulphur-containing quinone "calderiellaquinone," from *Sulfolobus*, exhibits a very characteristic UV spectrum ( $\lambda_{max}$  237, 272, 278 and 322 nm; Fig. 11), which is quite distinct from those of any other described bacterial quinone (Table 1).

Fig. 11. Ultraviolet spectrum of calderiellaquinone (isooctane).

Fig. 38, Espectro UV de la quinona "calderiellaquinona" de la *Sulfolobus*.

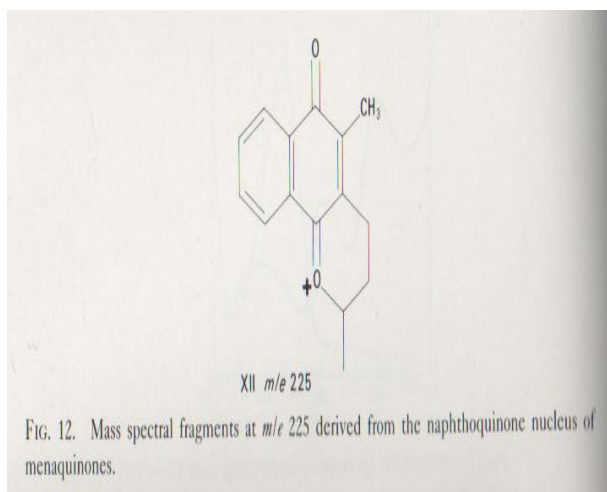


Fig. 39, Fragmento del espectro de masas a *m/e* 225 derivado del núcleo de naftoquinona de las menaquinonas.

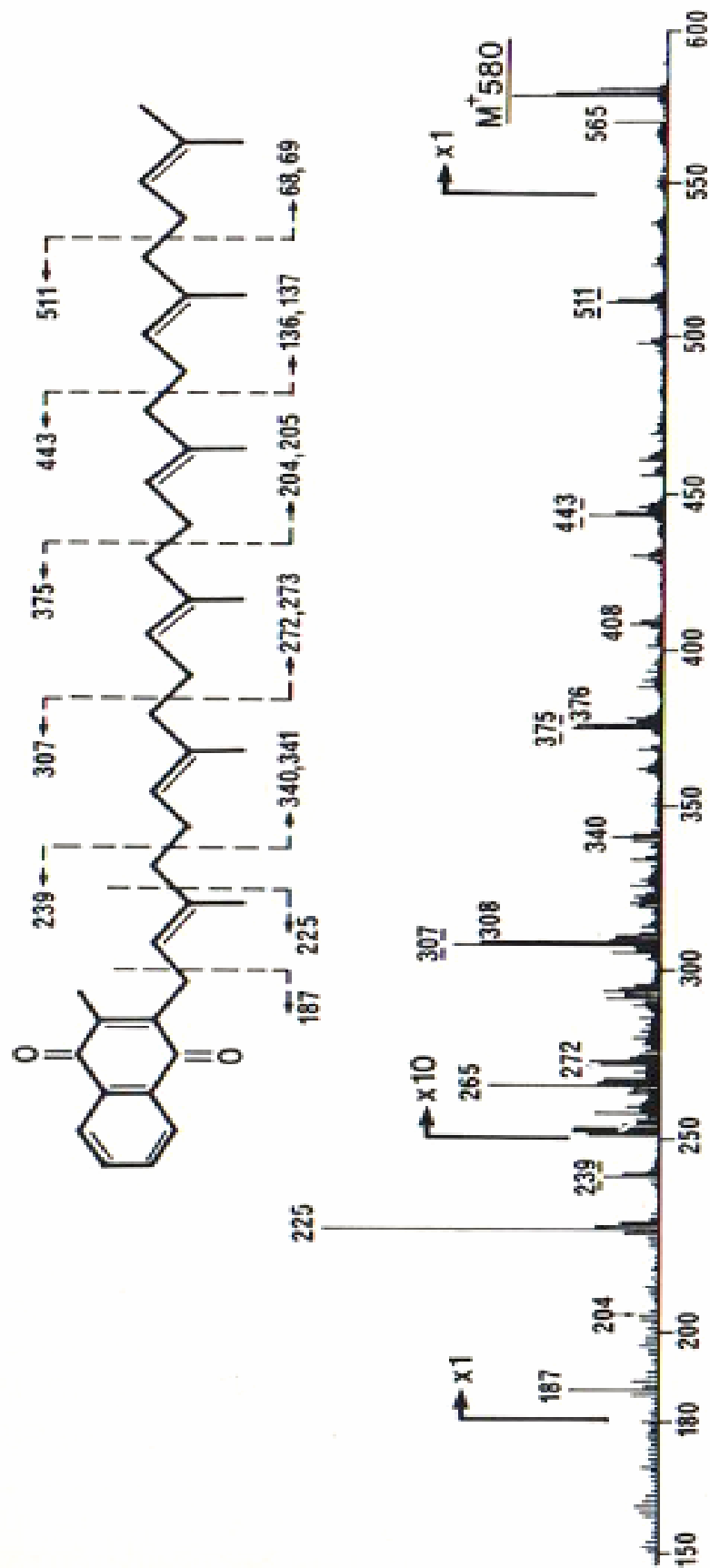


Fig. 40, Espectro de masas del MK-6 de la *Capmocytophaga ochracea*.

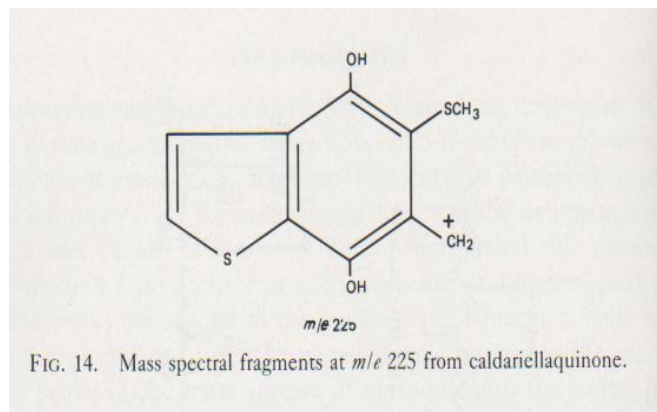


Fig. 41, Fragmento del espectro de masas a  $m/e$  225 derivado del núcleo de caldariellaquinona.


<p><i>Arthrobacter</i>  <i>albicus</i>  <i>citreus*</i>  <i>crystallopoietes</i>  <i>globiformis</i>  <i>oxydans*</i>  <i>ureafaciens*</i>  <i>variabilis</i></p> <p><i>Brevibacterium</i>  <i>ammonifigens</i>  <i>divaricatum</i>  <i>flavum</i>  <i>helvolum*</i>  <i>immarophilum</i>  <i>lactofermentum</i>  <i>roseum</i>  <i>saccharolyticum</i></p> <p><i>Corynebacterium</i>  <i>aerotaacidophilum</i>  <i>bovis</i>  <i>callunae</i>  <i>herculiae</i>  <i>glutamicum</i>  <i>lilium</i>  <i>melassecola</i>  <i>xerosis*</i></p> <p><i>Microbacterium ammoniophilum</i></p> <p><i>Mycobacterium</i> spp.**</p> <p><i>Rhodococcus</i>  <i>branchialis<sup>1</sup></i>  <i>corallinus<sup>1</sup></i></p>		<p>MK-9(H<sub>2</sub>)<sup>2</sup></p>
--	--	--

Tabla 5, Especies bacterianas con la presencia de otras menaquinonas como principales constituyentes.

<i>Arthrobacter roseoparaffinus</i>	}	MK-8(H <sub>2</sub> ) <sup>3</sup>
<i>Brevibacterium</i>		
<i>linens</i>		
<i>paraffinolyticum</i>		
<i>stationis</i>		
<i>sterolicum</i>		
<i>Corynebacterium</i>		
<i>diphtheriae</i> **		
<i>equi</i> **		
<i>fascians</i> **		
<i>flavicum</i>		
<i>hoagii</i>		
<i>hydrocarbonolactus</i>		
<i>minutissimum</i>		
<i>marium</i>		
<i>mycetoides</i>		
<i>pseudodiphtheriticum</i>		
<i>pseudotuberculosis</i>		
<i>renale</i>		
<i>rubrum</i>		
<i>ulcerans</i>		
<i>xerosis</i>		
<i>Microbacterium flavum</i> **		
<i>Rhodococcus</i>		
<i>erythropolus</i> <sup>1</sup>		
<i>rhodocrous</i> <sup>1</sup>		
<i>ruber</i> <sup>1</sup>		
<i>Arthrobacter simplex</i> **	}	MK-9(H <sub>4</sub> ) <sup>4</sup>
<i>Brevibacterium lipolyticum</i>		
<i>Hacardia</i> spp.**		
<i>Cellulomonas</i>	}	MK-9(H <sub>4</sub> ) <sup>5</sup>
<i>biacota</i> *		
<i>fimi</i> *		
<i>flavigena</i>		
<i>Oerskovia</i>		
<i>turbata</i> **		
<i>xanthineolytica</i>		
<i>Brevibacterium testaceum</i> *		MK-17
<i>Corynebacterium aquaticum</i> **		MK-10, 11 <sup>6</sup>

Tabla 6, (continuación).

<i>Brevibacterium sulfureum</i> **	}	MK-9 <sup>7</sup>
<i>Corynebacterium flaccumfaciens</i>		
<i>Corynebacterium poinsettiae</i>		
<i>Curtobacterium citreum</i> **		
<i>Curtobacterium luteum</i> **		
<i>Arthrobacter nicoletiae</i> *	}	MK-8,9
<i>Brevibacterium fuscum</i> *		
<i>Kurtzia zopfii</i>		MK-7 <sup>8</sup>
<i>Corynebacterium autotrophicum</i>	}	Q-10, 10 (H <sub>2</sub> ) <sup>9</sup>
<i>Mycobacterium flavum</i>		
<i>Mycoplasma rubra</i>		

Tabla 7, (continuación)

% G + C <sup>1</sup>	Mycolic acids (no. of carbons)	Isoprenoid quinone	Taxon	Fatty acids	DPG	Polar lipids				
						PG	PE	PI	PIM	GLY
48 - 59	22 - 32	MK-8(H <sub>2</sub> )	<i>Corynebacterium bovis</i>			+	+	-	+	+
			<i>Brevibacterium ammoniagenes</i>	S, U, I, A	+	+	T	+	+	
	26 - 38	?	<i>C. lilium</i>			+	+	T	+	+
			<i>M. ammoniophilum</i>	S, U	+	-	+	+		
			<i>Bacterionema matruchotii</i>	S, U	+	+	-	+	+	+
	MK-8(H <sub>2</sub> ) <sup>3</sup>	<i>C. diphtheriae</i>	S, U, I?, A?	+	T	+	+			
		<i>C. pseudotuberculosis (ovis)</i>	S, I?, A?	?	-	-	+	+		
<i>C. asrosia</i>		S, U	+	+	+	+	+	+		
63 - 70	30 - 48	MK-8(H <sub>2</sub> ) <sup>4</sup>	<i>C. equi</i>	S, I?, A	+	+	+	+	+	
	38 - 52	MK-8(H <sub>2</sub> ) <sup>5</sup>	<i>C. fascians</i>	S, U, I, A	+	+	+	+	+	

Tabla 8, Distribución de caracteres quimiotaxonómicos de los ácidos micólicos y menaquinonas que contienen las bacterias coryneformes. (T = traza).



Diagnostic <sup>9</sup> wall sugars	Fatty acids	Polar lipids <sup>11</sup>					GLY	Isoprenoid <sup>11</sup> quinones
		DPG	PG	PE	PI	PIM		
ga,gl,ri <sup>10</sup>	S,U,I,A	+	+	-	+	+		MK-8(H <sub>2</sub> )
	S,I,A	+	+	-	-	-	+ <sup>13</sup>	
ga,ma,rh <sup>7</sup>	S,U,I,A	-	+	-	+	+	+ <sup>14</sup>	MK-3(H <sub>4</sub> )
ga,ma,rh	S,U,I,A					+	+ <sup>14</sup>	
- <sup>10</sup>	S,I-A	+	+	+	-	-	+? <sup>15</sup>	
ga,gl,ma <sup>7</sup>	S,I,A						+ <sup>16</sup>	MK-3(H <sub>4</sub> )
ga,gl,ma <sup>7</sup>	S,I,A							
ga,gl,ma <sup>7</sup>	S,I,A							
ga,gl,ma <sup>10</sup>	S,U,I,A <sup>12</sup>	+	+	-	-	+?		MK-3(H <sub>4</sub> )
ga,gl,ma <sup>10</sup>	S,U,I,A	+	+	-	-	+		
		+	+	-	-	-		MK-3(H <sub>4</sub> )
ga,gl,ma <sup>7</sup>	S,I,A							
gl,ma <sup>7</sup>	S,I,A							
ga,gl,ma <sup>7</sup>	S,I							
ga,gl,ma <sup>7</sup>	S,I,A							

<sup>9</sup> Abbreviations: ga = galactose, gl = glucose, ma = mannose, rh = rhamnose, ri = ribose.

<sup>10</sup> Data from Keddie and Cure [9].

<sup>11</sup> See Tables 2, 8, 10 and 11 (pages 92-95, 108-111, 115-117 and 120 respectively) for source of data and abbreviations.

<sup>12</sup> *Arthrobaacter simplex* also contains 10-methyloctadecanoic (tuberculostearic) acid.

<sup>13</sup> Galactosylglucosyl diacylglycerol.

<sup>14</sup> Diacylated inositolmannoside.

<sup>15</sup> Dimannosyl diacylglycerol.

<sup>16</sup> Data from Sneath and Jones [120].

<sup>17</sup> Data from Yamada and Komagata [15].

Tabla 9, (continuación).

Diagnostic wall sugars and amino- acids <sup>18</sup>	Fatty acids <sup>19</sup>	Polar lipids <sup>14</sup>					GLY	Isopren- oid <sup>15</sup> quinones
		DPG	PG	PE	PI	PIM		
ga, gl <sup>20</sup>	S, <u>U</u> , <u>I</u> , <u>A</u>	+	+	-	+	-?	+25	MK- $\beta$ (H <sub>2</sub> )
	S, <u>U</u> , <u>I</u> , <u>A</u>	+	+	-	+	-	+25	
ga, gl <sup>20</sup>	S, <u>U</u> , <u>I</u> , <u>A</u>	+	+	-	+?	+?	+25	MK- $\beta$ (H <sub>2</sub> )
ga, ma, rh <sup>20</sup>	S, <u>U</u> , <u>I</u> , <u>A</u>							
ga <sup>20</sup>	S, <u>U</u> , <u>I</u> , <u>A</u>	+	+	-	+	+		MK- $\beta$ (H <sub>2</sub> )
ga <sup>20</sup>	S, <u>U</u> , <u>I</u> , <u>A</u>							
ga <sup>20</sup>	S, <u>U</u> , <u>I</u> , <u>A</u>	+	+	-	-	+		MK- $\beta$ (H <sub>2</sub> )
ga <sup>20</sup>	S, <u>U</u> , <u>I</u> , <u>A</u>							MK- $\beta$ (H <sub>2</sub> )
		+	+	-	T	+		MK- $\beta$ (H <sub>2</sub> )
ga, gl, ma, gly <sup>20</sup>	S, <u>U</u> , <u>I</u> , <u>A</u>							
	S, <u>U</u> , <u>I</u> , <u>A</u>							MK-?
ga, gl, ma <sup>20</sup>	S, <u>U</u> , <u>I</u> , <u>A</u>	+	+	-	+	+	T	MK- $\beta$ (10)
ga, gl <sup>20</sup>	S, <u>U</u> , <u>I</u> , <u>A</u>							MK- $\delta$ , $\beta$
								MK- $\delta$ , $\beta$
ga, rh, gly <sup>20</sup>		+	+	-	-	-	+26	
gly, ser <sup>21</sup>	S, <u>U</u> , <u>I</u> , <u>A</u>							
gl, rh <sup>22</sup>	S, <u>I</u> , <u>A</u>							
ga, asp, gly <sup>23</sup>	S, <u>I</u> - <u>A</u>	+	+	-	+	+		MK- $\beta$ (H <sub>4</sub> )
ga, asp, gly <sup>23</sup>		+	+	-	+	+		MK- $\beta$ (H <sub>4</sub> )
ga <sup>24</sup>	<u>S</u> , <u>U</u> , <u>I</u> , <u>A</u>						+26	
	S, <u>I</u> - <u>A</u>	+	+	-	+		+	

Tabla 10, Distribución química de los distintos componentes de la pared de las bacterias coryneformes.

	Fatty acids <sup>1</sup>	DPG	Polar lipids <sup>1</sup>				GLY	Isoprenoid quinone <sup>1</sup>	Pigment <sup>2</sup>
			PG	PE	PI	PIM			
<i>Arthrobacter marinus</i>	S, U, C	+	+	+	-	-	-		
<i>Corynebacterium alkanolyticum</i>	S, U	+	+	+	+				
<i>Corynebacterium autotrophicum</i>							Q-10, 10(H <sub>2</sub> )	+	
<i>Corynebacterium creatinovorans</i>							MK-9(H <sub>2</sub> )		
<i>Mycobacterium flavum</i>							Q-10, 10(H <sub>2</sub> )		
<i>Mycoplama rubra</i>							Q-10, 10(H <sub>2</sub> )		
<i>Arthrobacter glacialis</i>								+	
<i>Arthrobacter</i> sp. M3								+	
<i>Arthrobacter</i> sp. ARL4								+	
<i>Corynebacterium erythrogenes</i>								+	
<i>Corynebacterium</i> sp. NCMB 8								+	

Tabla 11

### 3.1.- Análisis de menaquinonas en Micobacterias.-

La distribución y presencia de quinonas isoprenoides en Micobacterias, se recoge en las tablas expuestas, con expresión del componente principal y del minoritario.

Como se puede apreciar, el número de especies estudiado, es bastante limitado, contando el elevado número de Micobacterias conocidas hasta el momento.

### 3.2.- Interés clínico de las menaquinonas en Micobacterias.-

El Fticol o 2-o-oxi-3-metilnaftoquinona-1,4, ha sido aislado del *Mycobacterium tuberculosis*, pero hay razones para suponer que pudo haberse formado en el curso del proceso de aislamiento por degradación de algún factor del tipo de la vitamina K y como consecuencia de la saponificación que se realiza previamente con hidróxido de potasio alcohólico, según exponen Louis Fieser y Mary Fieser (138), que reconocen su síntesis en 1933 por el químico español J. Medinaeita y aislado ese mismo año por el americano Anderson en el bacilo tuberculoso.

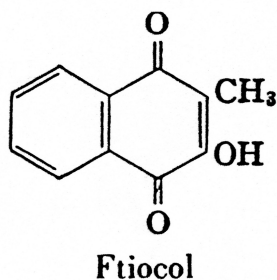


Fig. 41, Fticol

La existencia de un factor antihemorrágico en las plantas verdes fue descubierto en 1929 por Dam (139) en Copenhague, siendo lo descubierto por él un aceite amarillo insoluble en agua que se caracteriza por su espectro de absorción en el UV, muy específico, así como por la aparición de un color púrpura pasajero al tratarlo con álcalis alcohólicos, incluso a diluciones muy elevadas. Independientemente, Doisy (140), aisló el principio de la alfalfa y además un segundo compuesto con actividad antihemorrágica proveniente de la harina de pescado en putrefacción, la vitamina K<sub>2</sub> (p.f 54°C). Estas sustancias de carácter lipóide resultaron sumamente sensibles a la luz, álcalis y a un calor elevado, y los aislamientos iniciales se realizaron extrayendo con éter de petróleo y fraccionando extractos por cromatografía. Todos los procesos de aislamiento se apoyaron en un método de valoración biológica basado a su vez en que la sangre de pollos deficientes en vitamina K, presentaban un tiempo de coagulación prolongado (más de una hora), que disminuye hasta el tiempo normal (4-6 minutos) administrando la sustancia activa. Doisy caracterizó las dos vitaminas K como sustancias con 31 y 41 átomos de carbono respectivamente, teniendo ambas dos átomos de oxígeno, espectros de absorción muy semejantes y propiedades típicas de quinonas como la capacidad de ser reducibles reversiblemente generando dihidroderivados incoloros.

La vitamina K tiene dos variantes naturales. La K1, proveniente de vegetales de hoja verde oscura, el hígado y los aceites vegetales, también en alfalfa, tomates, cereales integrales y el hígado de cerdo. La K2 es producida por las bacterias intestinales.

La K3 es una variante sintética de las anteriores, pero que duplica el poder de las mismas. Se suministra a personas que no metabolizan adecuadamente las vitaminas K naturales.

Disminuyendo el nivel de vitamina K en el organismo, se reduce el de las sustancias coagulantes y por tanto los tiempos para coagulación son más prolongados. De esta forma, su carencia se detecta cuando aparecen hemorragias en los distintos tejidos y órganos.

La vitamina K1 es la 2-metil-3-fetil-1,4-naftoquinona, también formulada como 2-metil-3-(3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecenil)1,4naftalenodiona; 3-fitilmenadiona; fitomenadiona; fitonadiona; filoquinona o vitamina antihemorrágica. Nombres comerciales son Konakion®, Mephyton® y Monokay®. Su peso molecular es de 450,68. Es liposoluble y el isómero trans es el natural, siendo aislada por primera vez de la alfalfa, estando ampliamente distribuida en plantas verdes. En su síntesis en el laboratorio, se generan la forma cis y trans, predominando esta última, teniendo los preparados comerciales hasta un 20% de isómero cis. Es un aceite viscoso con índice de refracción  $n=1.5263$  y máximos de absorción en UV a 396, 419, 383, 387. Es insoluble en agua y soluble en disolventes orgánicos. Es la vitamina protrombigénica y antídoto en envenenamientos por dicumarol.

La vitamina K2 o menaquinona; 2-metil-3-todo trans-poliprenil-1,4-naftoquinona. La longitud de la cadena poliprenílica va desde 5 carbonos isoprenílicos ( $n=1$ ) hasta 65

átomos de carbono (n=13), siendo aisladas de bacterias. También se le denomina 2-metil-3-farnesilgeranilnaftoquinona-1,4, siendo la cadena lateral un grupo isoprenoide en C35 que contiene siete dobles enlaces, teniendo por lo general 15 carbonos más que la vitamina K1, siendo ligeramente menos activa que esta. Una alteración tan insignificante como añadir dos átomos de hidrógeno, pasando el peso molecular de 451 a 453, produce una pérdida de su actividad de 4 a 8 veces. Otro cambio tan simple como la sustitución del metilo en 2 por un etilo, prácticamente inactiva la molécula. Todo ello demuestra el elevado grado de especificidad estructural. La actividad de la K3 es tres veces superior a la de la K1. Se ha formulado la hipótesis, que hasta ahora no ha sido desmentida ni confirmada de que la metilnaftoquinona suministra uno de los componentes necesarios para la biosíntesis intraorgánica de un compuesto activo del tipo de la verdadera vitamina.

Con relación a la vitamina K2, no se sabe que exista en las plantas, y es sustancia aislada de la harina de pescado en putrefacción. Se forma por acción de los microorganismos. Mediante valoraciones biológicas se ha demostrado que las heces contienen una considerable cantidad de productos con actividad de vitamina K, los cuales se originan con toda probabilidad en virtud de una síntesis microbiológica en el intestino.

El nivel de protrombina es bajo en los seres vivos deficientes en vitamina K. La terapéutica con esta vitamina se hace necesaria para tratar las enfermedades hemorrágicas del recién nacido.

Las más ampliamente estudiadas han sido la MK-7, MK-8 y MK-9, constituyendo el 85-90% del total.

La MK-7 es la 2-(3,7,11,15,19,23,27-heptametil-2,6,10,14,18,22,26-octacosaeptaenil)-3-metil-1,4-naftoquinona; 2-metil-3-todo trans-farnesilgeranilgeranil-1,4-naftoquinona; menaquinona 7. Fue descrita por Mc Kee et al. (141), aislada de pescado en precarias condiciones de conservación. Su punto de fusión es de 54°C. Presenta máximos de absorción a 278, 195, 266, 267 en éter de petróleo y en alcohol 243, 248 y 261 nm.

La vitamina k 5 es la 4-amino-2-metil-1-naftalenol, 4-amino-2-metil-1-naftalenol; 4-amino-2-metil-1-naftol; 1-hidroxi-2-metil-4-aminonaftaleno; 2-meil-4-amino-1-hidroxi-naftaleno; 2-metil-4-amino-1-naftol; 3-metil-4-hidroxi-1-naftilamina. Su peso molecular es de 173,21.

La vitamina K6 es la 2-metil-1,4-naftalendiamina; 1,4-diamino-2-metilnaftaleno; 2-metil-1,4-diaminonaftaleno. Posee un peso molecular de 172,22.

Finalmente la vitamina K7 es la 4-amino-3-metil-1-naftalenol; 4-amino-3-metil-1-naftol; 1-hidroxi-3-metil-4-aminonaftaleno; 3-metil-4-amino-1-hidroxi-naftaleno; 3-metil-4-amino-1-naftol; 2-metil-4-hidroxi-1-naftilamina; 1-amino-2-metil-4-naftol. Pos

En la tabla 12 se especifican las micobacterias más recientemente descubiertas con expresión de su contenido en menaquinonas, de acuerdo con la bibliografía consultada.

Las naftoquinonas de plantas se encuentran en las mismas en forma heterosídica, liberándose la genina durante el proceso de desecación. La plumbagina procedente de la Drossera es utilizada para el tratamiento de la tos y la juglona (5-hidroxi-1,4-naftoquinona) procedente de las hojas y frutos del nogal, es bactericida y fungicida (142), como ocurre con la lawsona (2-hidroxi-1,4-naftoquinona) presente en las hojas de alheña o henna.





#### 4. MATERIAL Y MÉTODOS.

##### 4.1.- Cepas.-

Hemos utilizado 41 cepas de referencia (Type strain), procedentes de varias colecciones de cultivos. De ellas, 39 pertenecen a especies de crecimiento rápido que engloban al conjunto total de las especies reconocidas en la actualidad dentro del género *Mycobacterium*, y complementariamente *Nocardia farcinica* y *Gordonia rubropertinta* al objeto de contrastar las diferencias entre géneros.

Estas cepas de colección utilizadas en el estudio son las siguientes:

1.- <i>Mycobacterium aichiense</i>	NCTC 10820T
2.- <i>M. aurum</i>	NCTC 10437T
3.- <i>M. austroafricanum</i>	CCM 323/88T
4.- <i>M. chubuense</i>	CCM 255/80T
5.- <i>M. duvalii</i>	CCM 311/87T
6.- <i>M. flavescens</i>	CCTM 24209T
7.- <i>M. gallinarum</i>	ATCC 19710T
8.- <i>M. gilvum</i>	NCTC 10742T
9.- <i>M. komossense</i>	CCM 274/80T
10.- <i>M. phlei</i>	NCTC 8151T
11.- <i>M. poriferae</i>	CCM 325/88T
12.- <i>M. rhodesiae</i>	DSM 44223T
13.- <i>M. senegalense</i>	CCM 319/87T
14.- <i>M. smegmatis</i>	NCTC 8159T
15.- <i>M. thamnopheos</i>	ATCC 4445
16.- <i>M. thermoresistibile</i>	CCTM 1908T
17.- <i>M. hodleri</i>	DSM 44183T
18.- <i>M. elephantis</i>	DSM 44368T
19.- <i>M. chlorophenicum</i>	CECT 4065
20.- <i>M. bolletii</i>	CCUG 50184
21.- <i>M. neworleansense</i>	CIP 105354
22.- <i>M. houstonense</i>	CIP 105353
23.- <i>M. canariasense</i>	CIP 107998
24.- <i>M. brisbanense</i>	DSM 44680
25.- <i>M. holsaticum</i>	DSM 44478
26.- <i>M. boenickei</i>	DSM 44677
27.- <i>M. hackensackense</i>	DSM 44833
28.- <i>M. frederiksbergense</i>	DSM 44346
29.- <i>M. fortuitum subsp. acetamidolitycum</i>	DSM 44220
30.- <i>M. cosmeticum</i>	CIP 108170
31.- <i>M. fluoranthenvivorans</i>	CIP 108203
32.- <i>M. vanbaalenii</i>	DSM 7251T

33.- <i>M. pyrenivoran</i>	DSM 44605T
34.- <i>M. aubagnense</i>	CCUG 50186
35.- <i>M. togolense</i>	CCUG 48898
36.- <i>M. phoceae</i>	CCUG 50185
37.- <i>M. conceptionense</i>	CCUG 50187
38.- <i>M. psychrotolerans</i>	DSM 44697T
39.- <i>Gordonia bronchialis</i>	CIP 100847T
40.- <i>Gordonia rubropertincta</i>	CIP 100848T
41.- <i>Nocardia farcinica</i>	CECT 3053

ATCC: Colección Americana de Cultivos Tipo (U.S.A.).  
 CCM: Colección de Cultivos Microbianos (República Checa).  
 CCUG: Colección de Cultivos Universidad de Goteborg (Suecia).  
 CECT: Colección Española de Cultivos Tipo.  
 CIP: Colección Instituto Pasteur (Francia).  
 DSM: Colección Alemana de Microorganismos.  
 NCTC: Colección Nacional de Cultivos Tipo (Reino Unido).

#### 4.2.- Medios de cultivo.-

Para la extracción de los componentes quinónicos, todas las cepas de referencia congeladas en medio Brain Heart Infusión con glicerol al 15%, se recuperaron en medio de Middlebrook 7H9 Broth de la siguiente composición:

Sulfato amónico	0,5 g.
Ácido L-glutámico	0,5 g.
Citrato sódico	0,1 g.
Piridoxina	0,01 g.
Biotina	0,0005 g.
Fosfato disódico	2,5 g.
Fosfato monopotásico	1,0 g.
Citrato amónico férrico	0.04 g.
Sulfato magnésico	0,05 g.
Cloruro cálcico	0,0005 g.
Sulfato de zinc	0,001 g.
Sulfato de cobre	0,001 g.

Este medio se suplementó añadiéndole 100 ml. de la solución:

Glicerol	0,5 g.
Glucosa	0,5 g.
Tween 80	0,005 g.
Agua destilada	100 ml.

Finalmente se ajustó el pH del medio a 6,6.

Todas las cepas una vez recuperadas se cultivaron sobre medio de Lowenstein Jensen (Difco) de la siguiente composición:

Fosfato monopotásico	0,15 g.
----------------------	---------

Sulfato de magnesio	0,015 g.
Citrato magnésico	0,0375 g.
Asparragina	0,225 g.
Glicerol	0,75 ml.
Fécula de patata	2,0 g.
Verde malaquita	1,25 ml.
Agua destilada	37,5 ml.
Huevo	60 ml.

Las cepas se incubaron a 35°C y el tiempo medio de crecimiento de los cultivos osciló entre 5 y 7 días.

○ Instrumentación:

- Estufa de cultivo Memmert
- Centrífuga Sorvall (Du Pont)
- Agitador de tubos Atomixer (Atom)
- Baño calefactor K 20 Kp Lauda

Los reactivos fueron todos de grado analítico de la casa Merck

Los patrones cromatográficos fueron de la casa Sigma: K1 V3501-G, K2 9378-1G así como la K 3 (menadiona) M5750-1KG.

El Fticol (2-hidroxi- 3-metil-1,4—naftoquinona) cuyo CAS es 483-55-6, es producto Sigma-Aldrich rfvia S970840.

Tubos empleados de 14x120 mm. provistos de tapón de rosca y sello de Teflón.

#### 4.3.- Preparación de las muestras (Metodo de Extracción).-

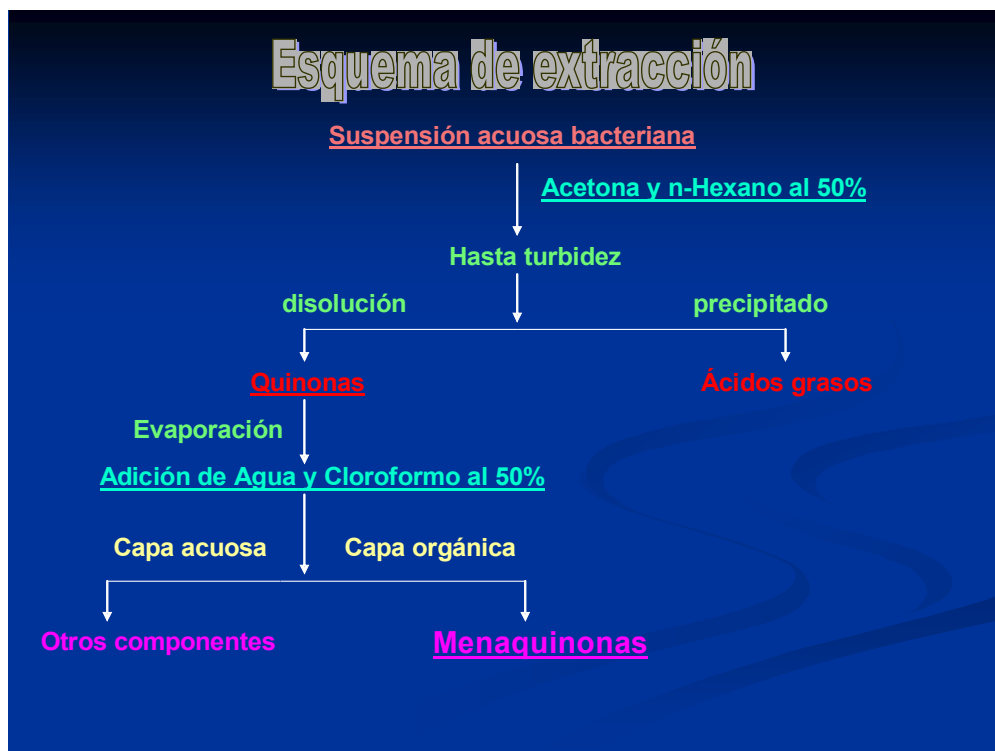
Una vez cultivadas las cepas bacterianas, de la manera expuesta con anterioridad, recrecidas las colonias de las cepas tipo estudiadas, se procedía a la extracción de las mismas.

Para ello se prepara una suspensión de las colonias en agua estéril en un tubo de ensayo, agitando en un vórtex hasta tener del orden de 2 unidades nefelométricas de turbidez.

Se trata con acetona y n-hexano a partes iguales en volumen (10 mls de cada uno de ellos) y se lleva al congelador durante 8-10 horas, al cabo de las cuales se decantan los líquidos que se generan así como el precipitado resultante.

En dicho precipitado, se encontrarán los ácidos grasos, recogiendo la disolución resultante, que se evapora en atmósfera de nitrógeno o de argon y posteriormente se le agrega unos 10 mls de una mezcla al 50% V/V de agua estéril y de cloruro de metileno, centrifugándose a 2500 rpm durante 5 minutos.

Al cabo de este tiempo, se decantan las capas acuosa y orgánica formadas, quedando en la acuosa el resto de los ácidos grasos existentes así como la materia proteica de las micobacterias, y en la capa orgánica las quinonas a estudiar.



#### 4.4.1.- Cromatografía en capa fina de los extractos quinónicos obtenidos.

Las micobacterias objeto del presente trabajo, así como las cepas de *Nocardia farcinica* y de *Gordonia rubropertincta*, fueron sometidas al control de la cromatografía en capa fina sobre gel de sílice, al objeto de evaluar el grado de separación y de pureza de las quinonas constituyentes de las mismas, antes de someterlas a HPLC.

Para ello, se disolvieron las muestras extraídas según el procedimiento anterior en una mezcla de hexano-acetato de etilo-acetonitrilo 10:1 y se depositaron las muestras en la capa fina de la placa con un capilar.

Una vez desecadas las muestras, se desarrollaron en una cubeta que contenía cantidades variables de hexano-acetato de etilo, como fase móvil de desarrollo. Se revelaron con óleum.

Tras varias pruebas, se comprobó que la mezcla adecuada para el desarrollo del frente era la constituida por hexano: acetato de etilo 20:1.

Se puso de manifiesto en una primera aproximación el contenido de las quinonas de las diferentes cepas, su Rf y la presencia o ausencia de algunas de ellas.

Estos resultados experimentales se expresan a continuación. En ellos se pone de manifiesto el Rf de los patrones, así como el de las diferentes quinonas constitutivas de las cepas bacterianas.

En las figuras 42, 43, 44, 45, 46 y 47 se pueden apreciar las diferentes cromatografías en capa fina realizadas colocando los patrones y simultáneamente distintas micobacterias, que nos dan frentes de adsorción en la placa de silica-gel, con diferentes Rf.



Fig. 42

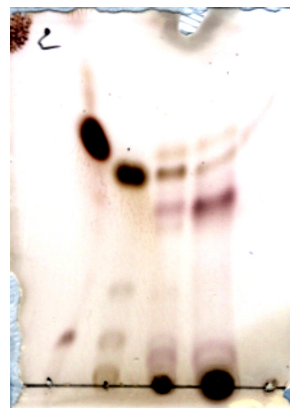


Fig 43

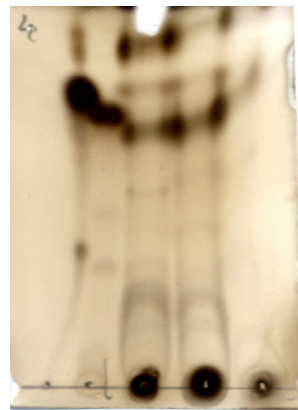


Fig. 44

Fig. 45

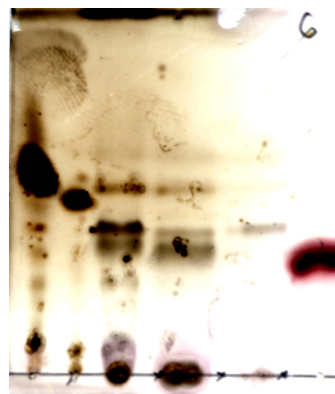
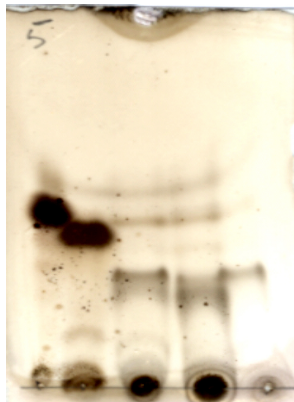


Fig. 46

Fig. 47

#### 4.4.2.- Cromatografía HPLC.

Vistos los resultados obtenidos por cromatografía en capa fina, utilizando como disolventes los expresados anteriormente a distintas polaridades, y observando los Rf de patrones y micobacterias, con esa información previa, se realizó la cromatografía líquida de alta presión.

Los espectros se llevaron a cabo en un cromatógrafo Varian Pro Star compuesto de dos bombas Vaman Prestar 210.

El detector fue de Diodo Array (DAD) marca Varian 335 y las muestras fueron introducidas a través de un inyector automático Pro Star 410.

La columna utilizada fue la Phenomenex Fusion de 4 micras y de 250x 4,60 mm. de diámetro de fase reversa.

El detector efectuó barridos a longitudes de onda de 280 y 254 nm respectivamente.

El flujo utilizado fue de 1 ml/min.



En el primero y en el segundo de los ensayos llevados a cabo en gradiente el disolvente A fue agua y el disolvente B metanol, mientras que en el tercero de los ensayos el disolvente A seguía siendo agua mientras que el B fue acetonitrilo.

En el primero de los métodos se inició el gradiente usando un 30% de metanol y un 70% de agua manteniéndolo durante 5 minutos. El 100% de metanol comienza a los 20 minutos de iniciado el proceso, permaneciendo con esta polaridad durante 5 minutos. El proceso dura pues un total de 25 minutos.

Por este procedimiento solo se corrieron los patrones y *Mycobacterium bolleti*.

El resultado obtenido queda reflejado en la Figura 48.

En la misma se puede apreciar la aparición de diferentes picos cromatográficos a tiempos de retención que van desde 4,1 minutos hasta 25,1 minutos.

La resolución cromatográfica es aceptable, pero se probaron otros métodos de separación utilizando gradientes de disolventes polares y no polares en distinta proporción.

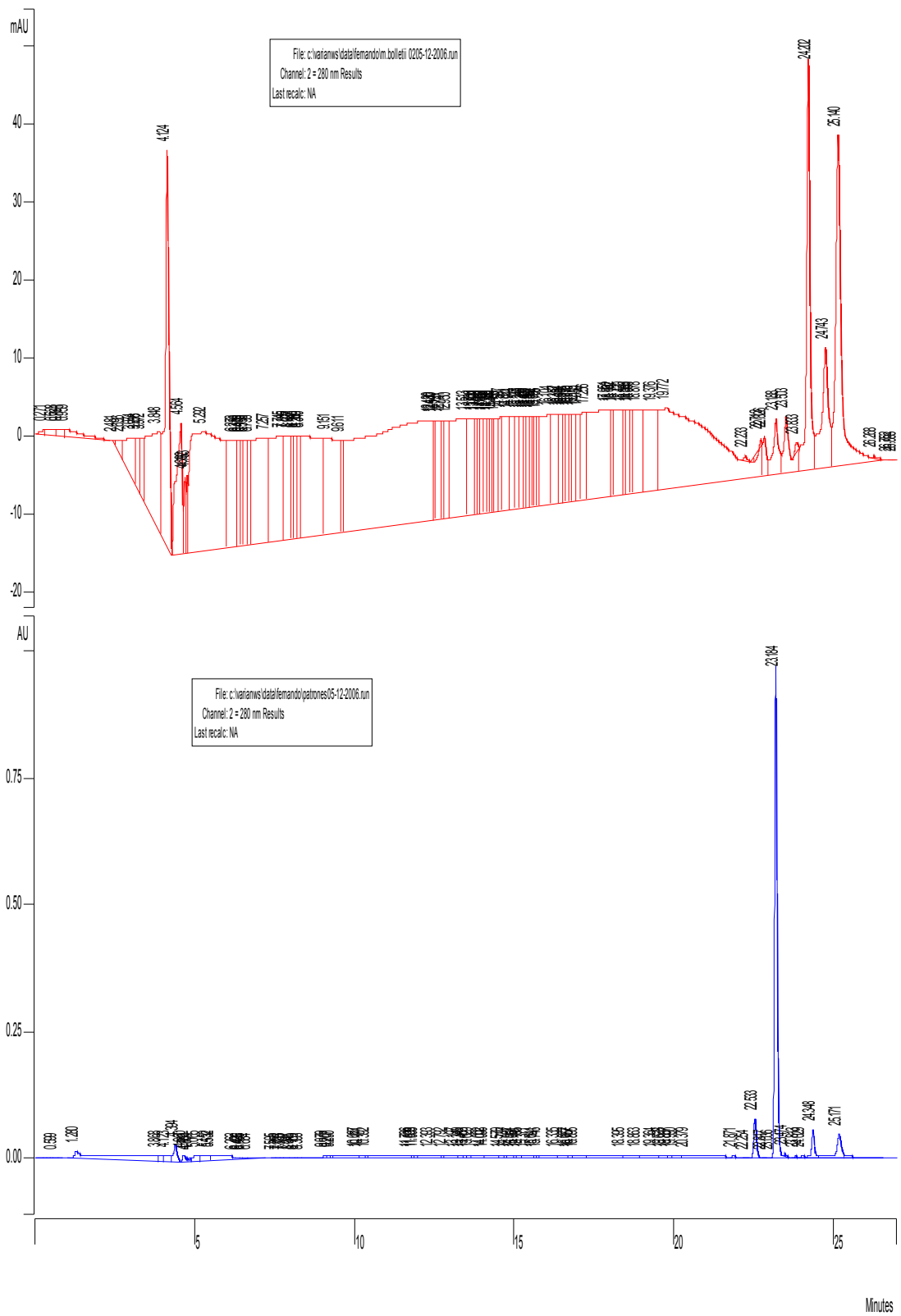


Fig. 48

Con anterioridad al procesado de las muestras se introdujeron los patrones para saber los tiempos de retención de cada uno de ellos.

Los resultados experimentales obtenidos para *Mycobacterium bollettii* por la aplicación del Método 1 se expresan en la Figura 49:

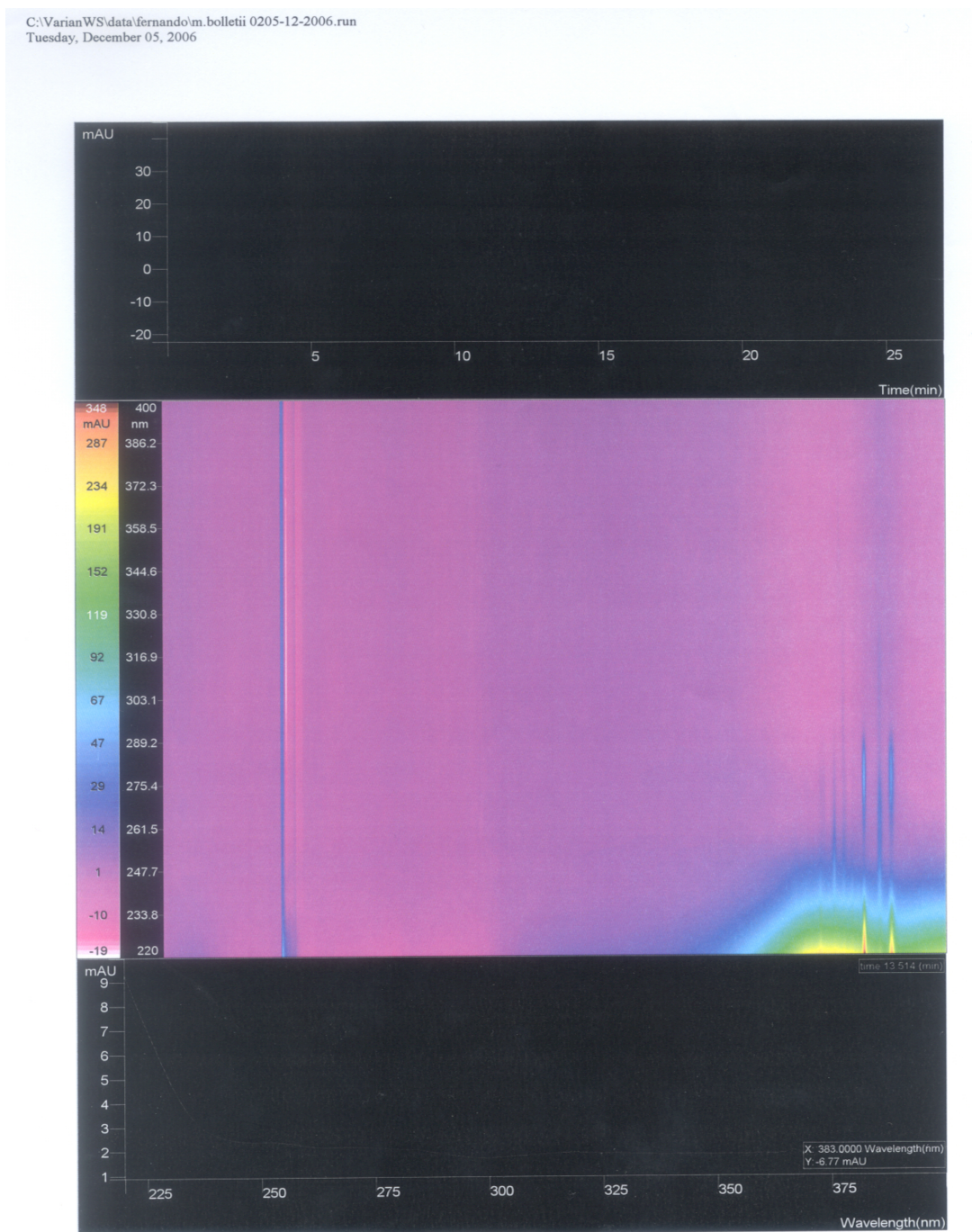


Fig. 49 *Mycobacterium bollettii* por el Método Cromatográfico N° 1.

Los resultados obtenidos de la aplicación del Método 2 a *Mycobacterium bollettii*, se exponen en la Figura 50:

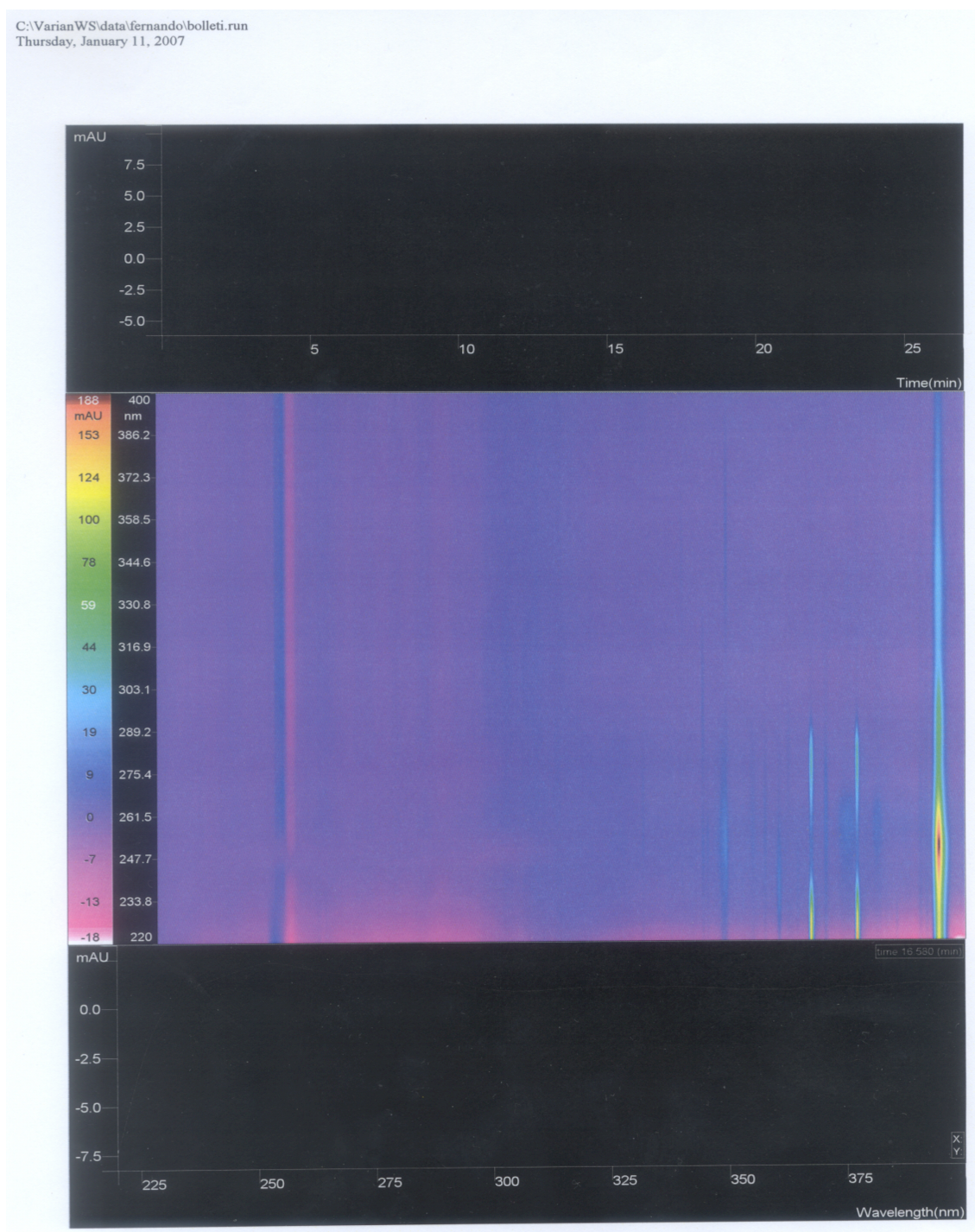


Fig. 50, Método de Separación Cromatográfica N° 2.

Por el mismo procedimiento se procesó el *Mycobacterium phoceae*, obteniéndose el resultado que se expresa en la Figura 51:

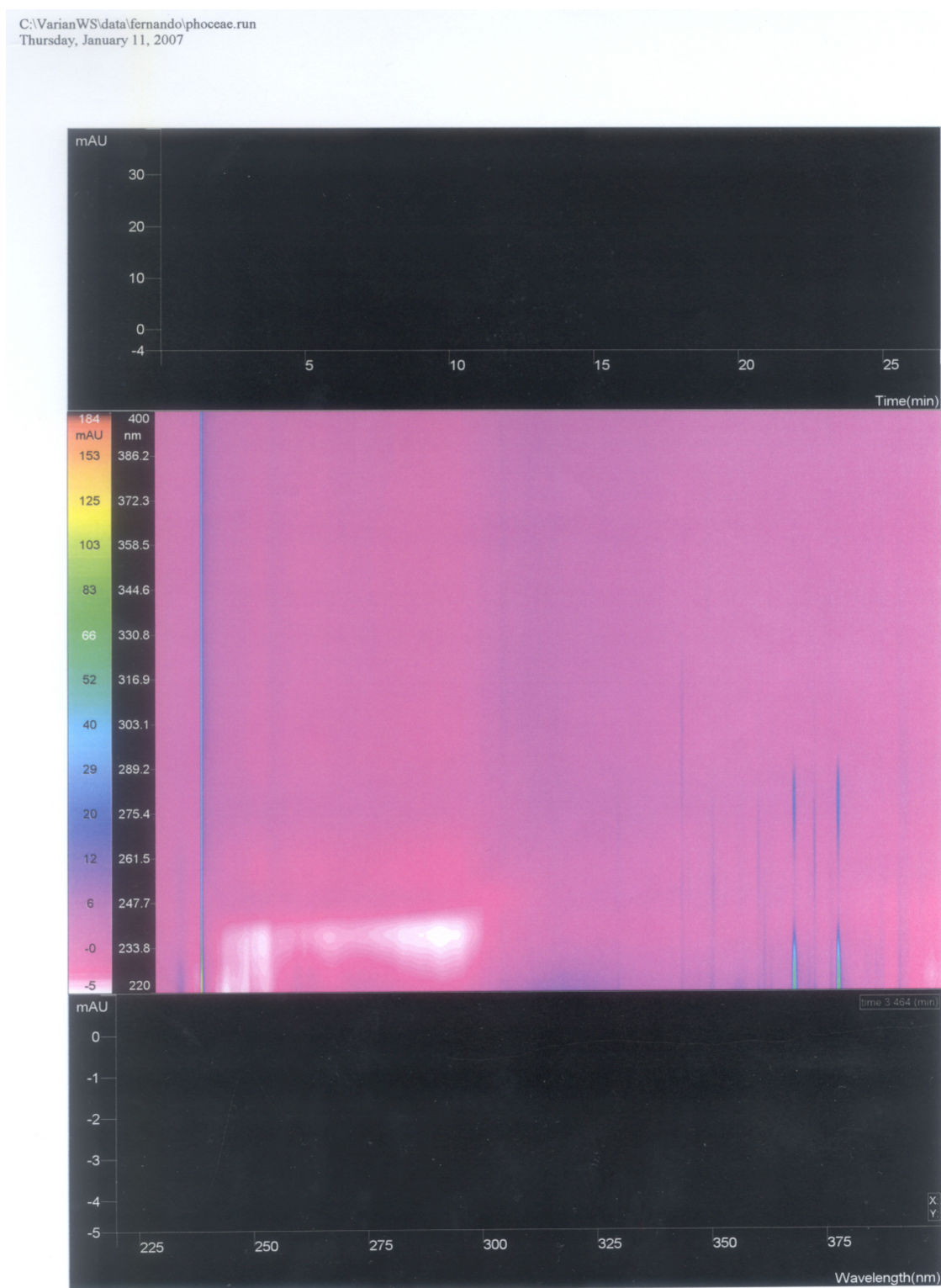


Fig. 51, *Mycobacterium phoceae* por HPLC.

Finalmente los patrones constituídos por mezcla de menaquinonas, procesados por el Método 2, arrojaron el resultado experimental que se muestra en la Figura 52:

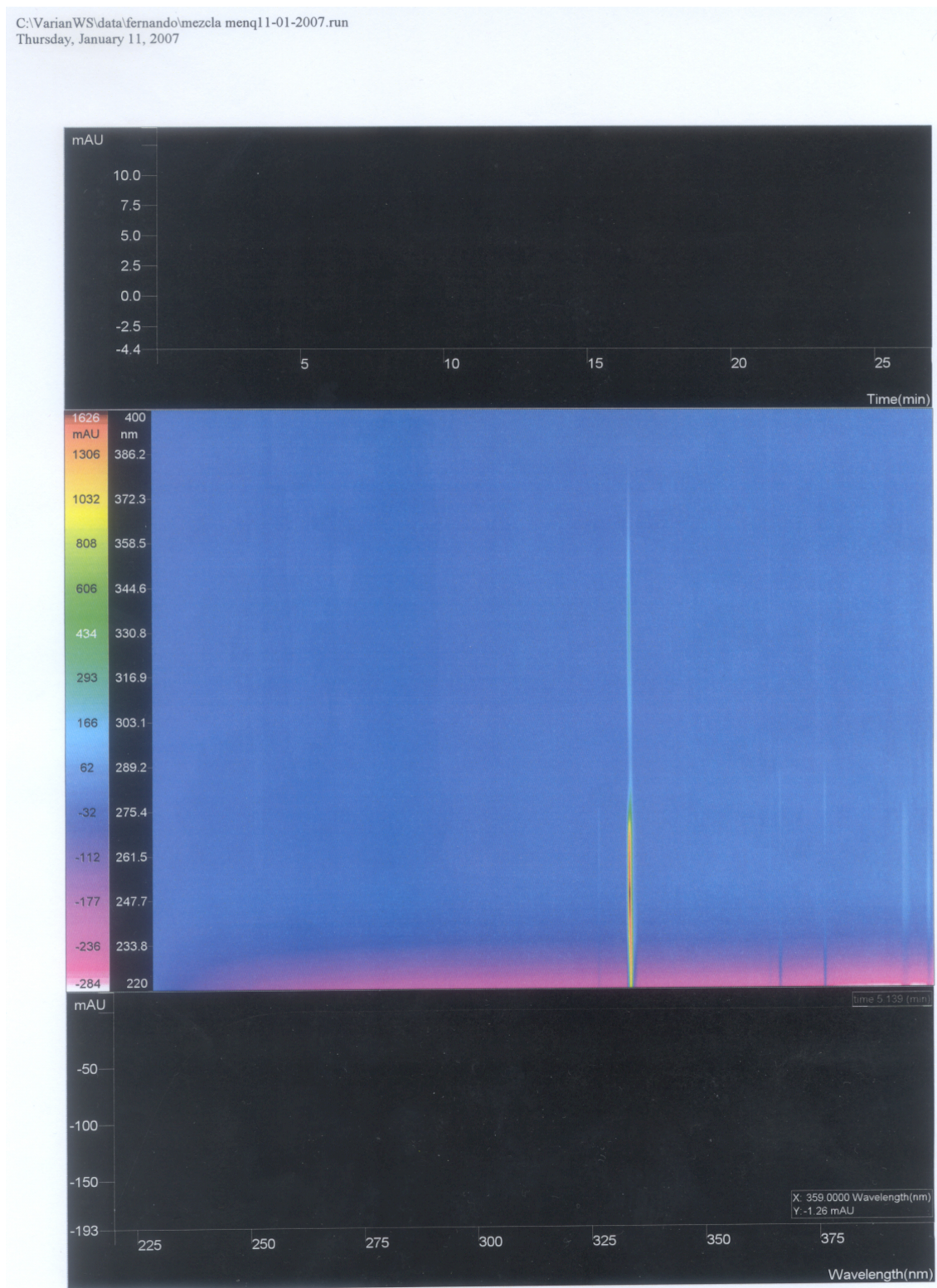


Fig. 52

En el segundo de los procedimientos de separación cromatográfica utilizados en gradiente, se comienza con una mezcla de metanol al 60% y 40% de agua durante los cinco primeros minutos de elución. Posteriormente a los 10 minutos, se pasa al 100% de metanol, permaneciendo con esta concentración hasta el final del proceso que se lleva a cabo a los 20 minutos.

En la Figura 53 se ponen de manifiesto los resultados obtenidos por este procedimiento.

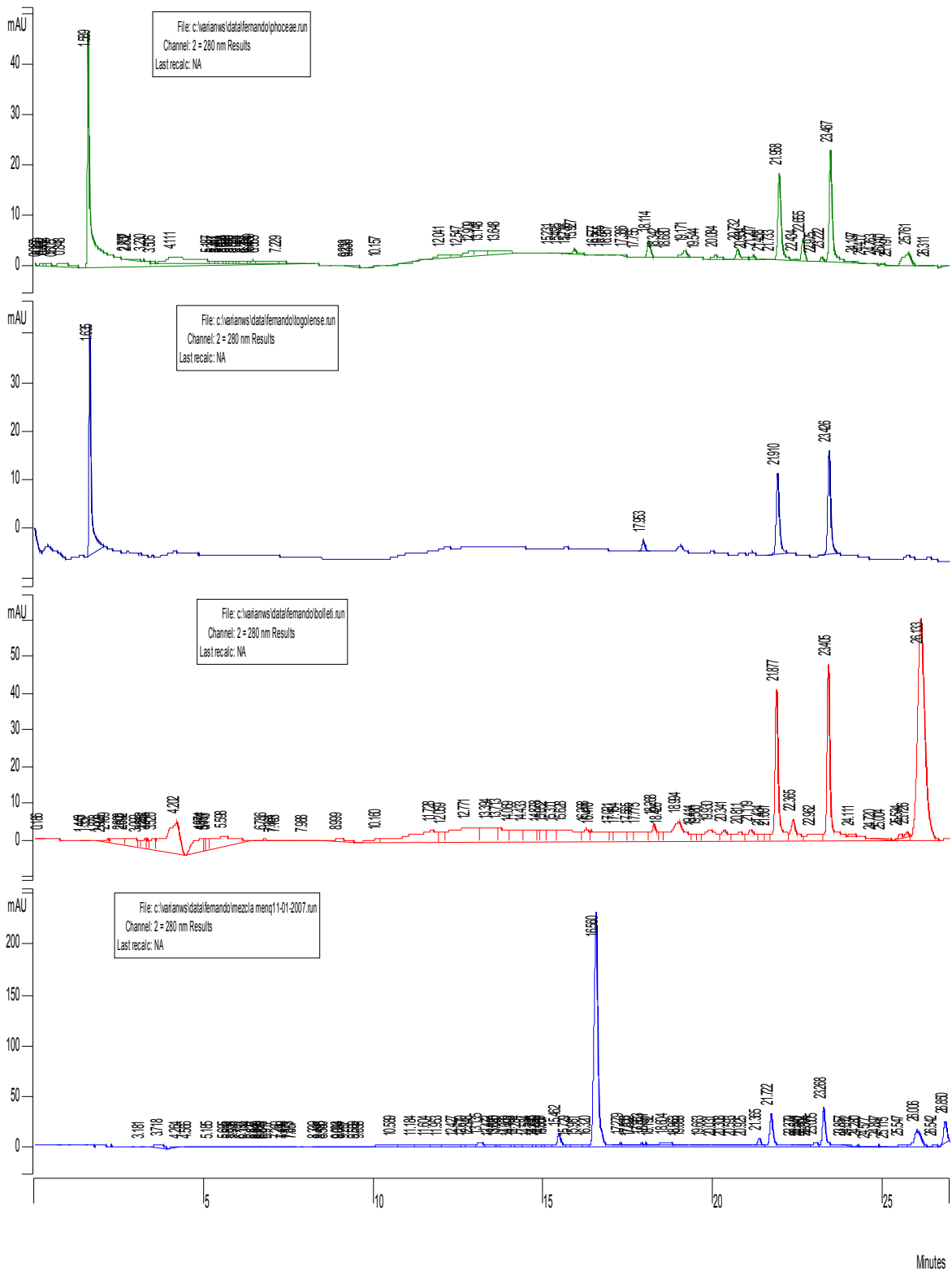


Fig. 53



El tercer procedimiento de separación comienza con una mezcla de acetonitrilo al 60% agua al 40% hasta los 5 minutos. Posteriormente alcanza el 100% de acetonitrilo a los 10 minutos y finaliza a los 15 minutos.

Los resultados obtenidos quedan reflejados en la Figura 54:

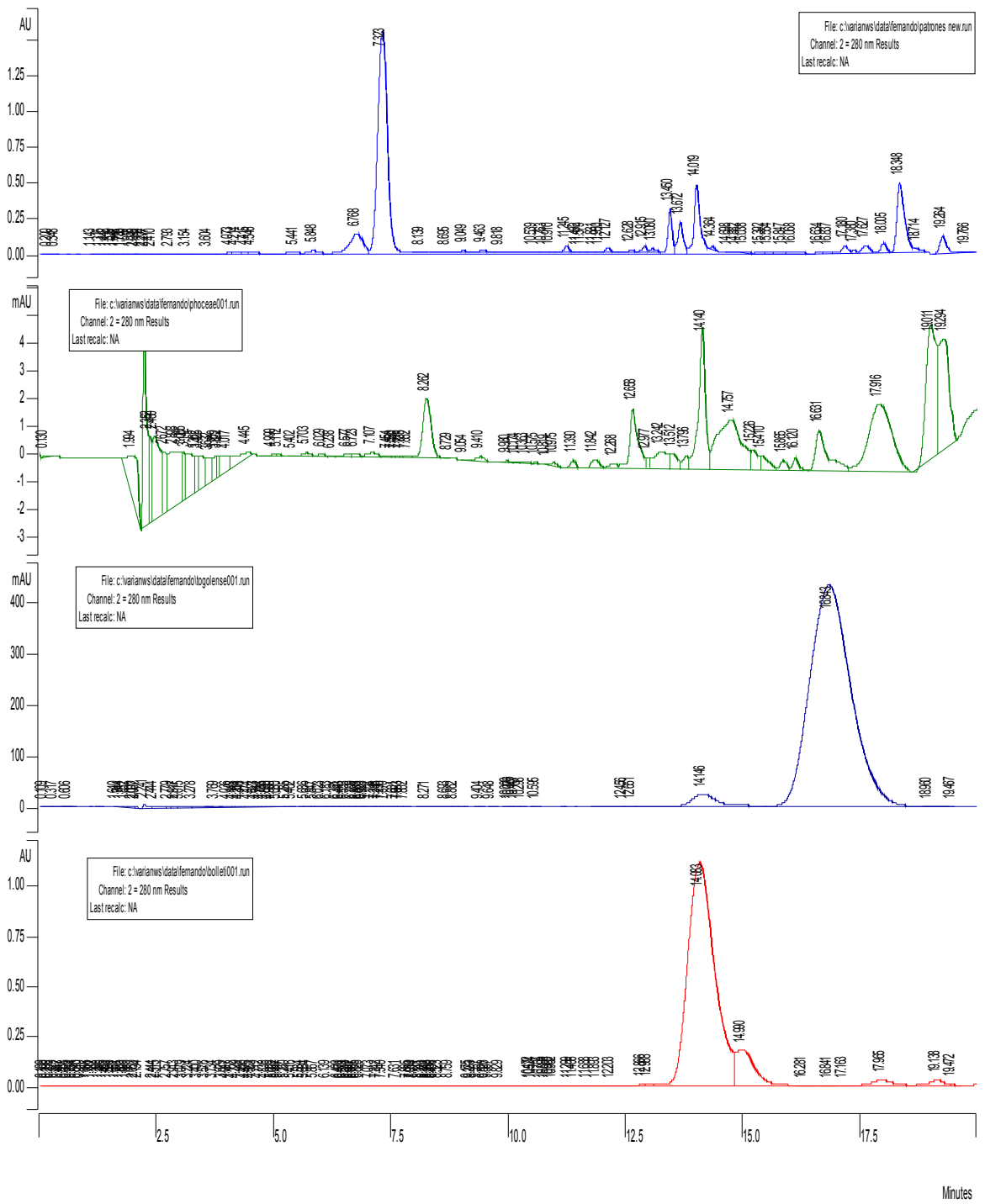


Fig. 54

### Comentario de los resultados obtenidos:

1.- En la primera separación cromatográfica con agua y metanol, se realiza una aproximación al sistema separativo de las quinonas. Los patrones quedan bien separados, pero aparecen casi al final del cromatograma, durando este proceso 25 minutos.

Sólo se aplicó esta técnica en el estudio de *Mycobacterium bolleti*, en el cual se aprecian varias quinonas en el tramo final del espectro.

2.- El segundo método cromatográfico, nos ofrece una información más discriminatoria y eficaz que el anterior.

El patrón de menadiona K-3 aparece a un tiempo de retención de 16.5 minutos, la menaquinona K-2 aparece a 21,7 minutos y la fitomenadiona K-1 a 23,2 minutos respectivamente.

Como era de esperar, ninguno de las tres micobacterias analizadas en principio por este procedimiento poseen en su constitución menadiona.

La especie de las tres analizadas que posee mayor variabilidad química en componentes de tipo quinónico es *Mycobacterium phoceae*, en el que aparece un componente quinónico a 15,9 min., próximo a la menadiona y otros a 17,7 min., 20,7 min., 22,6 min. y 25,7 min. respectivamente, hasta el momento no identificadas, aparte de la presencia de fitomenadiona , menaquinona y menadiona.

*Mycobacterium togolense* presenta un cromatograma muy limpio. Solo posee fitomenadiona menaquinona y un pico a 17,9 min. no identificado.

*Mycobacterium phoceae* aparte de poseer también en su estructura fitomenadiona y menaquinona, tiene picos sin identificar a 18,2 min. y a 26,1 min. respectivamente.

3.- Con relación al tercer método de separación utilizado a base de acetonitrilo y agua, se observa que la menadiona K-3 tiene un tiempo de retención de 7,3 min., la menaquinona K-2 de 14 min. y la fitomenadiona K-1 de 18,3 min.

*Mycobacterium phoceae* sigue siendo la especie, dentro de las analizadas, que presenta mayor variabilidad química, con la presencia de un pico a 8,2 min. de tiempo de retención y otros a 12,6, 14,7 16,6, 17, 9 y picos finales no identificados. Se observa claramente la fitomenadiona K-1 , la menaquinona y algo la menadiona (k-3)

*Mycobacterium togolense*, como en el caso anterior, presenta un espectro bastante limpio, con un pico al tiempo de retención de la menaquinona K-2 y otro desconocido a 16,8 min.no identificado.

*Mycobacterium bolleti* tampoco presenta un espectro muy complicado, bastante limpio, observándose aparte de la fitomenadiona K-1 en su constitución, así como menaquinona K-2 y picos a 14,9 y 17,9 min. respectivamente, no identificados.

4.- El cuarto procedimiento de separación partía de metanol al 80% y agua al 20% durante 5 minutos. A los 10 minutos se cambiaba a metanol al 100% que permanecía hasta los 20 minutos, al cabo de los cuales acababa el espectro. Los resultados obtenidos tanto de las muestras de patrones como de las tres cepas analizadas en cada uno de los procedimientos anteriores, se expresan en la Figura 55:

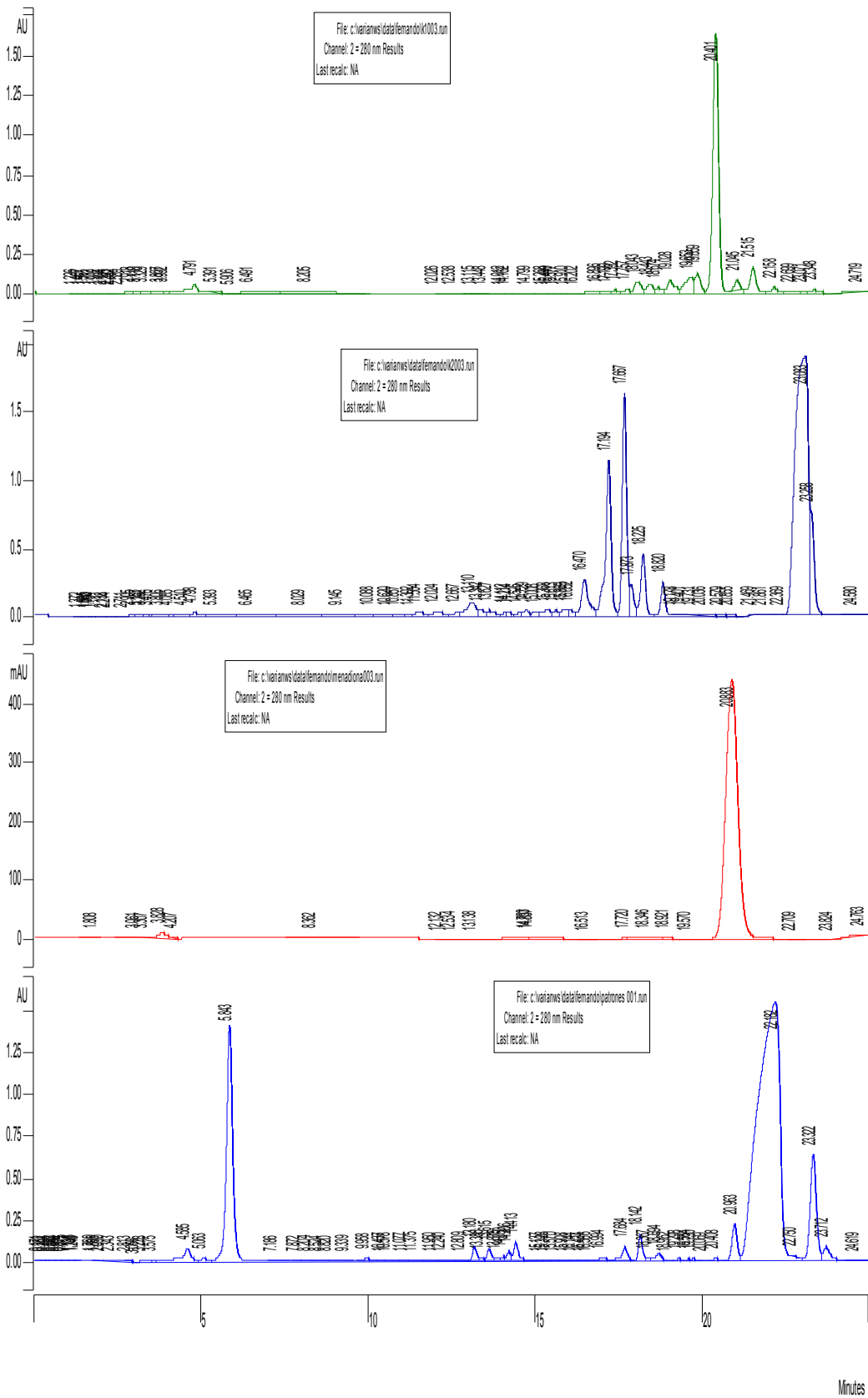


Fig. 55

En lo relativo a este método de separación 4, la mezcla de quinonas como en los anteriores, aparece bien diferenciada, a 5.8 minutos sale el pico de la menadiona K-3, a 20.9 la menaquinona K-2 y a 23.3 la fitomenadiona K-1.

*Mycobacterium bolletii* presenta fitomenadiona, *Mycobacterium phoceae* fitomenadiona igualmente y *Mycobacterium togolense* carece de menadiona, sí posee fitomenadiona y menaquinona y otros picos aún no identificados correspondientes a otras quinonas.

5.- Método 5 de separación:

Es un método isocrático a base de metanol.

Los resultados experimentales obtenidos, se exponen en las Figuras 56 y 57:

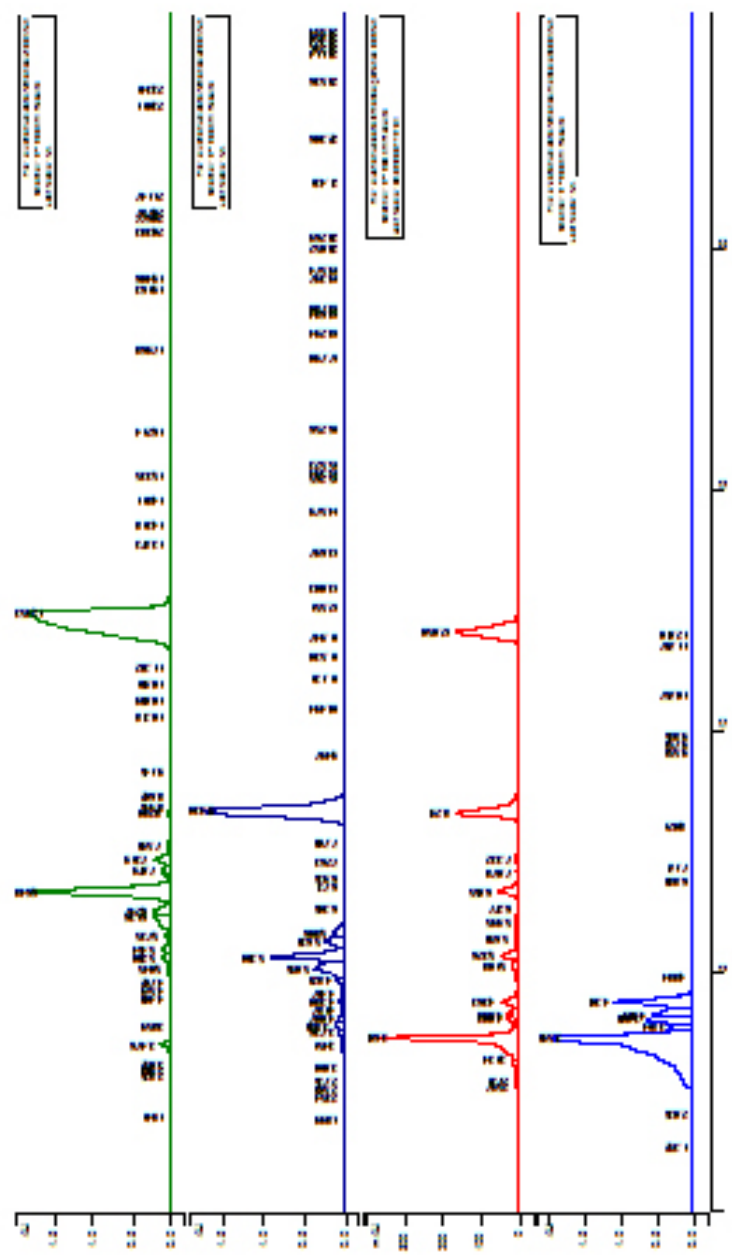


Fig. 56

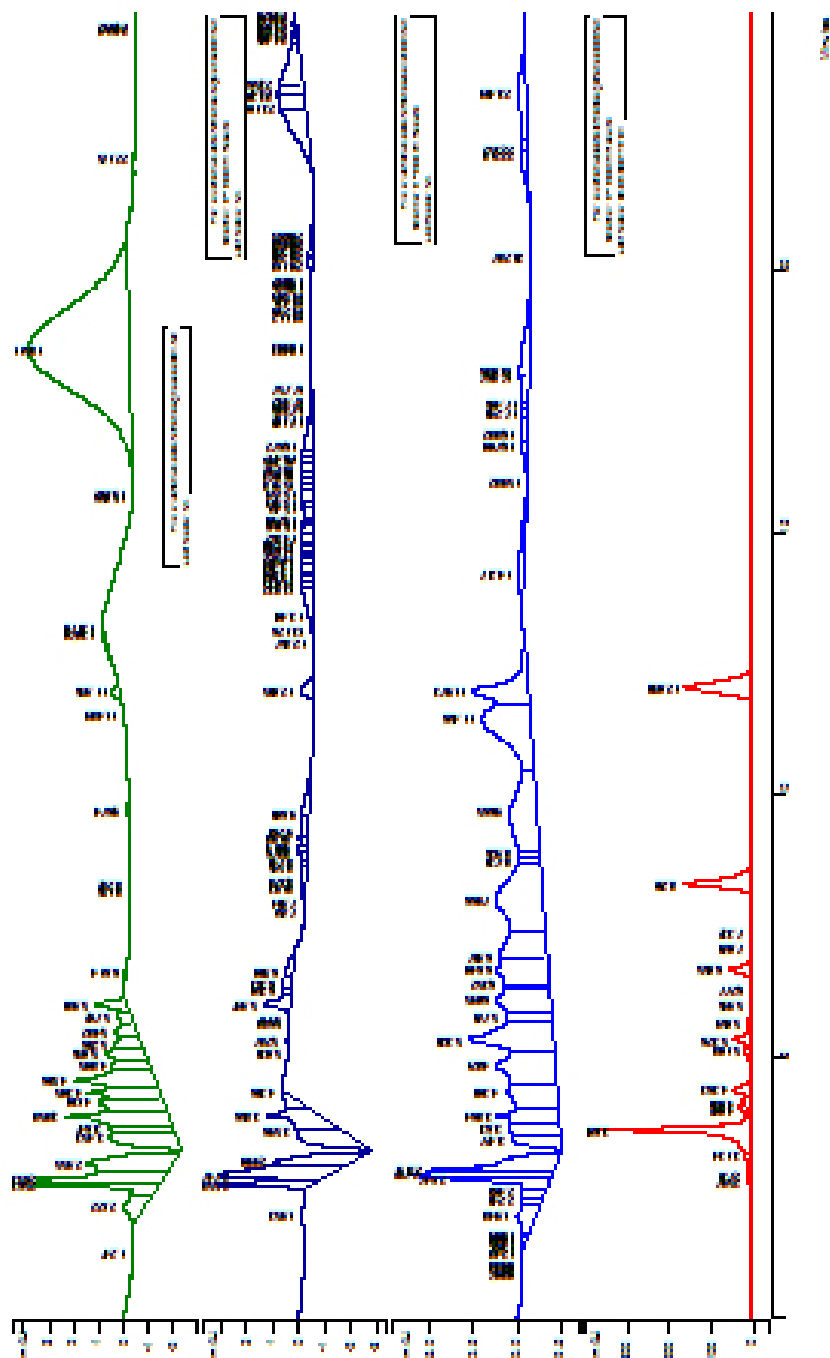


Fig 57

Como se pone de manifiesto, los patrones aparecen a menores tiempos de retención que en los casos anteriores, al aumentar la polaridad de la fase móvil.



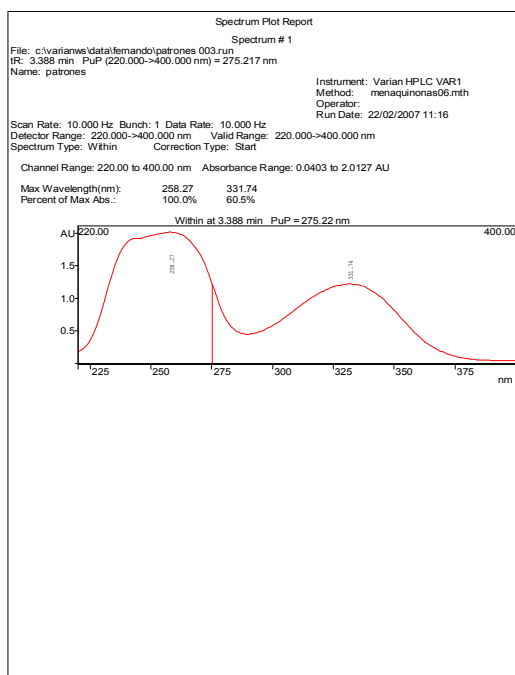
En *Mycobacterium bolleti*, aparece claramente la presencia de una señal al mismo tiempo de retención de la fitomenadiona K-1, no aparece K-2 y al mismo tiempo se atisban algunos picos hacia el final del espectro, que pueden ser atribuidos a quinonas de índice superior.

En *Mycobacterium togolense*, aparece un pico muy limpio de K-1, confirmado en espectroscopia UV-Vis y diversos picos desconocidos a tiempos de retención superiores.

En *Mycobacterium phoceae*, K-1 y dos picos grandes a tiempos de retención superiores a 18,5 minutos.

A fin de poner de manifiesto la existencia de fitomenadiona K-1 en los microorganismos analizados, se realizó el espectro UV-Vis. De los patrones, así como de cada uno de los picos con probabilidad de serlo, una vez separados por cromatografía.

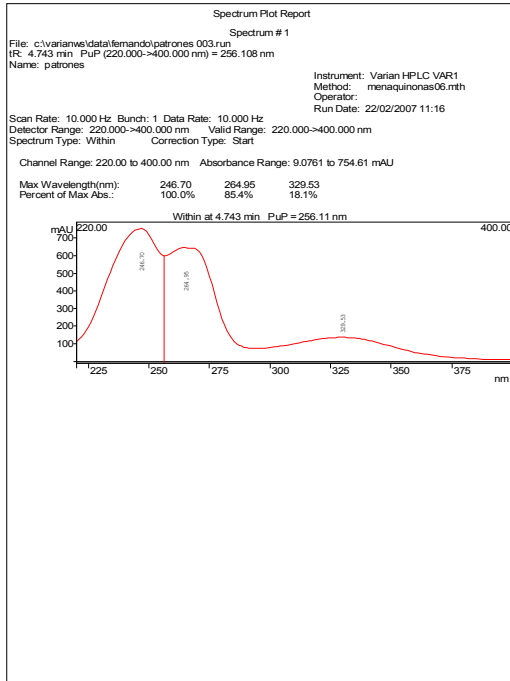
Los espectros de cada uno de los patrones, se muestran en las Figuras 58, 59, 60 y 61.



menadiona

Fig 58

En la menadiona, aparecen dos máximos de absorción a 258,27 nm y a 331,74 nm., respectivamente.

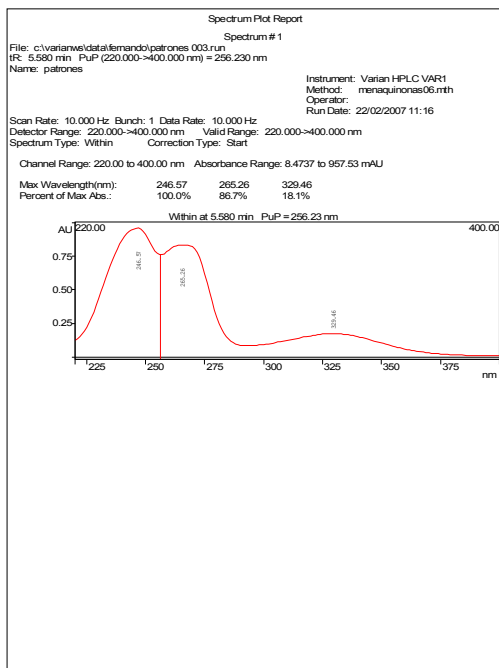


K2

Fig 59

Como se puede apreciar, la menaquinona K-2, da máximos de absorción a 246,69 nm., 264,91 nm. Y 329,54 nm. respectivamente.

La fitomenadiona, arrojó el espectro siguiente:



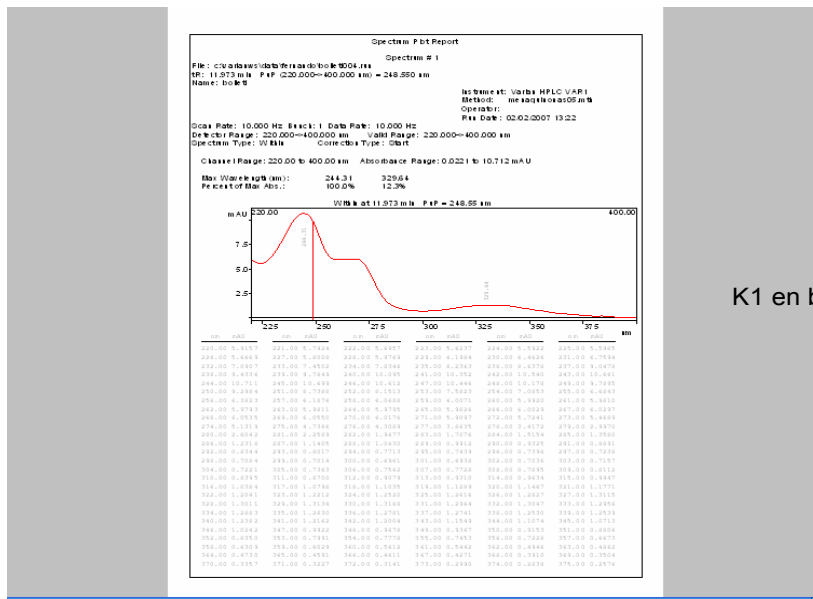
K1

Fig. 60

En él se pone de manifiesto la existencia de un máximo de absorción de 264,57 nm., a 265,26 nm. y a 329,46 nm.

Como se puede apreciar, los espectros UV-Vis. de fitomenadiona K-1 y de menaquinona K-2, son muy análogos.

En *M. bolleti*, se realizó el espectro al pico cromatográfico que aparece a igual tiempo de retención de la fitomenadiona K-1, siendo el que se expone a continuación:

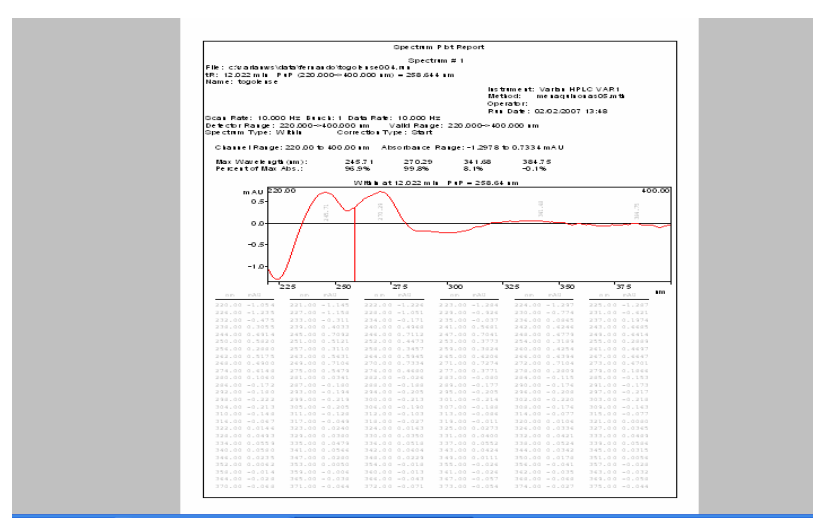


K1 en boleti004

Fig. 61

Se observa una gran analogía con el del patrón, pero no podemos elucidar si se trata de fitomenadiona K-1 o menaquinona K-2.

También se realizó el análisis del pico cromatográfico de *M. togolense*, que aparece al mismo tiempo de retención de la fitomenaquinona K-1. El resultado obtenido se expone en el siguiente gráfico:



K1 en togolense

La analogía es elevada con relación al espectro del patrón, aunque habrá que confirmar por otros procedimientos instrumentales fisico-químicos, que se trata de fitomenadiona K-1.

6.- Método nº 6 de separación cromatográfica en HPLC.

Se utiliza un régimen isocrático a base de metanol y de tetrahidrofurano en una proporción de 3:1.

En primer lugar se corren los patrones, que arrojan el espectro de la Figura 62:

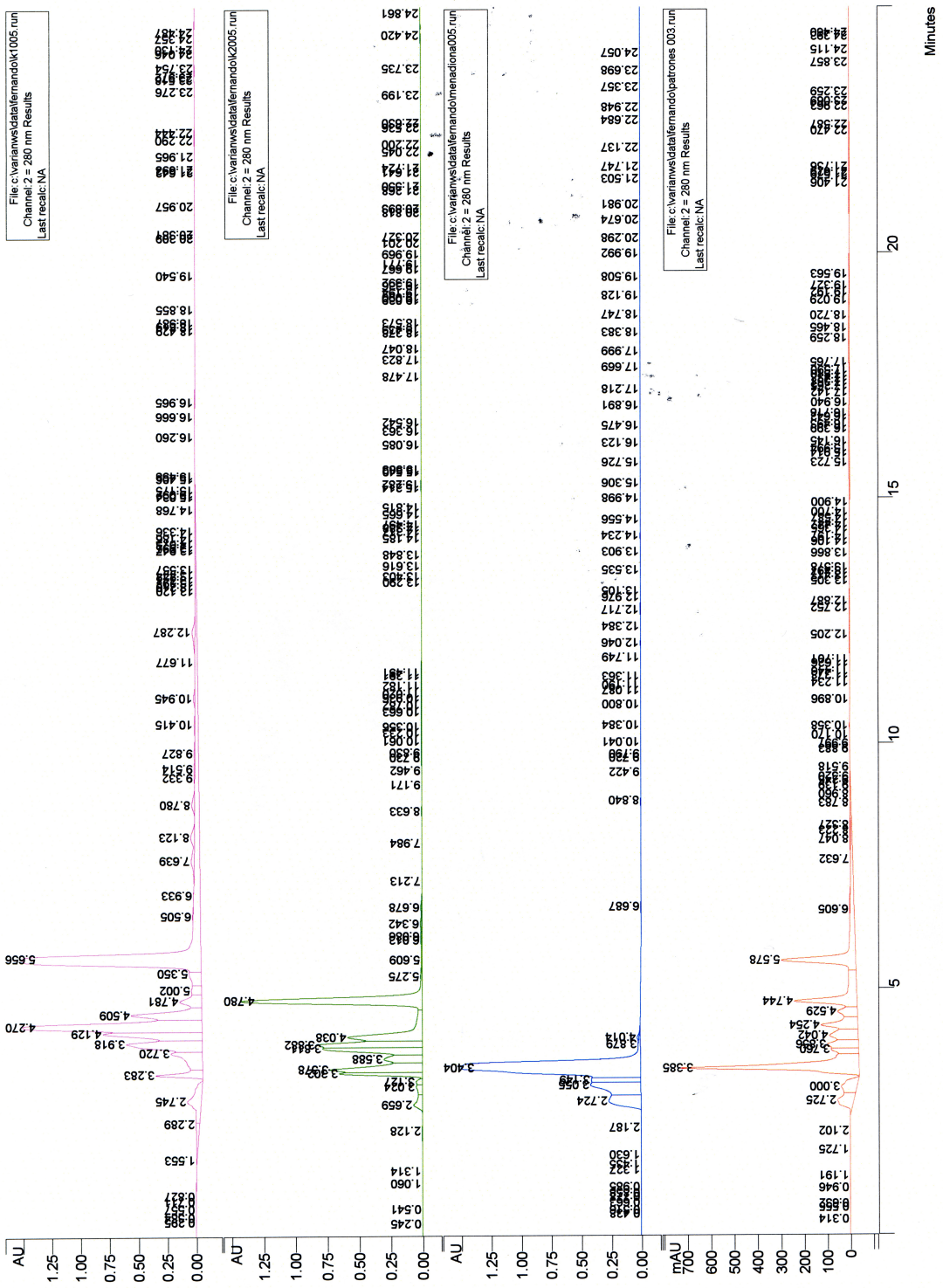


Fig. 62

Como se puede apreciar, en primer lugar se han procesado la menaquinona K-3, la fitomenadiona K-1 y la menaquinona K-2 por separado y luego conjuntamente.

La menadiona K-3, aparece a un tiempo de retención de 3,4 minutos, la menaquinona K-2 a 4,78 minutos y la fitomenadiona K-1 a 5,56 minutos respectivamente.

Los resultados obtenidos para las tres cepas en estudio por este método, se exponen en la Figura 63:

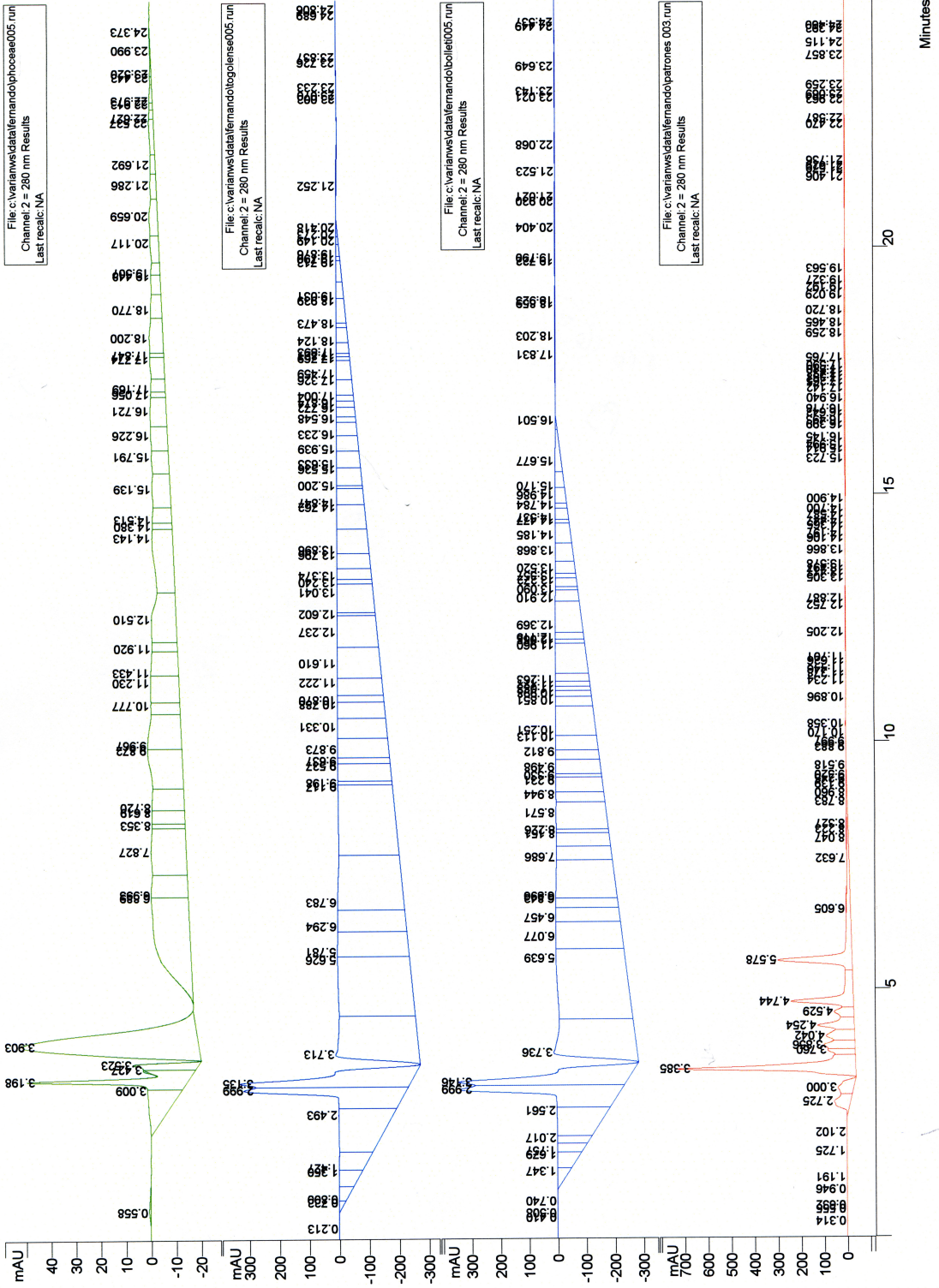


Fig. 63



En ella, se aprecia que *Mycobacterium bolleti* presenta en su composición fitomenadiona K-1 y otro componente, por ahora desconocido.

*Mycobacterium togolense*, también presenta en su composición fitomenadiona K-1, mientras que en *Mycobacterium phoceae*, no aparece por este procedimiento claramente fitomenadiona K-1, teniendo picos de mayor entidad a mayores tiempos de retención.

Al mismo tiempo se procesaron otras cepas diferentes a las tres estudiadas hasta ahora, concretamente *Mycobacterium wolinskyi*, *Mycobacterium fortuitum*, *acetamidomidolitycum*, *Mycobacterium psychrotolerans* y *Mycobacterium vanbaalenii*.

Los resultados experimentales obtenidos, se exponen en la Figura 64:

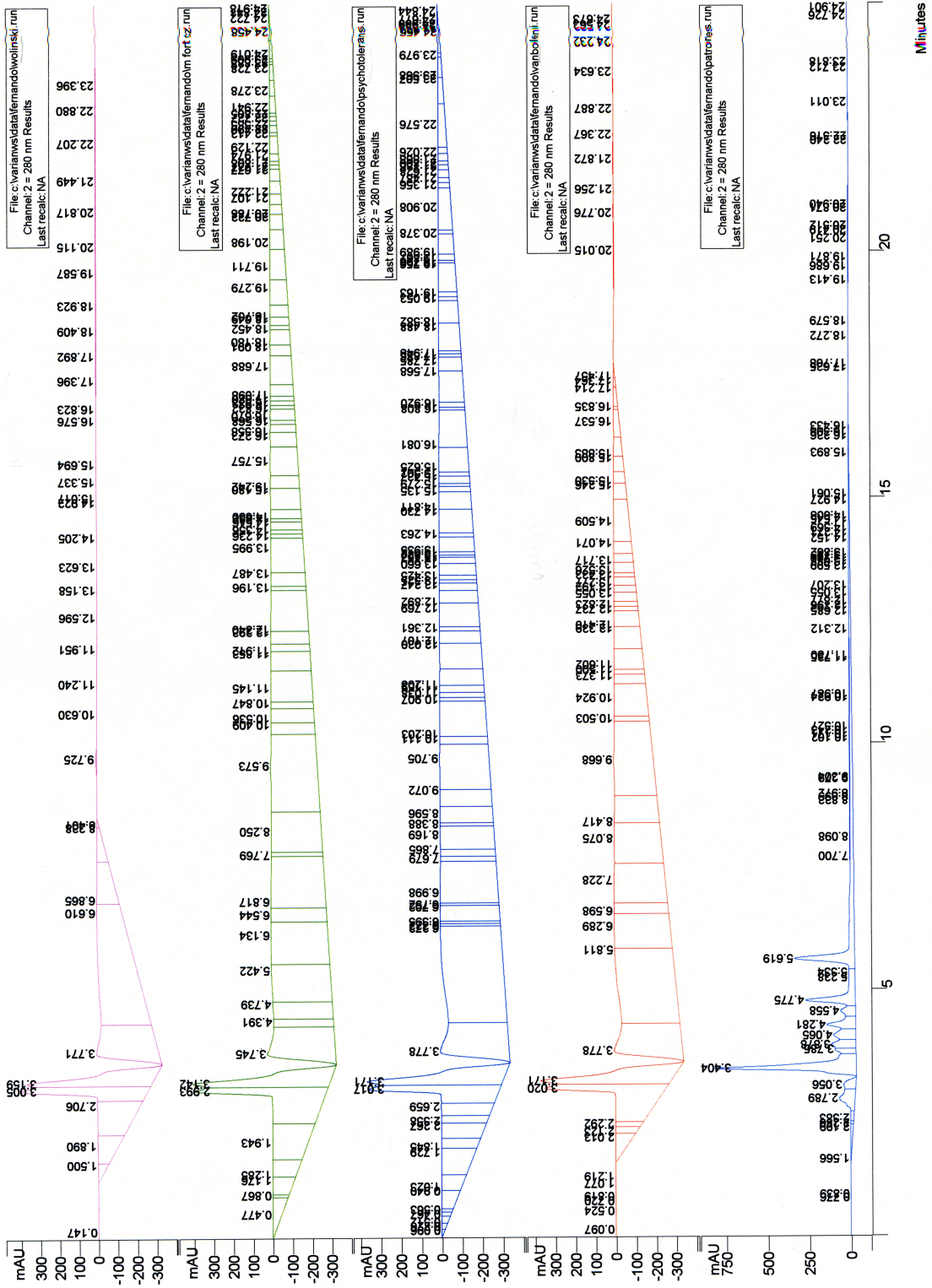


Fig. 64

En *Mycobacterium wolinskyi*, se aprecia la existencia de fitomenadiona K-1, pero no muy claramente, así como de menaquinona K-2.

En *Mycobacterium fortuitum acetamidolitycum*, la presencia de menaquinona K-2 y fitomenadiona K-1 y algo de K-3.

En *Mycobacterium psychrotolerans*, no fitomenadiona K-1 ni K-3, pero sí menaquinona K-2. No se aprecia la presencia de menadiona (K-3).

En *Mycobacterium vanbaalenii*, la presencia de fitomenadiona K-1 y parcialmente menaquinona K-2.

Dado que por este método 6, isocrático, a base de metanol y tetrahidrofurano en proporción 75:25, separa bien los patrones y las muestras iniciales de referencia, se sometieron los extractos de las cepas disponibles a este procedimiento cromatográfico, con los resultados que se expresan en la Figura 65:

Fig. 65

En esta figura se pone de manifiesto que la fitomenadiona K-1 aparece a un tiempo de retención de 5,6 minutos, la menaquinona K-2 a 4,7 minutos y la menadiona K-3 a 3,3 minutos de tiempo de retención.

*Mycobacterium aichiense* parece presentar pequeña cantidad de K-1, que con posterioridad se comprobó que no era tal como en *Mycobacterium austroafricanum* y *Mycobacterium canariasense*. *Mycobacterium brisbanense*, no parece presentar esta quinona, aunque el ruido de fondo es más elevado que en el resto de los que aquí analizamos a través de la figura. *Mycobacterium bolletii* evidencia la presencia por este procedimiento de fitomenadiona K-1.

Por otro lado, en la siguiente figura espectral, se estudian otras cinco especies.

Fig. 66

En ella, se pone de manifiesto que en *Mycobacterium conceptionense*, existen varios picos cromatográficos, pero ninguno coincidente con los de los patrones analizados, dada la baja resolución conseguida.

En *Mycobacterium chlorophenolicum*, existe muy poca cantidad de K-1, nada de menaquinona K-2 y ligeros atisbos de menadiona (K-3).

En *Mycobacterium elephantis*, hay pequeñas cantidades de K-2, en *Mycobacterium flavescens*, ninguna de ellas, aunque el espectro no es muy significativo al poseer mucho ruido de fondo y necesitar inyectar más cantidad de muestra.

En *Mycobacterium frederickbergense*, se apunta también la posibilidad de existencia en muy pequeña cantidad de K-1, aunque no es muy significativa.

En la Figura 67, se estudian otras cinco especies, de las que hacemos a continuación el comentario de sus contenidos quinónicos:

Fig. 67



En ella se pone de manifiesto que *Mycobacterium gallinarum* es muy poco rico en quinonas, se vislumbra débilmente la presencia de fitomenaquinona (K-1) y algo de menadiona (K-3).

Por otro lado *Mycobacterium gilvum*, presenta cromatograma plano, con ausencia de quinonas, mientras que *Mycobacterium hackesackense*, no posee K-1, pero sí K-2 y quinonas de índice superior. Un patrón muy parecido es el que arroja *Mycobacterium houstonense*, que no presenta K-1 muy nítidamente, pero sí quinonas de índice superior. Ambas micobacterias tienen patrón similar al descrito para *Mycobacterium conceptionense*.

Finalmente, en la parte superior del espectro *Mycobacterium fortuitum acetamidolyticum*, no se discierne bien la existencia de quinonas del tipo analizado, dado también la poca cantidad inyectada y la existencia concomitante de ruido de fondo.

En la Figura 68, se analizan otras cinco especies micobacterianas.

Fig 68

En ella se pone de manifiesto que *Mycobacterium neworleaense*, posee pequeñas cantidades de quinonas, solo un pequeño pico de K-3.

*Mycobacterium hodleri* es poco rico en quinonas presentando un cromatograma plano, con una pequeña cantidad de menadiona (K-3).

En *Mycobacterium phoceae*, posee poca cantidad de fitomenaquinona K-1 y en cambio se pone de manifiesto la presencia de quinonas de índice más elevado. *Mycobacterium poriferae*, posee quinonas K-1 y de índice superior, mientras que *Mycobacterium psychrotolerans*, en la parte superior del cromatograma, es poco rico en quinonas, presentando un cromatograma plano.

En la Figura 69, se estudian seis especies nuevas:

Fig. 69

En el mismo, se pone de manifiesto que *Gordonia rubropertincta*, no posee las quinonas patrón, *Mycobacterium senegalense* posee K-1, K-2, atisbos de K-3 y

quinonas de índice superior. *Mycobacterium thamnopheos* posee perfil bajo de quinonas, aunque se apunta la posibilidad de existencia de K-1 y K-2, mientras que en *Mycobacterium togolense* se aprecia una pequeña cantidad de fitomenaquinona K-1.

Finalmente, en la parte superior del cromatograma, se puede ver que *Mycobacterium vanbalenii* tiene quinonas de tiempo de retención correspondiente a K-1, aunque en pequeña cantidad y sí de índice superior al igual que *Mycobacterium wollinskyi* que se encuentra en el extremo superior del cromatograma.

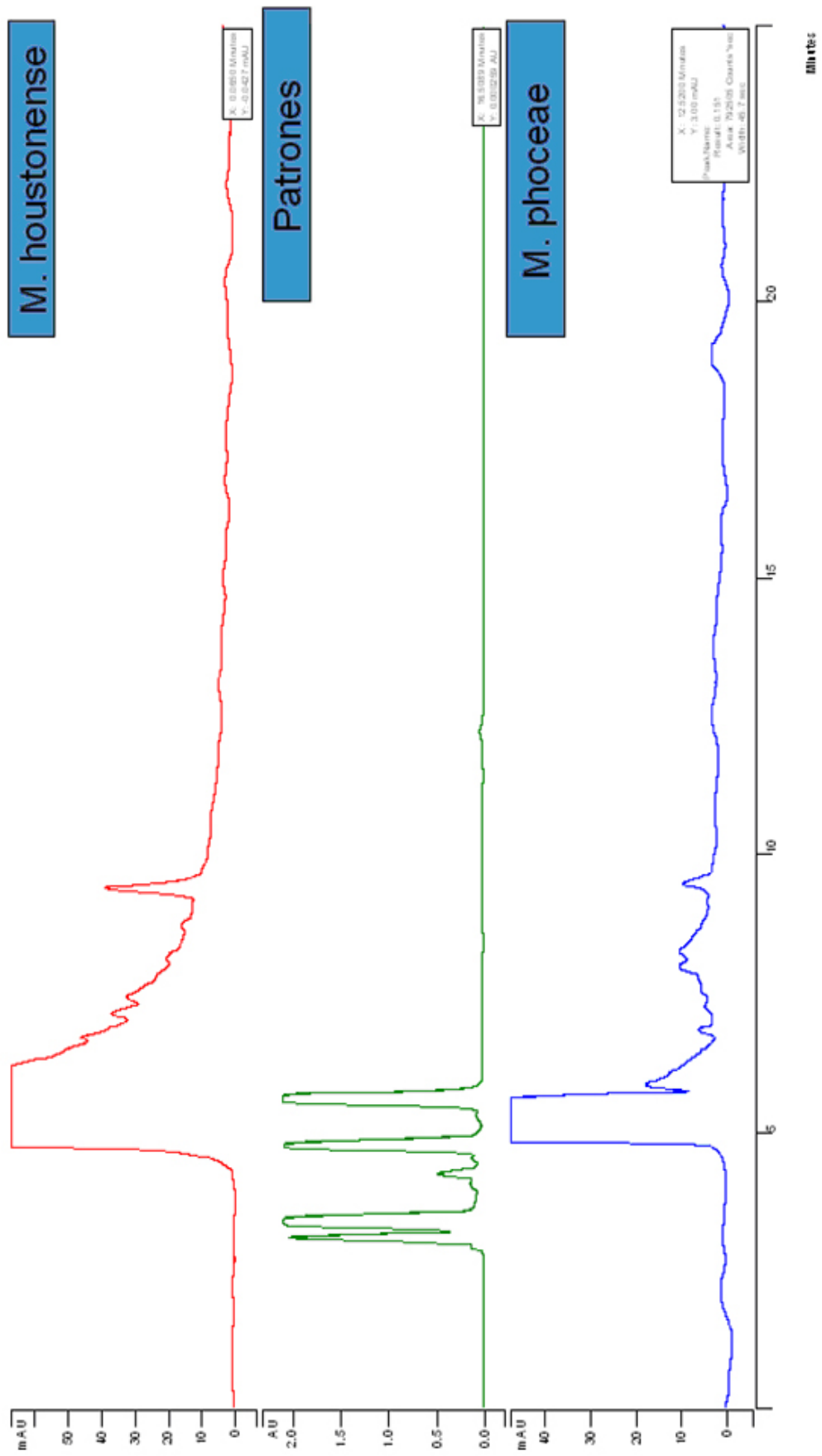
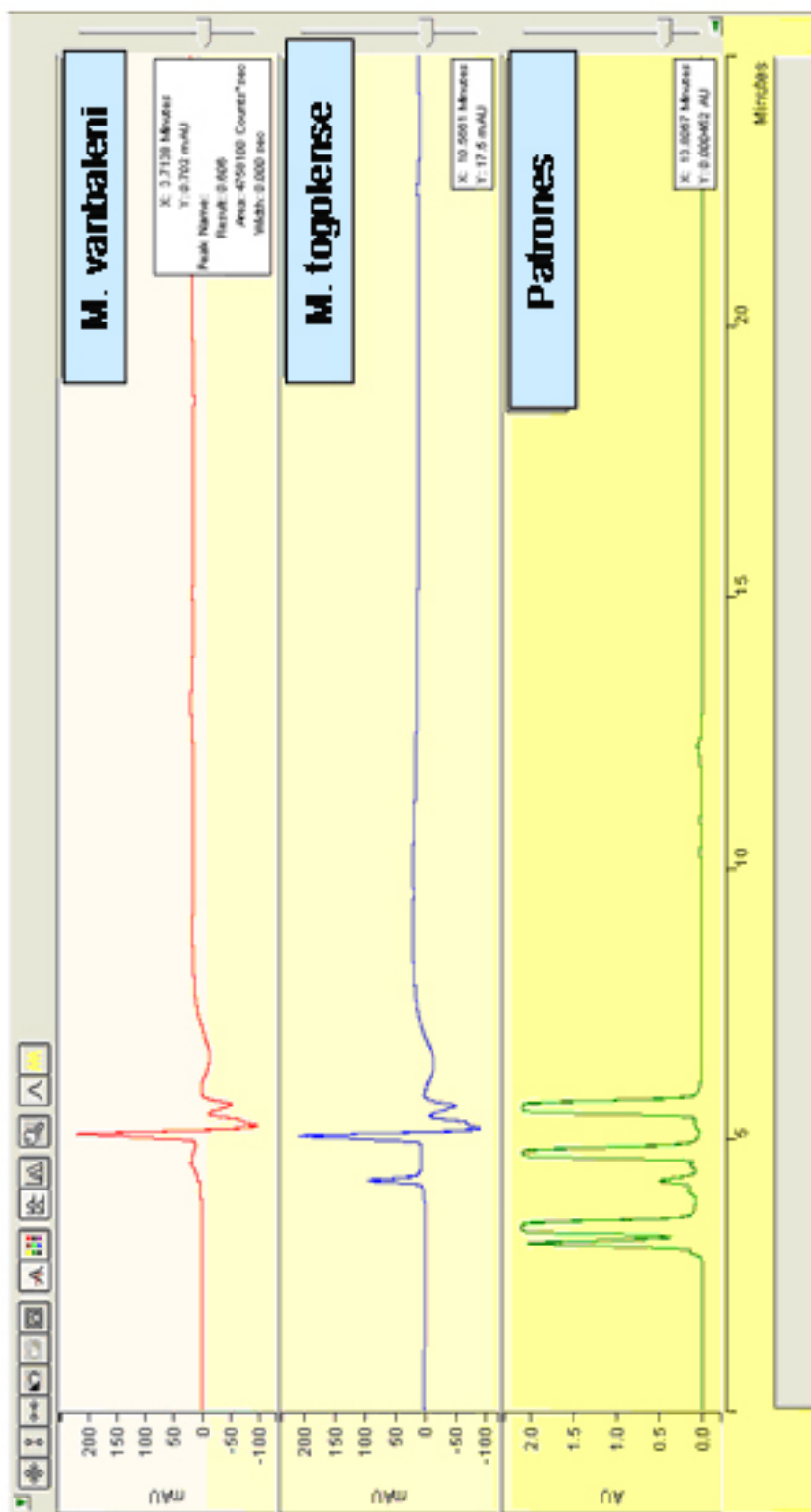


Fig. 70

En estas muestras se aprecia de nuevo la aparición de pequeñas cantidades de Fitomenaquinona K-1 y se utilizarán para realizar su aislamiento por cromatografía HPLC semipreparativa con objeto de confirmar la presencia de este compuesto por resonancia magnética nuclear (RMN)

Se quiso comprobar que el sistema de extracción era el correcto, cromatografiando la fase acuosa de algunos extractos de micobacterias que habían mostrado la presencia de Fitomenaquinona K1. Los resultados experimentales se exponen a continuación.



**Extractos acuosos, enero 2008**

Fig. 71



Como se puede apreciar, no se extraen menaquinonas en los extractos acuosos de las micobacterias sometidas a extracción.

#### 4.4.3.-Cromatografía gaseosa de las muestras.

Al igual que se ha realizado con anterioridad, las muestras bacterianas se sometieron a cromatografía gaseosa con detector de masas y resultado negativo.

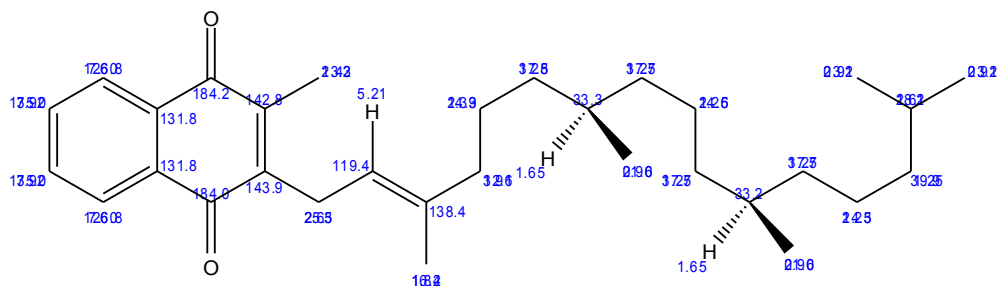
Se utilizó una columna V-5 de 30 metros de longitud, 0,25 metros de diámetro y 0,25micras de película, con un inyector a 250°C y rampa de temperaturas de 40-300 °C a razón de un gradiente de 10°C/minuto. El detector según se ha especificado era de masas.

Los resultados fueron adversos en todos los casos ensayados, lo que pone de manifiesto que esta técnica no es la adecuada para el análisis químico de quinonas en Micobacterias.

## 5.1.- Predicción de los espectros rmn de los productos.-

ChemNMR  $^{13}\text{C}$  Estimation

ChemNMR  $^1\text{H}$  Estimation



Estimation quality is indicated by color: good, medium, rough

Fig. 72

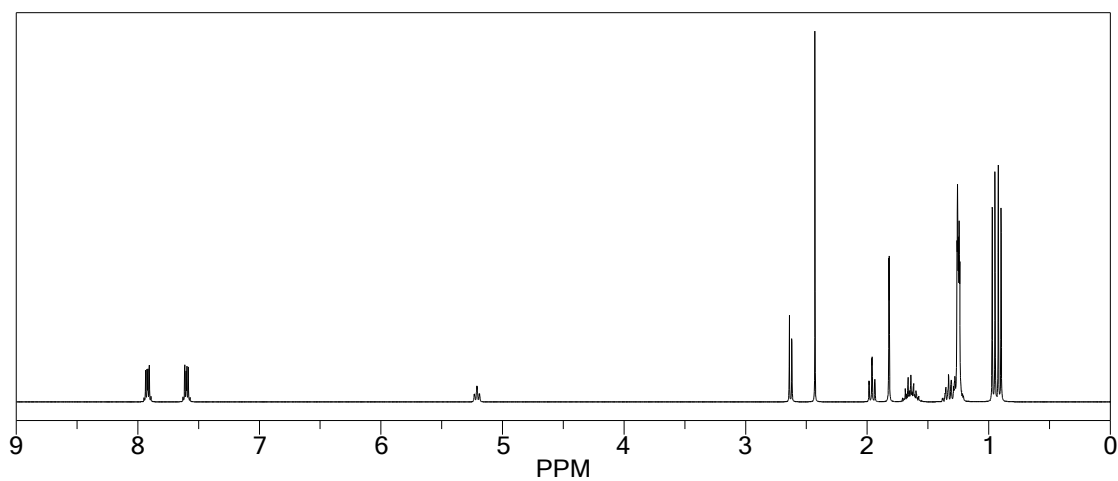


Fig. 73

Estimation quality is indicated by color: good, medium, rough

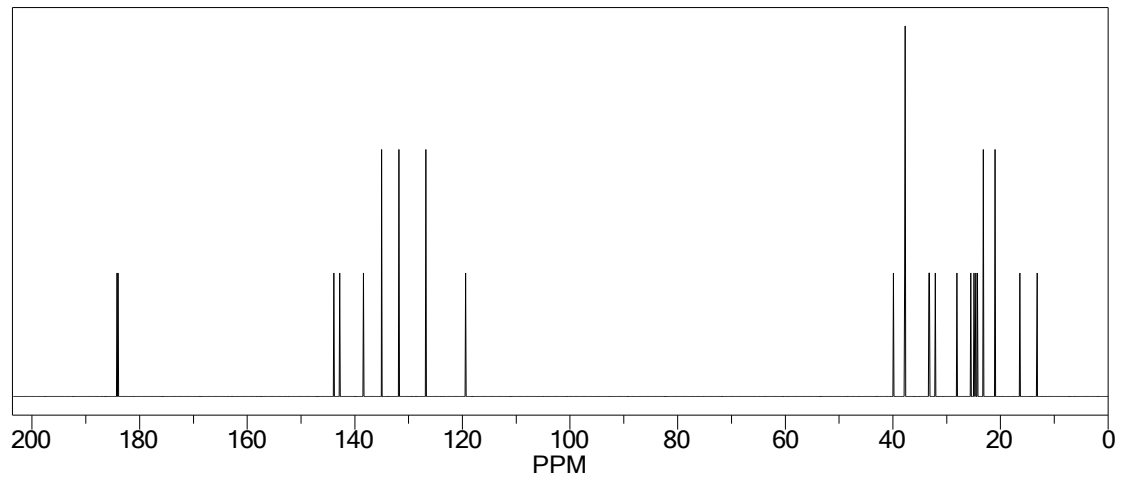


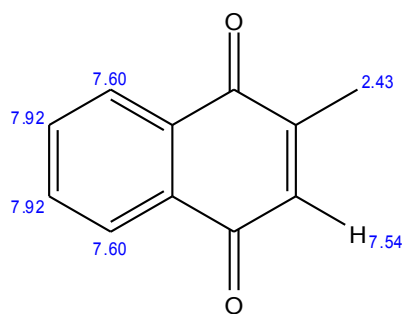
Fig. 74

Protocol of the H-1 NMR Prediction:

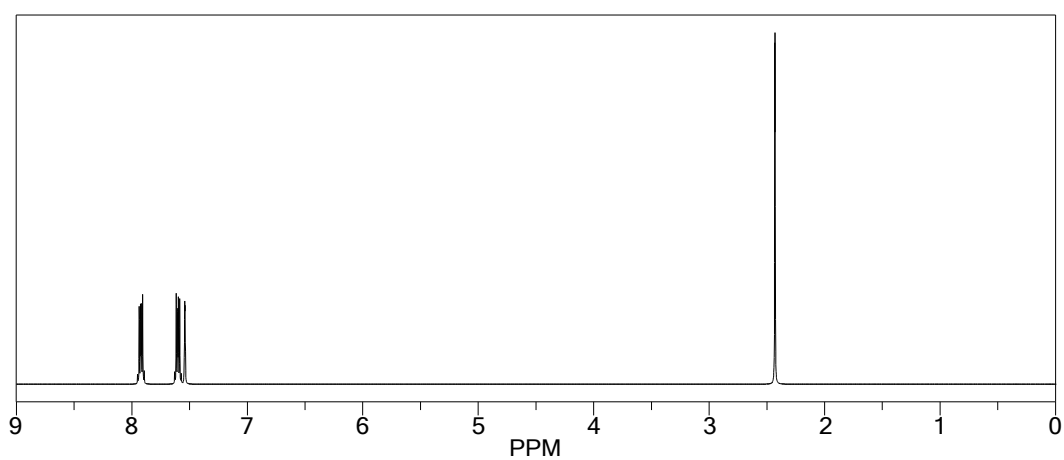
Node	Shift	Base + Inc.	Comment (ppm rel. to TMS)
CH	7,60	7,26	1-benzene
		0,55	1 -C=O
		0,19	1 -C=O
		-0,40	general corrections
CH	7,60	7,26	1-benzene
		0,19	1 -C=O
		0,55	1 -C=O
		-0,40	general corrections
CH	7,92	7,26	1-benzene
		0,19	1 -C=O
		0,28	1 -C=O
		0,19	general corrections
CH	7,92	7,26	1-benzene
		0,28	1 -C=O
		0,19	1 -C=O
		0,19	general corrections
CH2	2,63	1,37	methylene
		1,26	2 alpha -C=C
CH3	2,43	0,86	methyl
		1,07	1 alpha -C(C(=O)R)=C
		0,50	general corrections
CH	1,62	1,50	methine
		0,34	2 alpha -C
		-0,01	1 beta -C
		-0,21	general corrections
CH2	1,96	1,37	methylene
		0,63	1 alpha -C=C
		-0,04	1 beta -C
CH2	1,25	1,37	methylene
		-0,08	2 beta -C
		-0,04	1 beta -C
CH2	1,25	1,37	methylene
		-0,08	2 beta -C
		-0,04	1 beta -C
CH2	1,25	1,37	methylene
		-0,08	2 beta -C
		-0,04	1 beta -C
CH2	1,25	1,37	methylene
		-0,08	2 beta -C
		-0,04	1 beta -C
CH2	1,33	1,37	methylene
		0,00	1 beta -C=C
		-0,04	1 beta -C
CH2	1,25	1,37	methylene
		-0,04	1 beta -C
		-0,04	1 beta -C
		-0,04	general corrections
CH2	1,25	1,37	methylene
		-0,04	1 beta -C
		-0,04	1 beta -C
		-0,04	general corrections
CH3	1,82	0,86	methyl
		0,85	1 alpha -C=C
		0,11	general corrections
CH3	0,96	0,86	methyl
		0,20	2 beta -C-R
		-0,10	general corrections
CH3	0,96	0,86	methyl
		0,20	2 beta -C-R
		-0,10	general corrections
CH3	0,91	0,86	methyl
		0,10	1 beta -C-R
		0,05	1 beta -C
		-0,10	general corrections
CH3	0,91	0,86	methyl
		0,10	1 beta -C-R
		0,05	1 beta -C
		-0,10	general corrections
H	1,65	1,50	methine
		0,17	1 alpha -C
		-0,01	1 beta -C
		-0,01	1 beta -C
H	1,65	1,50	methine
		0,17	1 alpha -C
		-0,01	1 beta -C
		-0,01	1 beta -C
H	5,21	5,25	1-ethylene
		-0,50	2 -C c + t
		0,46	1 -CC=C gem

Tabla 13

## ChemNMR <sup>1</sup>H Estimation



Estimation quality is indicated by color: **good**, **medium**, **rough**

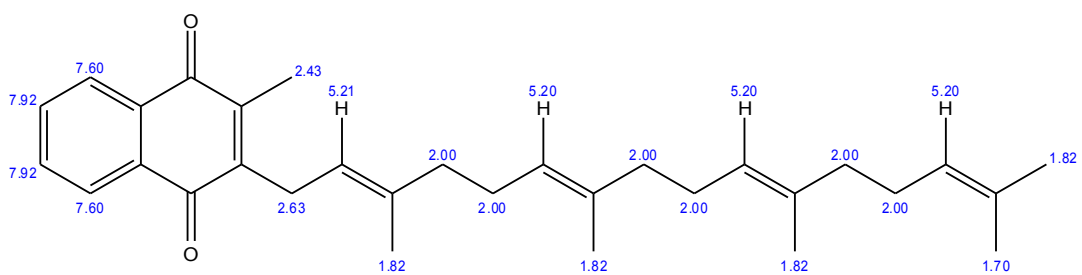


Protocol of the H-1 NMR Prediction:

Node	Shift	Base + Inc.	Comment (ppm rel. to TMS)
CH	7,60	7,26	1-benzene
		0,55	1 -C=O
		0,19	1 -C=O
		-0,40	general corrections
CH	7,60	7,26	1-benzene
		0,19	1 -C=O
		0,55	1 -C=O
		-0,40	general corrections
CH	7,92	7,26	1-benzene
		0,19	1 -C=O
		0,28	1 -C=O
		0,19	general corrections
CH	7,92	7,26	1-benzene
		0,28	1 -C=O
		0,19	1 -C=O
		0,19	general corrections
CH3	2,43	0,86	methyl
		1,07	1 alpha -C(C(=O)R)=C
		0,50	general corrections
H	7,54	5,25	1-ethylene
		0,56	1 -C(=O)-1:C*C*C*C*C*1 trans
		-0,22	1 -C cis
		1,95	1 -C(=O)-1:C*C*C*C*C*1 gem

Fig. 74 y Tabla 14

### ChemNMR <sup>1</sup>H Estimation



Estimation quality is indicated by color: good, medium, rough

Fig. 75

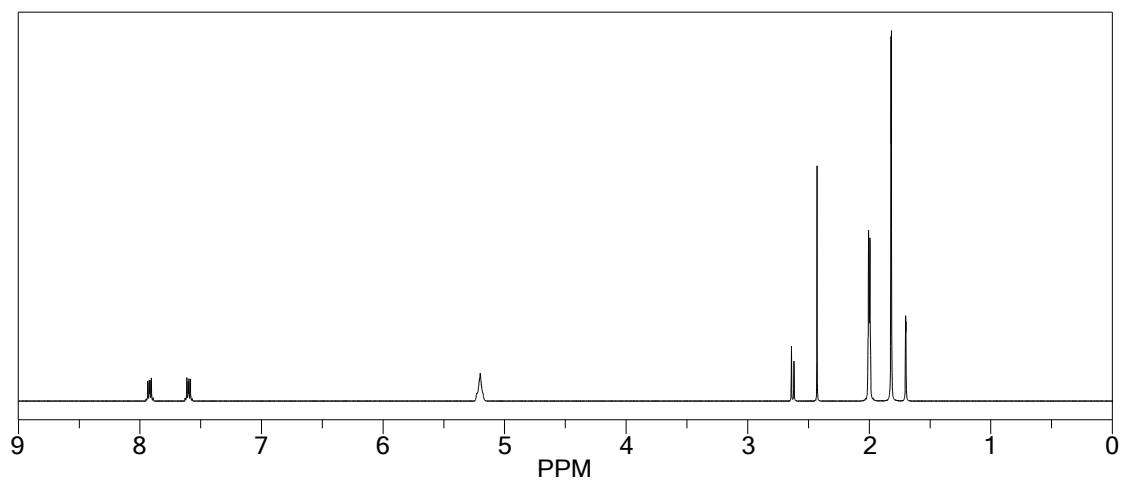
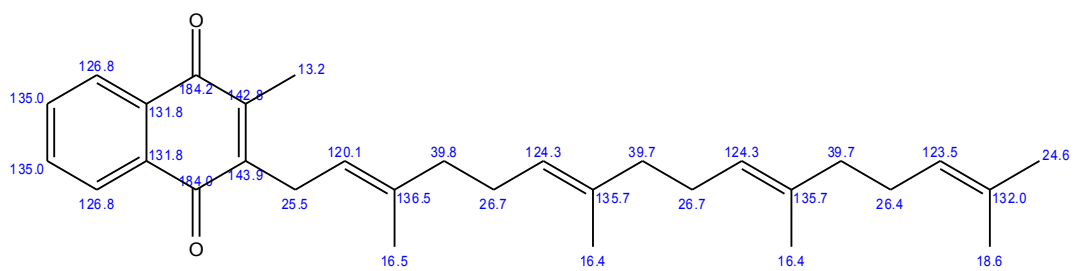


Fig. 76

# ChemNMR $^{13}\text{C}$ Estimation



Estimation quality is indicated by color: good, medium, rough

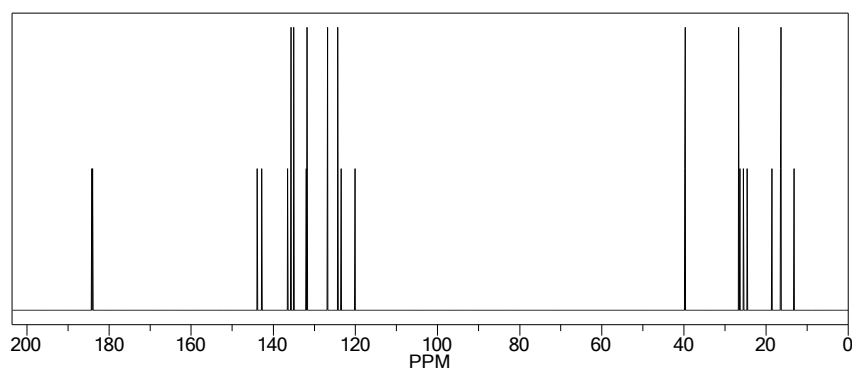


Fig. 77

Protocol of the H-1 NMR Prediction:

Node	Shift	Base + Inc.	Comment (ppm rel. to TMS)
CH	7,60	7,26	1-benzene
		0,55	1 -C=O
		0,19	1 -C=O
		-0,40	general corrections
CH	7,60	7,26	1-benzene
		0,19	1 -C=O
		0,55	1 -C=O
		-0,40	general corrections
CH	7,92	7,26	1-benzene
		0,19	1 -C=O
		0,28	1 -C=O
		0,19	general corrections
CH	7,92	7,26	1-benzene
		0,28	1 -C=O
		0,19	1 -C=O
		0,19	general corrections
CH2	2,63	1,37	methylene
		1,26	2 alpha -C=C
CH3	2,43	0,86	methyl
		1,07	1 alpha -C(C(=O)R)=C
		0,50	general corrections
CH2	2,00	1,37	methylene
		0,63	1 alpha -C=C
		0,00	1 beta -C=C
CH2	2,00	1,37	methylene
		0,63	1 alpha -C=C
		0,00	1 beta -C=C
CH2	2,00	1,37	methylene
		0,63	1 alpha -C=C
		0,00	1 beta -C=C
CH2	2,00	1,37	methylene
		0,63	1 alpha -C=C
		0,00	1 beta -C=C
CH2	2,00	1,37	methylene
		0,63	1 alpha -C=C
		0,00	1 beta -C=C
CH2	2,00	1,37	methylene
		0,63	1 alpha -C=C
		0,00	1 beta -C=C
CH3	1,82	0,86	methyl
		0,85	1 alpha -C=C
		0,11	general corrections
CH3	1,82	0,86	methyl
		0,85	1 alpha -C=C
		0,11	general corrections
CH3	1,82	0,86	methyl
		0,85	1 alpha -C=C
		0,11	general corrections
CH3	1,82	0,86	methyl
		0,85	1 alpha -C=C
		0,11	general corrections
CH3	1,70	0,86	methyl
		0,85	1 alpha -C=C
		-0,01	general corrections
H	5,21	5,25	1-ethylene
		-0,50	2 -C c + t
		0,46	1 -CC=C gem
H	5,20	5,25	1-ethylene
		-0,50	2 -C c + t
		0,45	1 -C gem
H	5,20	5,25	1-ethylene
		-0,50	2 -C c + t
		0,45	1 -C gem
H	5,20	5,25	1-ethylene
		-0,50	2 -C c + t
		0,45	1 -C gem

Tabla 15



## 5.2.- Resultados experimentales de RMN de las cepas analizadas.

Para comprobar finalmente que los resultados obtenidos en cromatografía eran coherentes y tener la seguridad evidenciada por otra técnica físico-química alternativa de la existencia de menaquinonas en las cepas estudiadas, se sometieron algunas de ellas a la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) tanto de Carbono como de protones.

El aparato utilizado fue un Innova de 400 Mhz de la casa Varian perteneciente a los Servicios Centrales de la Universidad de Cádiz.

En primer lugar se le hizo dicho espectro a la fitomenaquinona (K1) por ambas técnicas.

El resultado experimental obtenido por la técnica del carbono, se muestra en la figura 78 en la que se aprecia que a 184 y 185 ppm aparecen los carbonos carbonílicos aromáticos de las naftoquinonas. En la zona central del espectro los correspondientes a carbonos aromáticos y dobles enlaces (110-130 ppm.) y en la parte final del espectro los carbonos saturados.

Esta técnica se realizó con el patrón de fitomenaquinona K1, pero no se aplicó a las fracciones separadas por HPLC preparativa, al requerirse cantidades superiores en peso a las obtenidas por esta técnica tras reiteradas inyecciones del extracto en el cromatógrafo.

K1- carbonio  
Archive directory: /export/home/ale1o/vnmrSYS/data  
Sample directory:  
File: CARBON  
Pulse Sequence: s2pu1

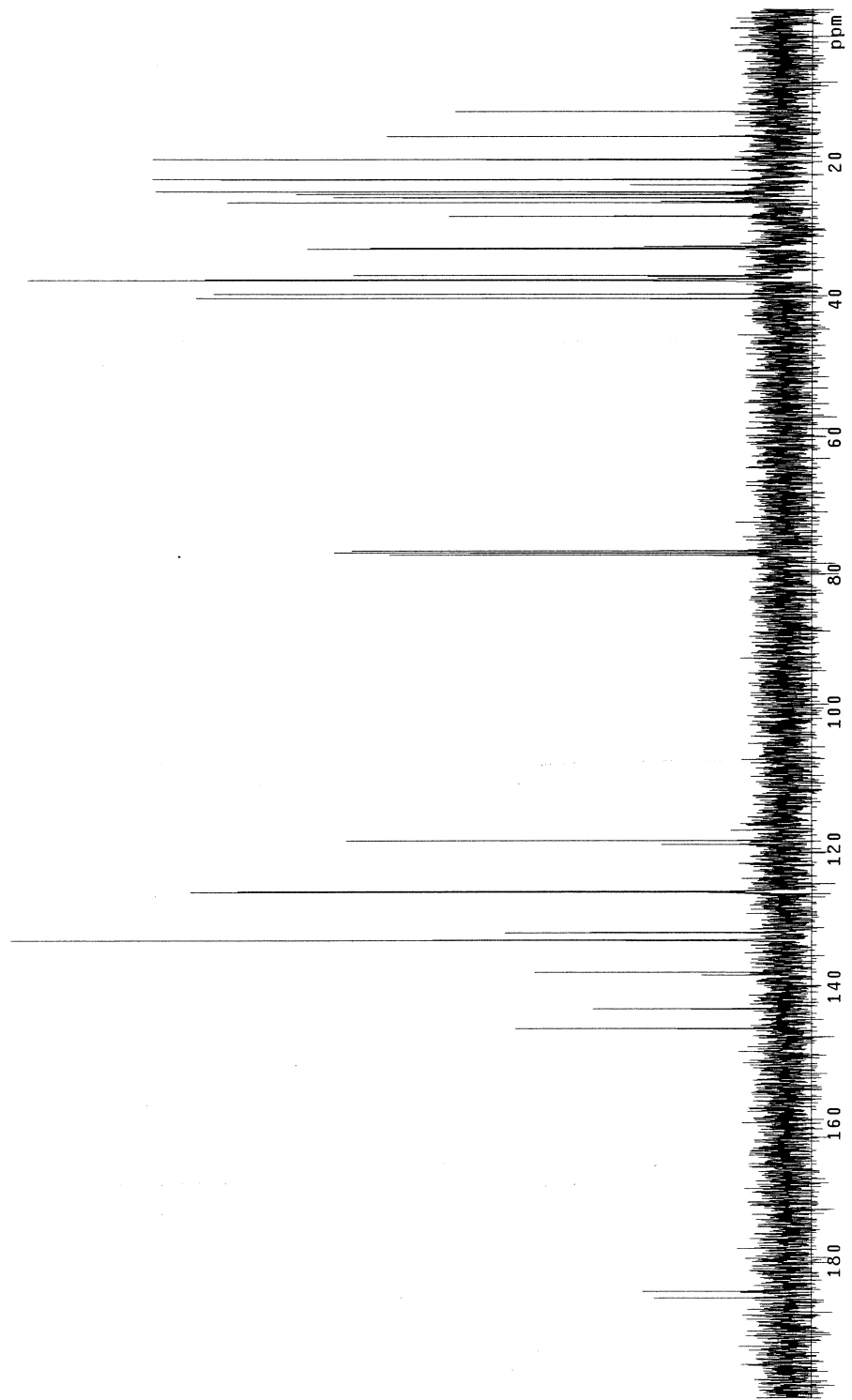


Fig. 78

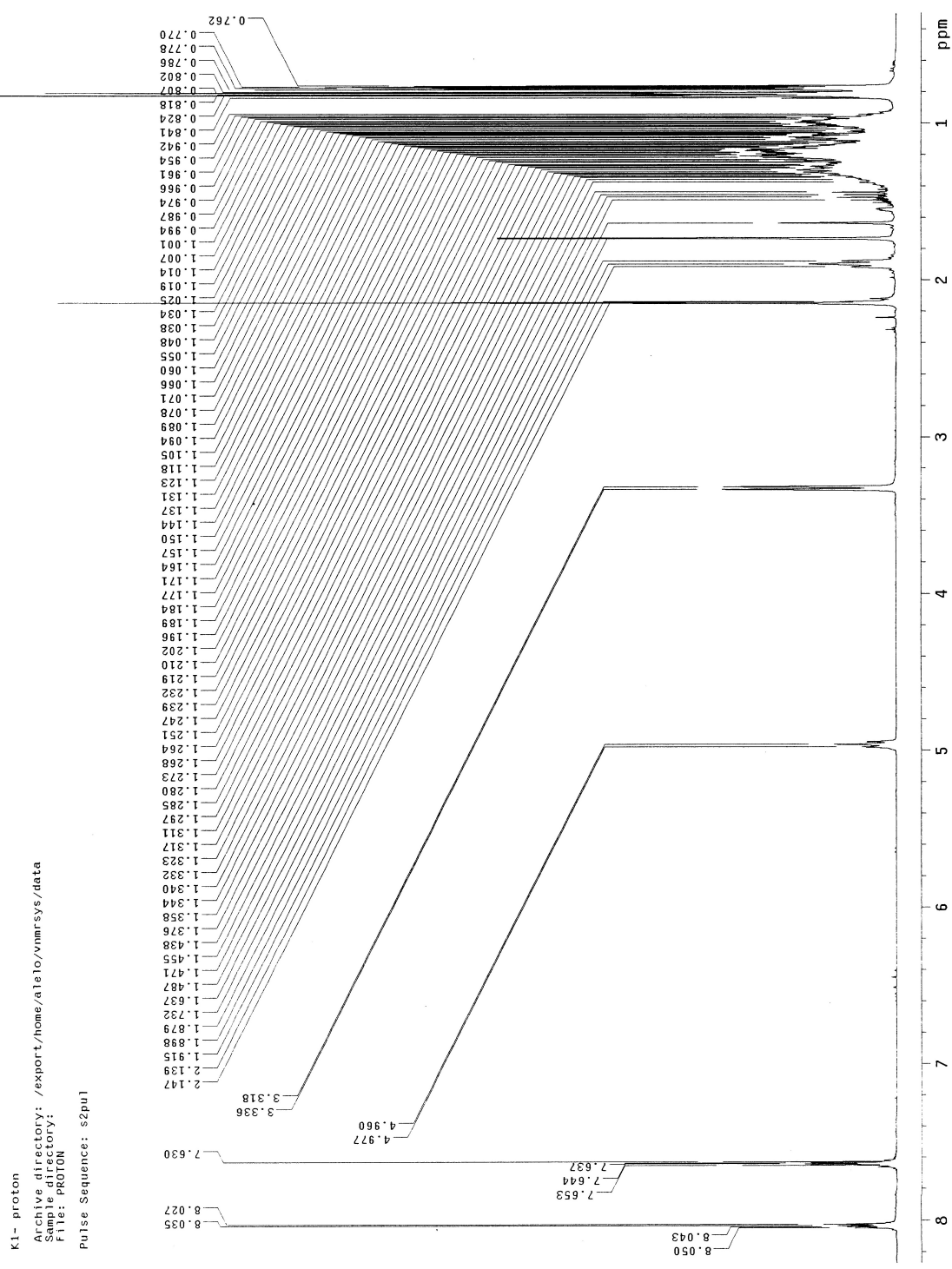


Fig. 79

K1- proton  
Archive directory: /export/home/aleto/vnmrsys/data  
Sample directory:  
File: PROTON  
Pulse Sequence: s2pu1

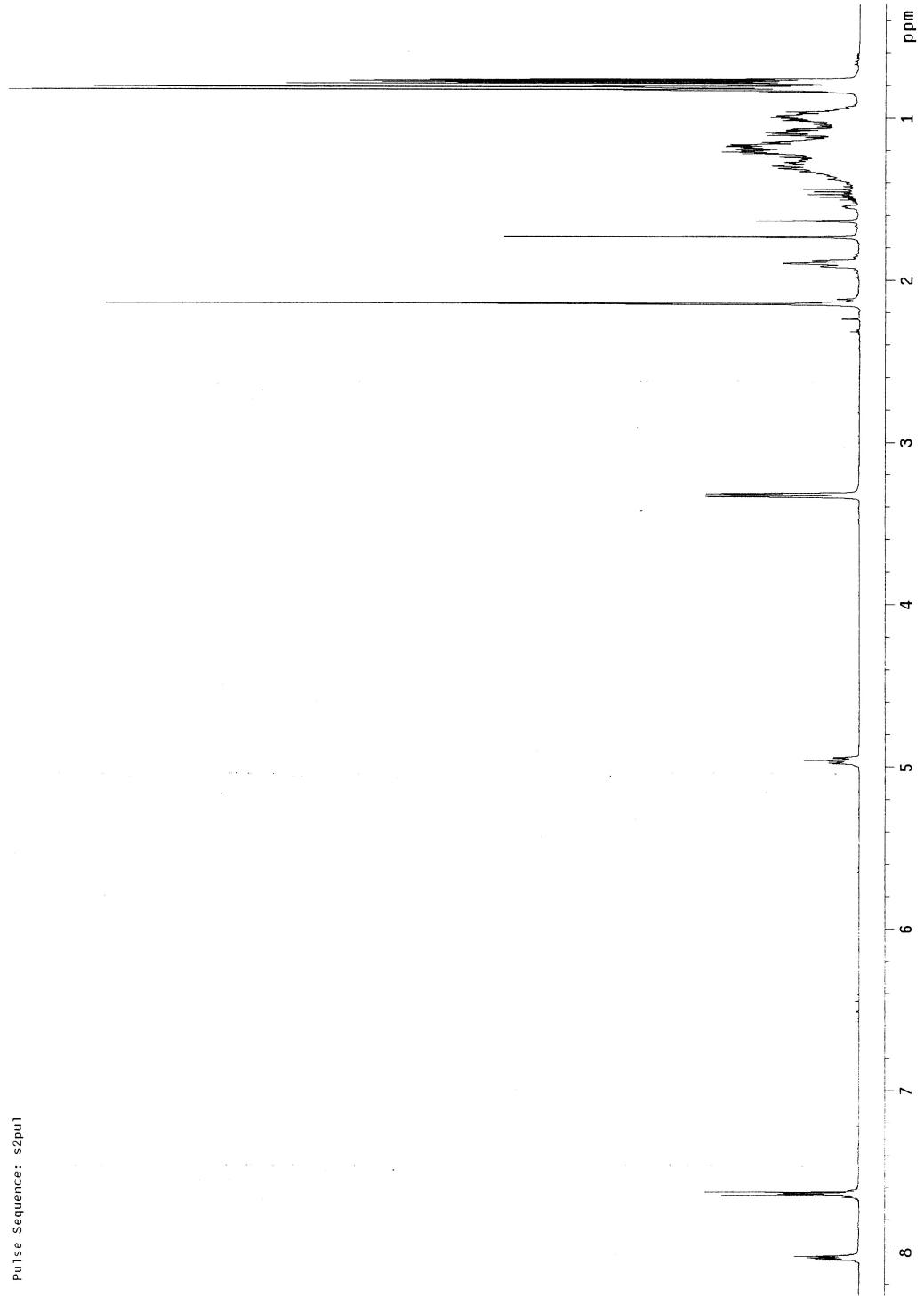


Fig. 80

Fig. 81

A continuación se realizó la Resonancia Magnética Nuclear de protones (RMNH) al patrón de fitomenaquinona que queda reflejado en las figuras 79 y 80.

Como se puede apreciar, en la zona terminal del espectro a 7,6 y a 8 ppm, aparecen los protones aromáticos, a 5 ppm los protones olefínicos, a 3,3 ppm los primeros protones de la cadena de fitilo que están muy desapantallados al estar situados en una posición alílica con relación a los dos dobles enlaces que están anejos, todo esto influido además por un carbonilo de la naftoquinona que está del mismo lado estérico.

A 2,2 ppm resuenan los protones del metilo situado en posición 2.

Finalmente a 1,7 ppm aparecen los protones del metilo que está situado sobre el doble enlace del isopreno y a 0,9 ppm los otros metilos de la cadena saturada.

Para comprobar que nuestros asertos acerca de la fitomenaquinona K1 presente en las cepas estudiadas eran ciertas, una de ellas, concretamente *Mycobacterium vanbaalenii*, se sometió a esta técnica. Para ello previamente se intentó por todos los medios obtener una cantidad apreciable de esta bacteria a través de reiterados cultivos acumulativos. Con posterioridad se extrajeron las menaquinonas por el método descrito y se separó la fracción correspondiente a la fitomenaquinona K1 por HPLC preparativa, recogiendo esta fracción a mano en un erlenmeyer, cuando se corría la muestra por la citada técnica. Se realizó reiteradas veces dicha operación al objeto de tener una cantidad mínima que pudiese ser usada para la técnica de RMNH.

Se procedió con esta muestra a realizarle el espectro de protón tras 1024 acumulaciones durante un tiempo de 50 minutos (Fig. 81).

## **6. RESULTADOS EXPERIMENTALES DE ESPECTROSCOPIA UV-V Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN LAS CEPAS ANALIZADAS.**

Se sometieron todas las cepas en estudio a la espectroscopia UV-V y espectrometría de masas al objeto de ver los máximos de absorción a diferentes longitudes de onda, así como los fraccionamientos moleculares de las diferentes quinonas, en el caso de existir, para la posterior dilucidación de estructuras.

Los espectros UV-Vis, se llevaron a cabo en un espectrofotómetro AGILENT-5244.

Los espectros de masas se llvaron a cabo en los Servicios Centrales de la Universidad de Cádiz en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas de Fison, modelo Voyager a través de inserción directa con sondas de sólidos.

El rango teórico de detección de unidedes de masa atómica es de hasta 1022, aunque el rango real es de hasta 650 uma.

Como resumen de las estructuras quinónicas, a fin de facilitar su comprensión de manera resumida, podemos decir que la fitomenaquinona K-1, es la estructura que posee cuatro instauraciones, en el segundo, tercero y cuarto isopreno y se expresa de manera abreviada como MK-4 (II, III, IV-H), siendo la vitamina K-1 que está asociada normalmente a las plantas verdes, de ahí su prefijo "fito", no habiendo sido descrita normalmente como constitutiva de las bacterias. Posee un peso molecular de 450. Su denominación IUPAC es: 2 metil-3fitil-1,4 naftoquinona.

La menaquinona K-2 posee un peso molecular de 444 y no posee saturaciones en las cadenas laterales isoprenílicas. Su denominación IUPAC es:2-metil-farnesil geranil-1,4-naftoquinona.

La menaquinona k-3 es la más sencilla estructuralmente al carecer de cadenas laterales isoprenílicas. Posee un peso molecular de 172 y es la 2-metil-1,4 naftoquinona.

La quinona más frecuentemente encontrada es la MK-9, que posee nueve restos isoprénicos

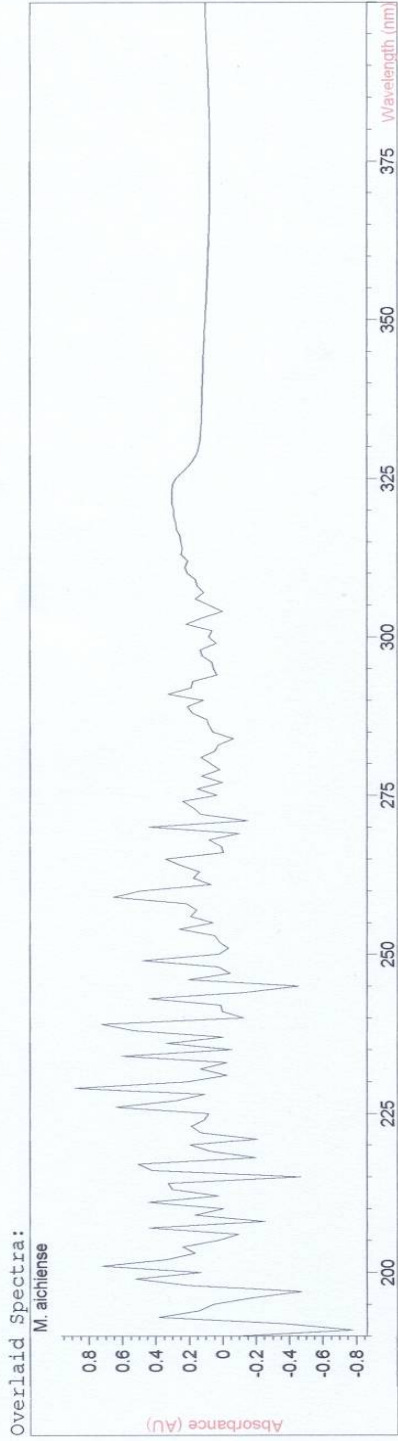
Los resultados experimentales se recogen a continuación, junto con el listado de los picos moleculares:



1.- Mycobacterium aichiense.

=====  
Fixed Wavelength Report  
Date 5/19/2006 Time 12:49:21 Page 1 of 1  
=====

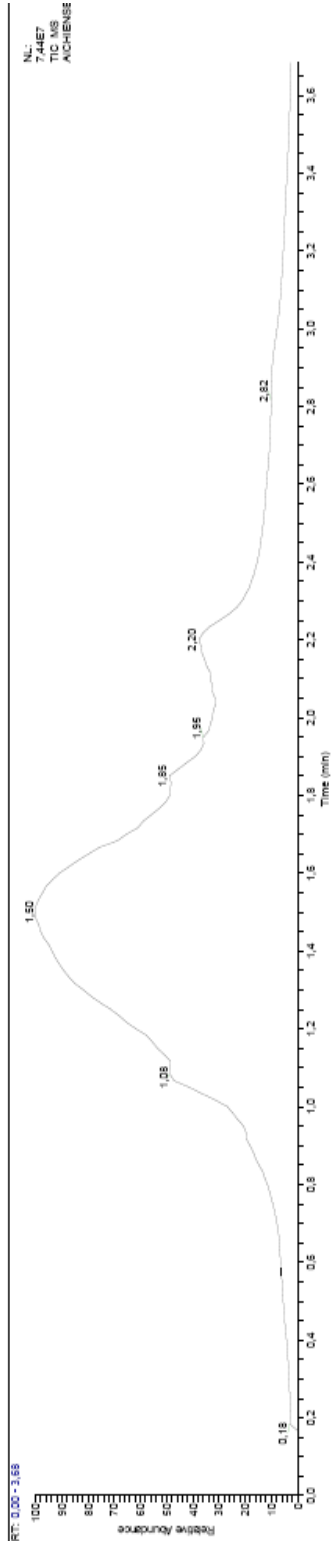
Method file : LOWRY.M ( modified )      Last update: Date 5/19/2006 Time 12:47:38 PM  
Information : Default Method  
Data File : <untitled>



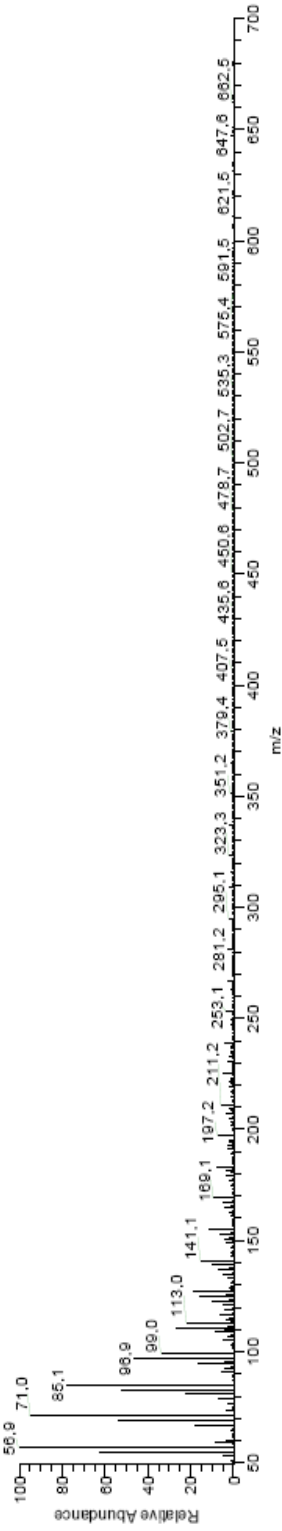
# Name -----  
1 M. aichiense

Report generated by : medicina      Signature: .....

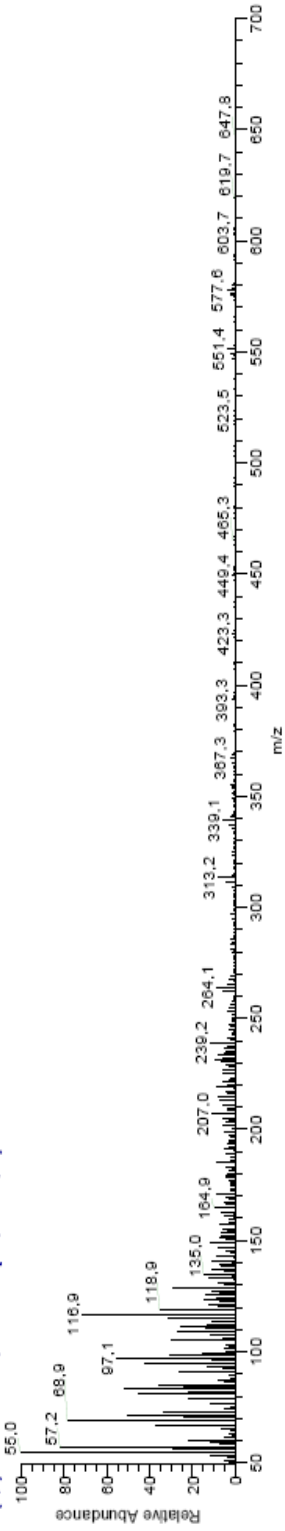
-----  
\*\*\* End Fixed Wavelength Report \*\*\*  
-----



AICHIENSE #78-99 RT: 1.40-1.56 AV: 12 NL: 7.08E9  
T: (0.0) + c EI det=350.00 Full ms [ 50.00-700.00]



AICHIENSE #122-128 RT: 2.13-2.23 AV: 7 NL: 1.33E6  
T: (0.0) + c EI det=350.00 Full ms [ 50.00-700.00]

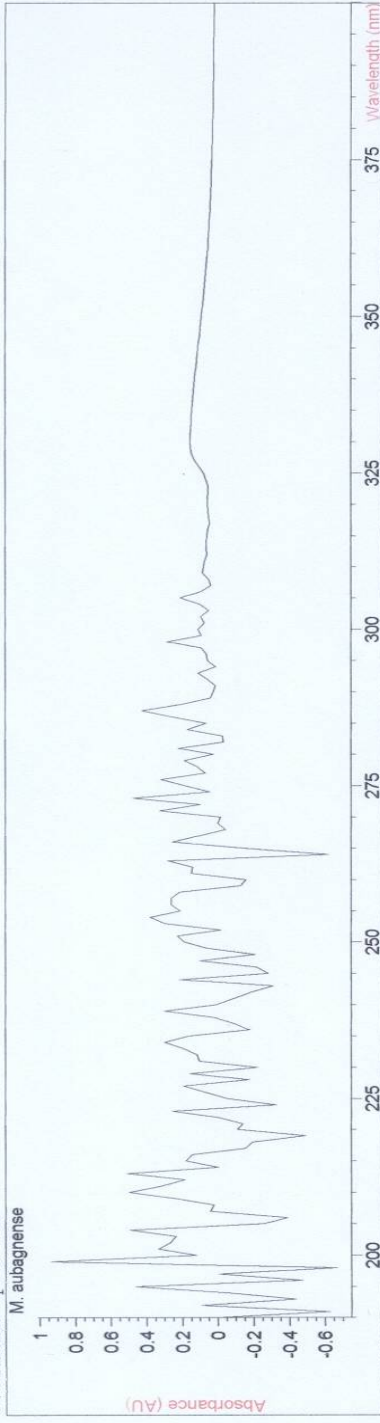


**2. Mycobacterium aubagnense**

=====  
Fixed Wavelength Report  
=====  
Date 7/25/2006 Time 10:10:23 Page 1 of 1  
=====

Method file : LOWRY.M ( modified )    Last update: Date 7/25/2006 Time 9:40:05 AM  
Information :    Default Method  
Data File :    <untitled>

Overlaid Spectra:



# Name

-----  
1 M. aubagnense

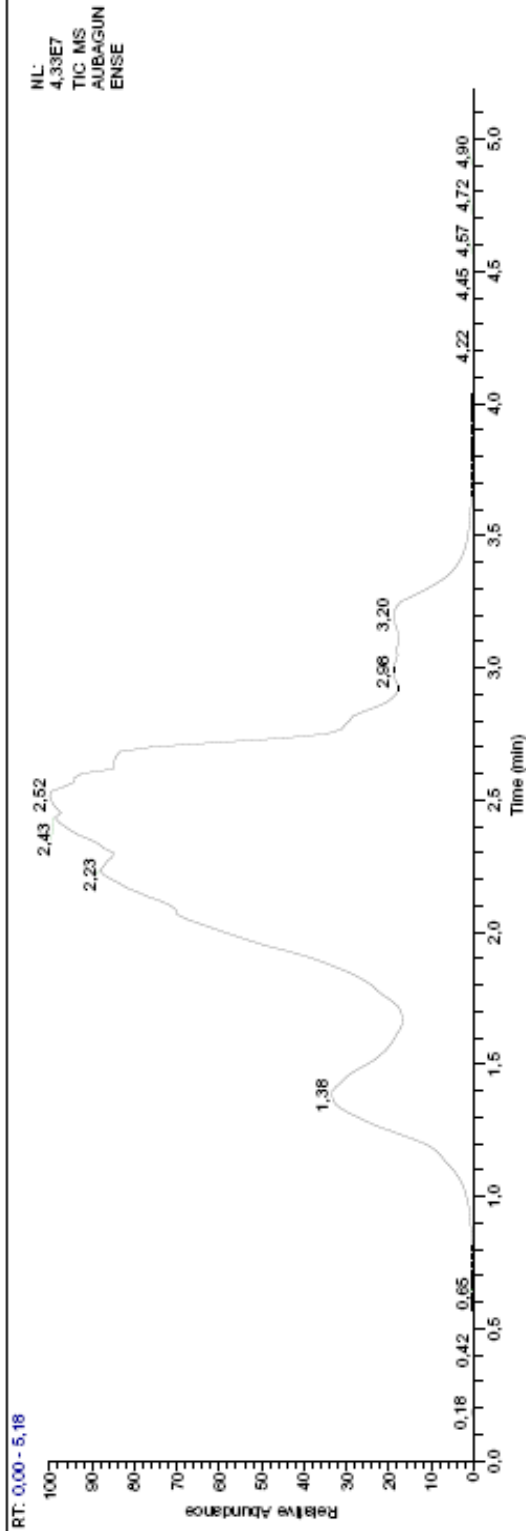
Report generated by : medicina

Signature: .....

\*\*\* End Fixed Wavelength Report \*\*\*

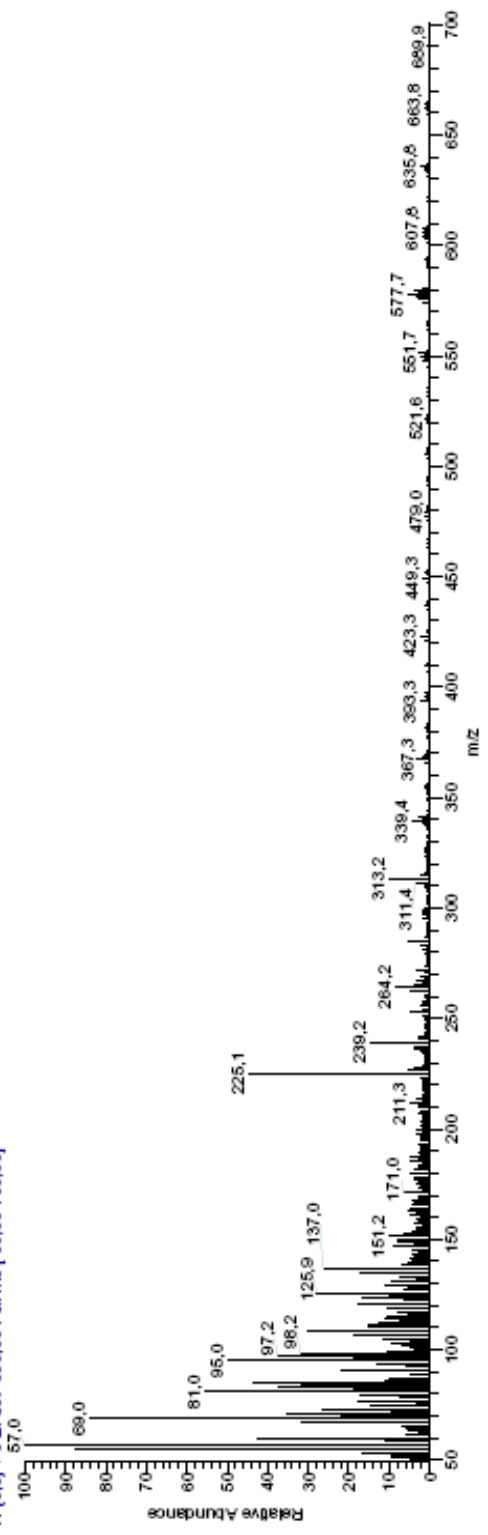
AUBAGUNENSE

21/09/2006 10:55:07

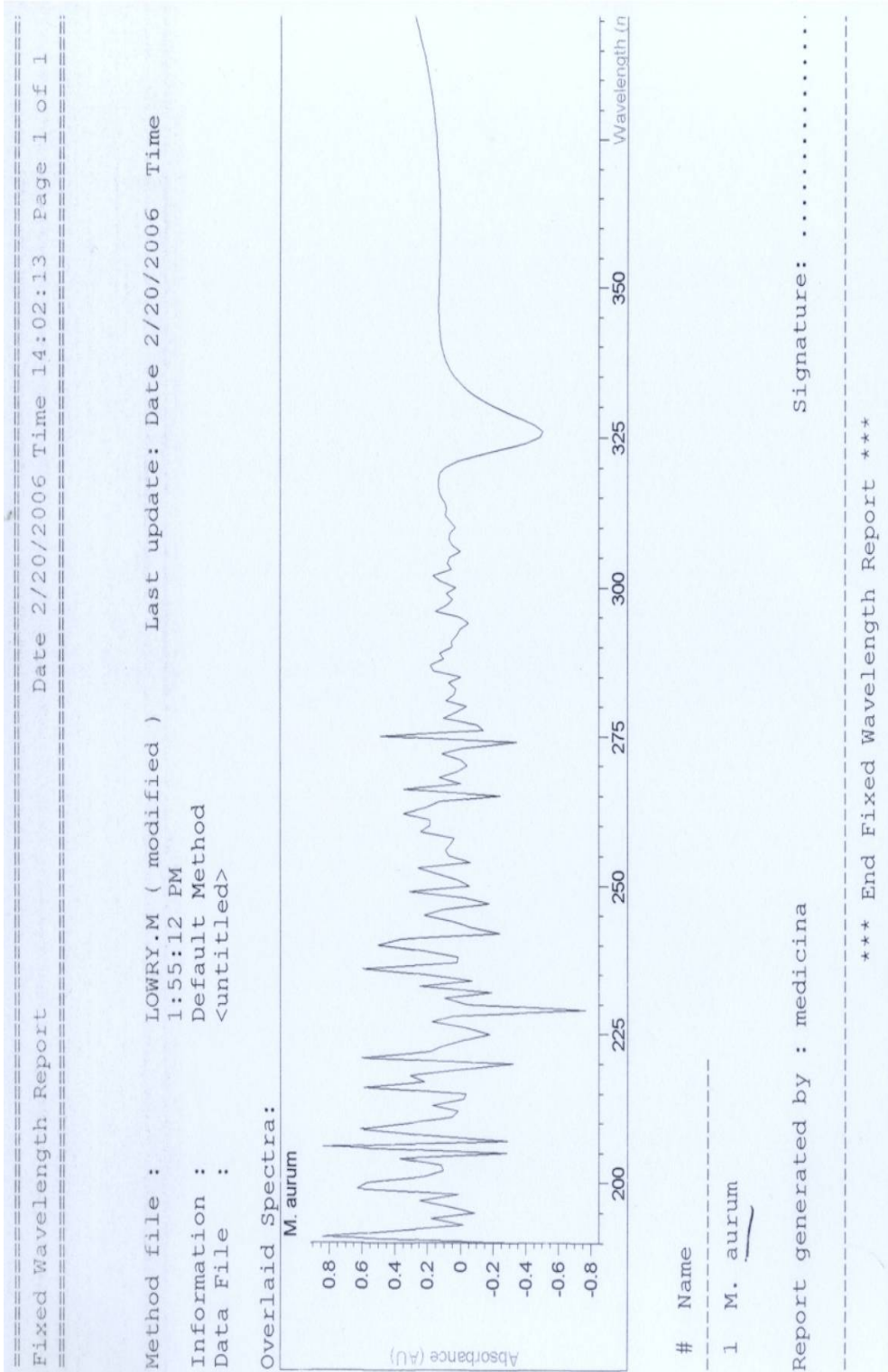


AUBAGUNENSE #130 RT: 2.27 AV: 1 NL: 1.92E6

T: (0:0) + c El del=350,00 Full ms [ 50,00-700,00]



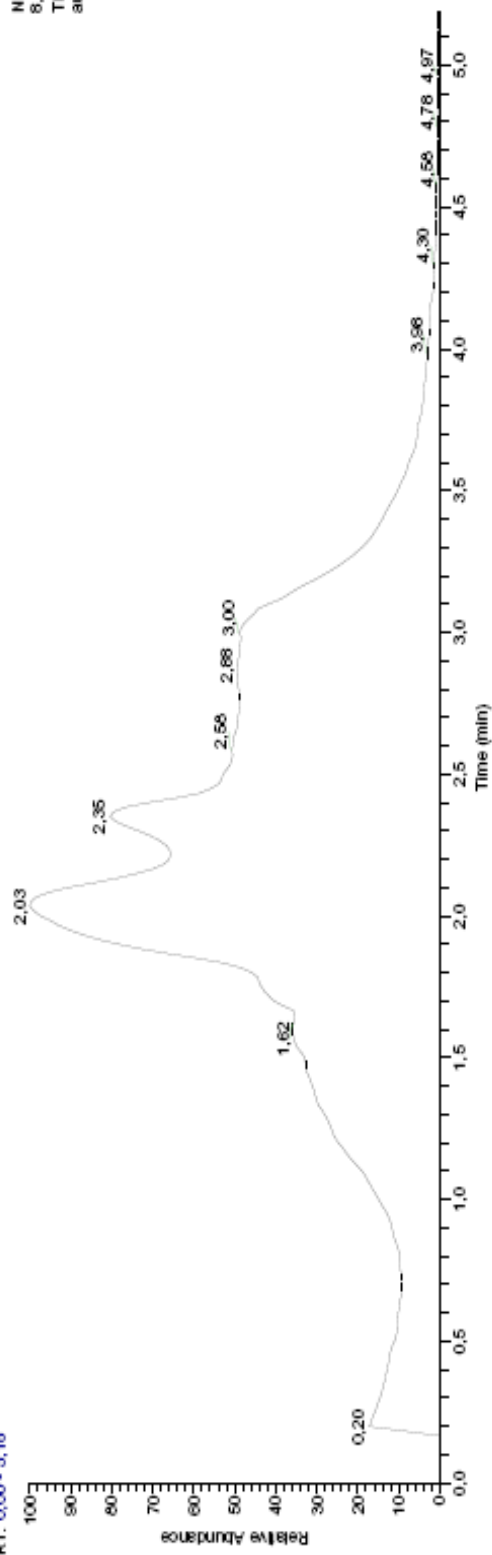
**3.- Mycobacterium aurum.**



\\voxyger\analisis em... \aunum

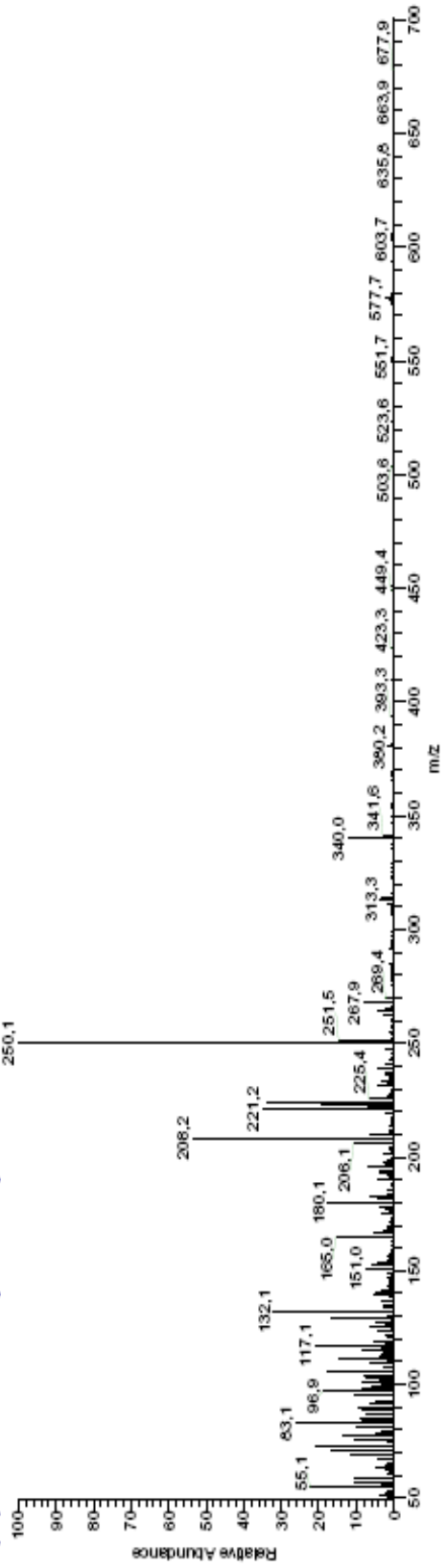
04/12/2006 15:24:00

RT: 0,00 - 5,18



ML:  
8,20E7  
TIC MS  
aunum

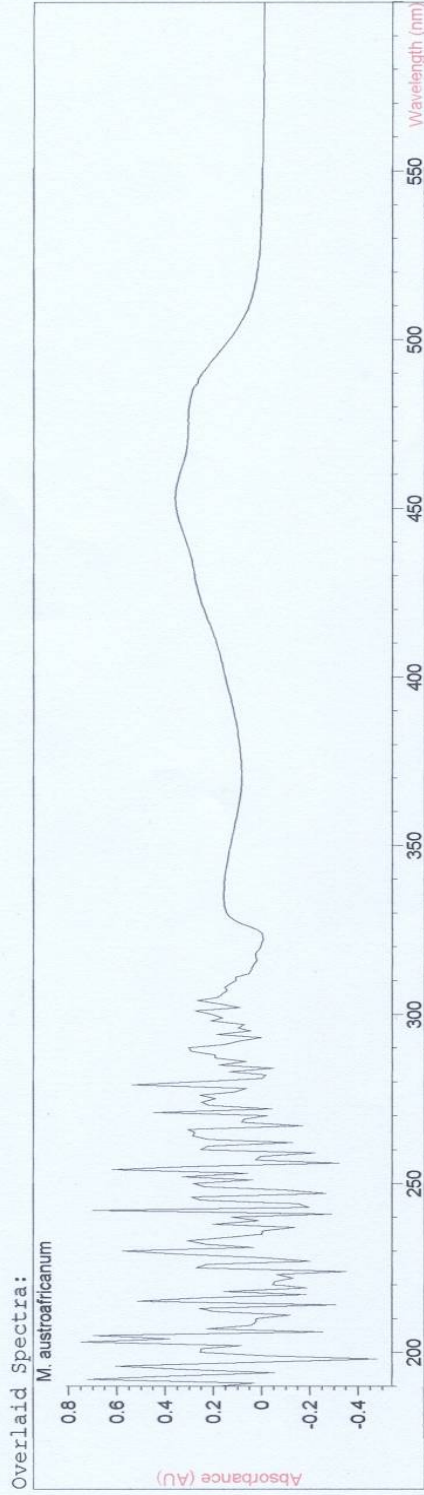
aunum #107-122 RT: 1,89-2,13 AV: 16 NL: 6,A2E6  
T: [0:0] + c EI del=350,00 Full ms [ 50,00-700,00]



**Mycobacterium austroafricanum.**

=====  
Fixed Wavelength Report  
===== Date 5/16/2006 Time 12:47:36 Page 1 of 1  
=====

Method file : LOWRY.M ( modified )      Last update: Date 5/16/2006 Time 12:40:39 PM  
Information : Default Method  
Data File : <untitled>



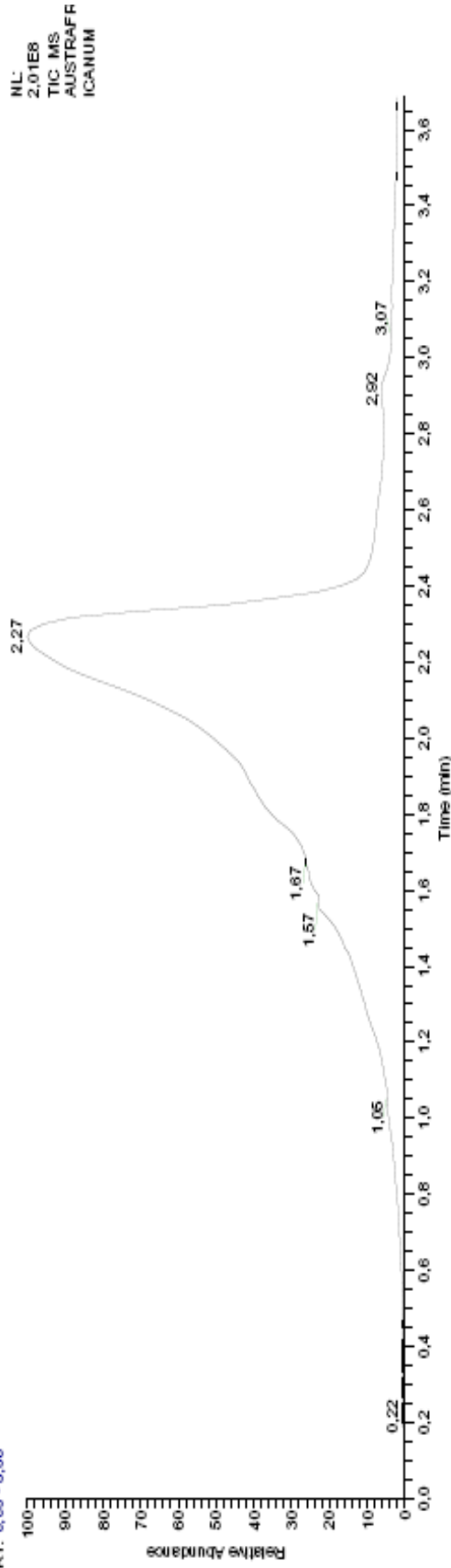
# Name  
-----  
1 M. austroafrican

Report generated by : medicina

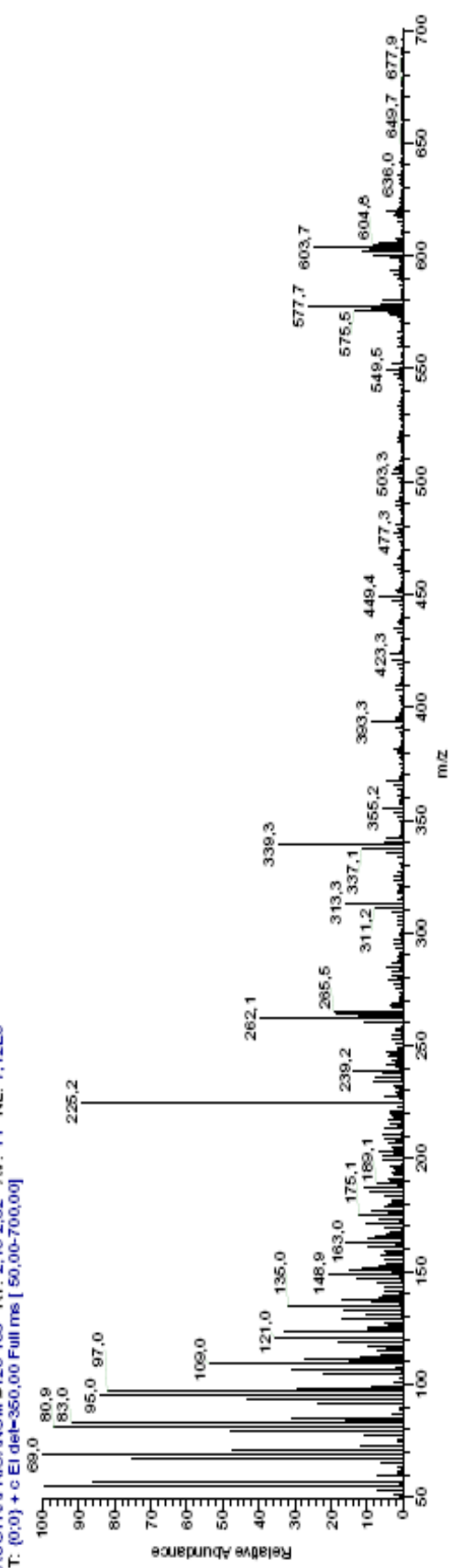
Signature: .....

-----  
\*\*\* End Fixed Wavelength Report \*\*\*  
-----

RT: 0,00 - 3,66



AUSTRAFRICANUM #123-133 RT: 2.15-2.32 AV: 11 NL: 7.12E8

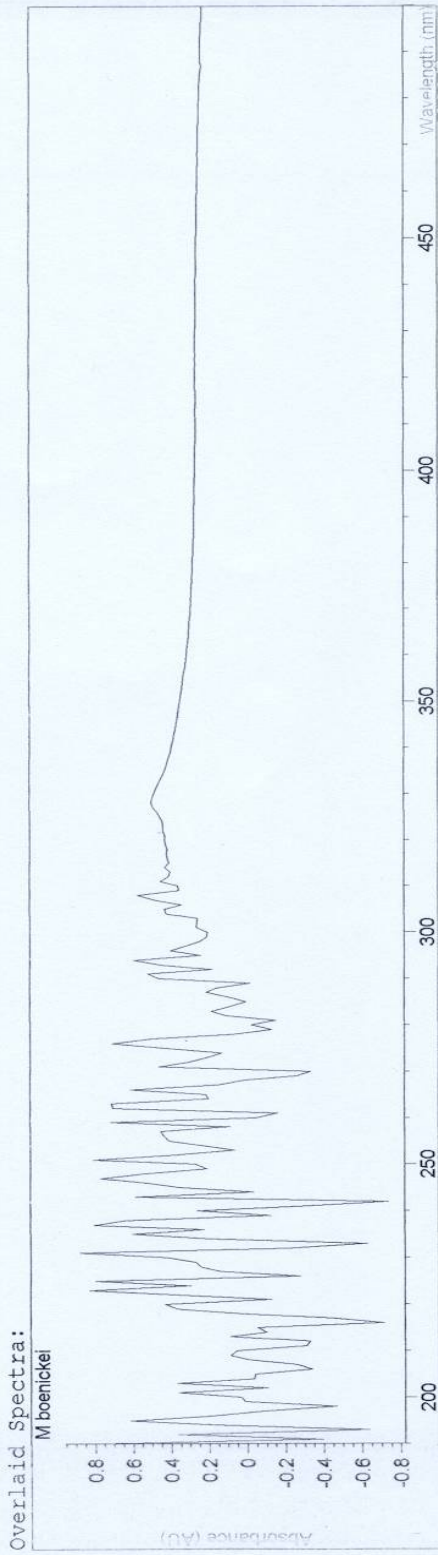




Mycobacterium boenickei.

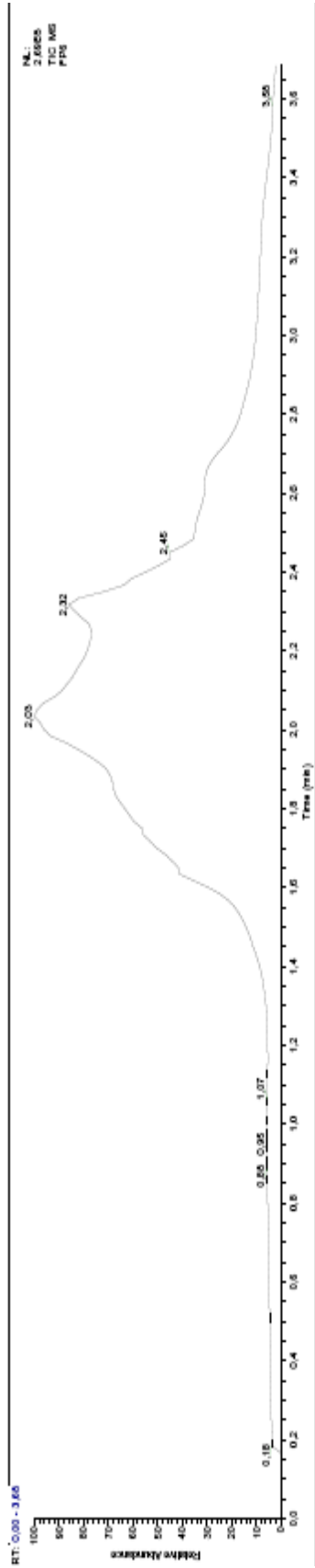
=====  
Fixed Wavelength Report  
=====  
Date 4/7/2006 Time 12:53:58 Page 1 of 1  
=====

Method file : LOWRY.M ( modified )      Last update: Date 4/7/2006 Time 12:49:21 PM  
Information : Default Method  
Data File : <untitled>

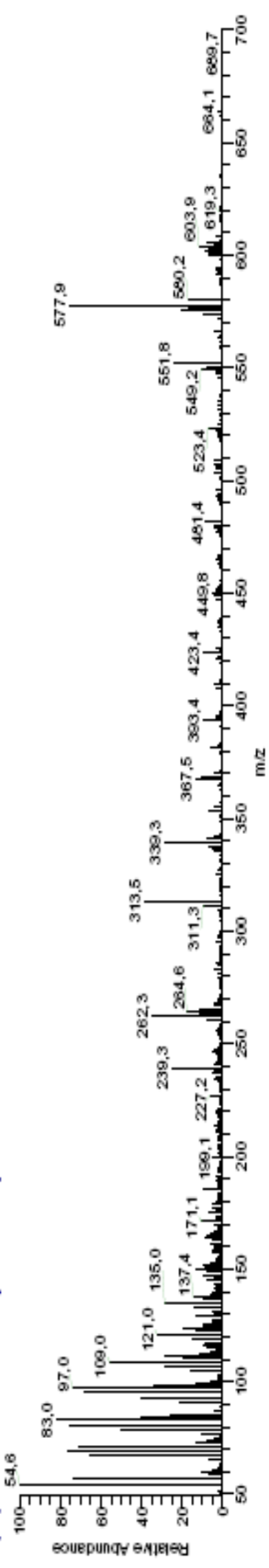


# Name                    Abs<750nm>  
-----  
1 M boenickei            \*\*\*

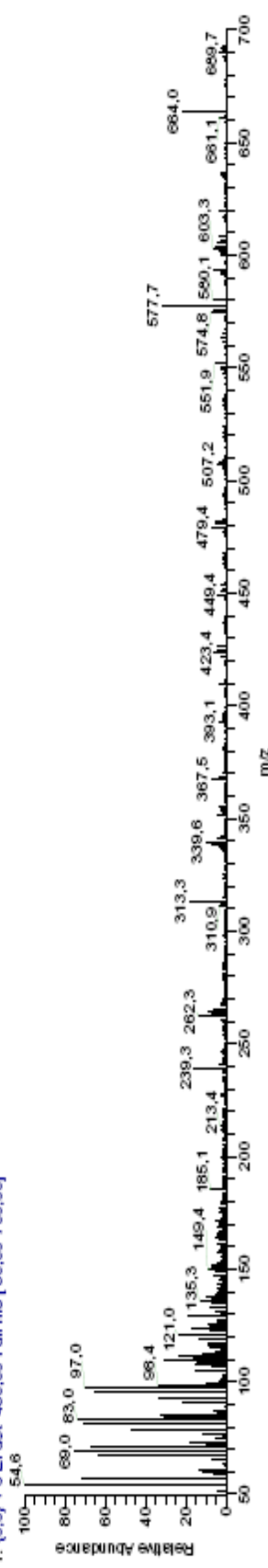
Report generated by : medicina  
Signature: .....  
-----  
\*\*\* End Fixed Wavelength Report \*\*\*  
-----



FP6 #116 RT: 2.03 AV: 1 NL: 1,08E7  
T: (0:0) + c EI 0s1-450,00 Full ms [ 50,00-700,00]



FP6 #133 RT: 2.32 AV: 1 NL: 1,10E7  
T: (0:0) + c EI 0s1-450,00 Full ms [ 50,00-700,00]

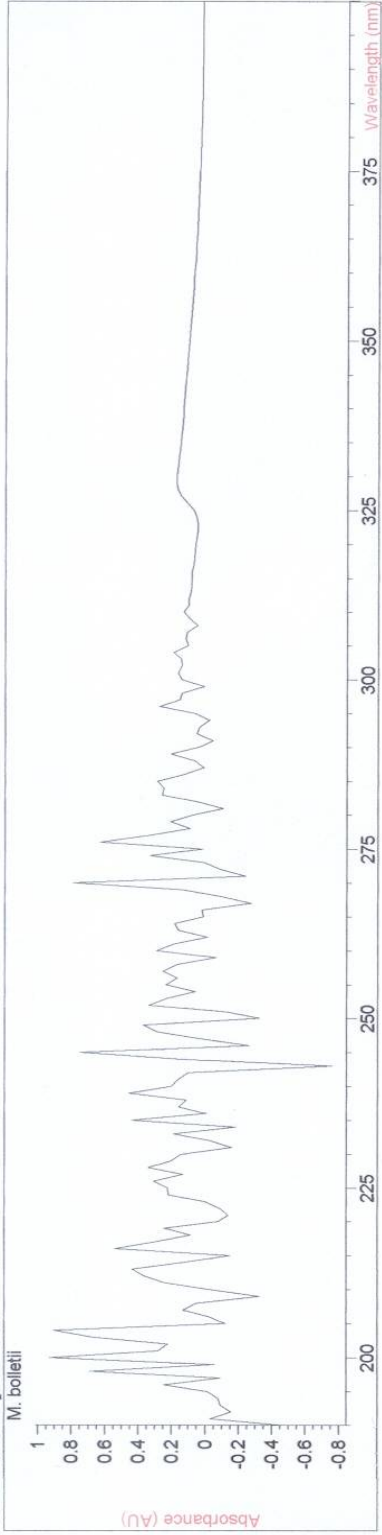


**Mycobacterium bolletii.**

===== Fixed Wavelength Report Date 7/25/2006 Time 10:14:42 Page 1 of 1 =====

Method file : LOWRY.M ( modified ) Last update: Date 7/25/2006 Time 9:40:05 AM  
Information : Default Method  
Data File : <untitled>

Overlaid Spectra:

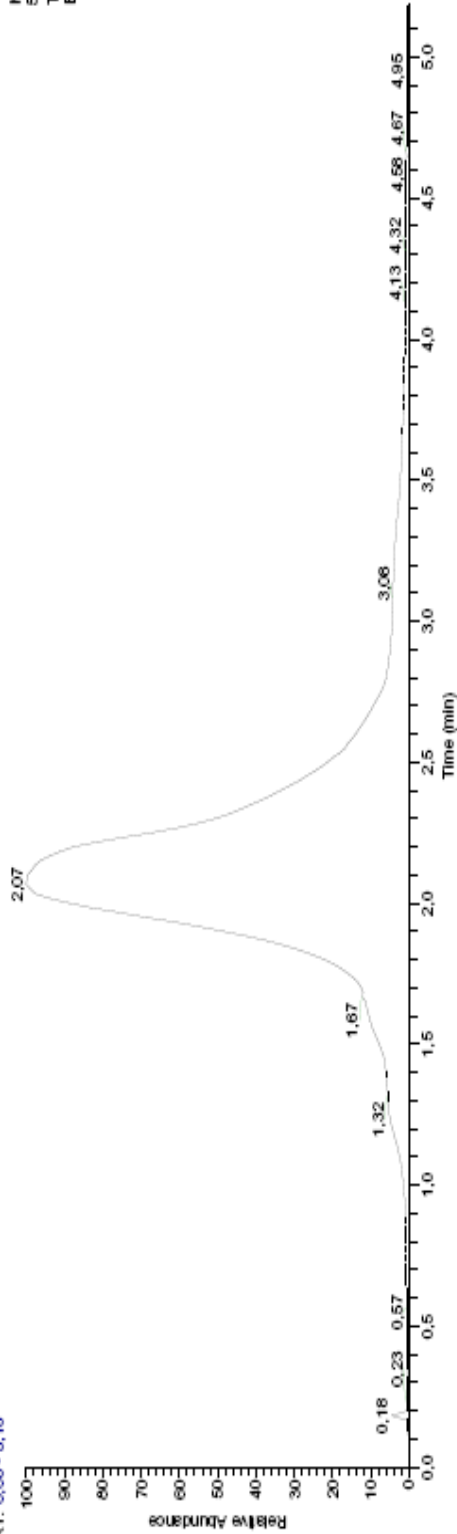


# Name -----  
1 M. bolletii

Report generated by : medicina Signature: .....

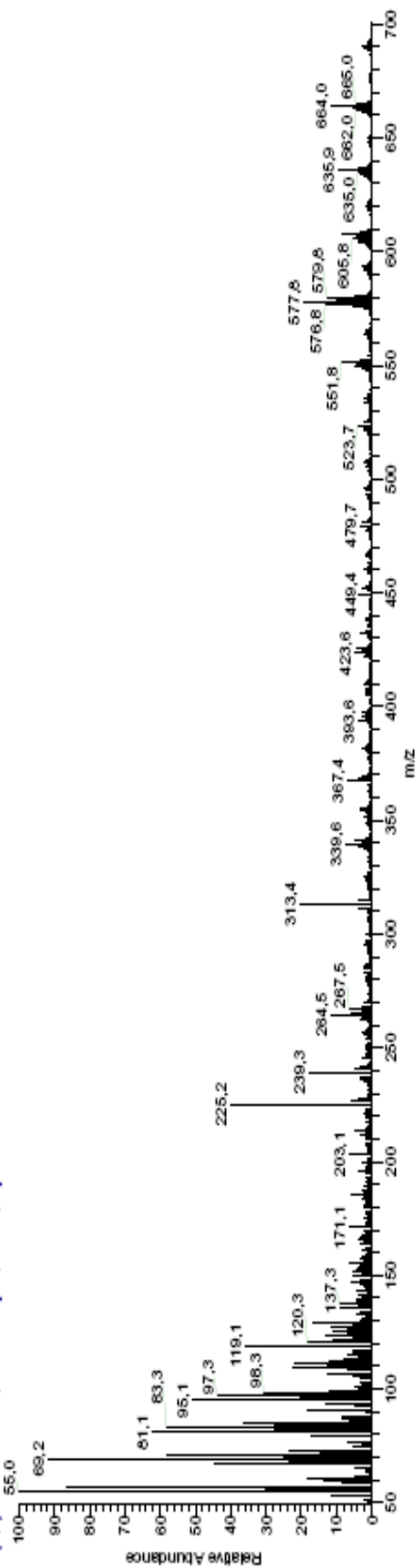
\*\*\* End Fixed Wavelength Report \*\*\*

RT: 0,00 - 5,18



ML:  
5,83E6  
TIC MS  
BOLLETTI

BOLLETTI #121 RT: 2,12 AV: 1 NL: 255E5  
T: [0,0] - c EI del=350,00 Full ms [ 50,00-700,00]



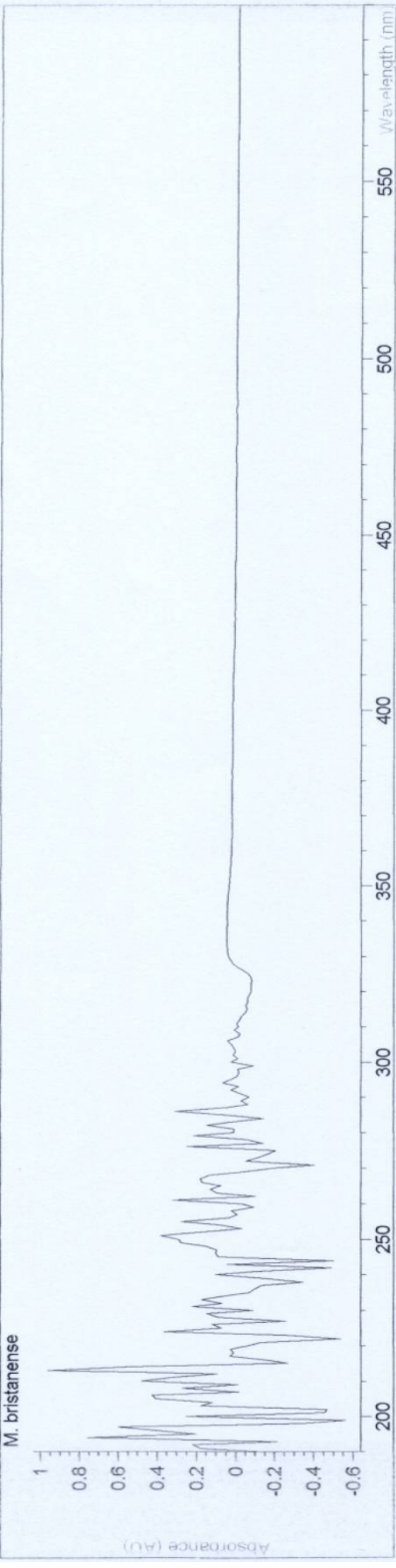
Mycobacterium brisbanense.

=====  
Fixed Wavelength Report  
=====  
Date 4/5/2006 Time 13:43:20 Page 1 of 1  
=====

Method file : LOWRY.M ( modified )      Last update: Date 4/5/2006 Time 1:35:34 PM  
Information : Default Method  
Data File : <untitled>

*M. brisbanense*

Overlaid Spectra:  
M. brisbanense



# Name                    Abs<750nm>  
-----  
1 M. brisbanense                    \*\*\*

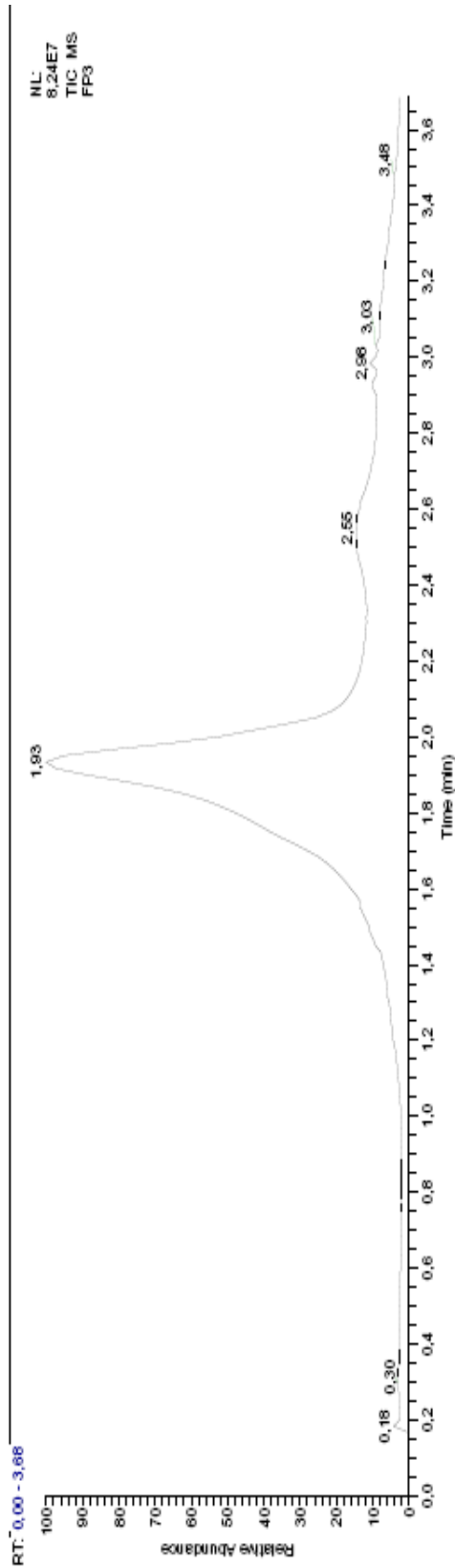
Report generated by : medicina

Signature: .....

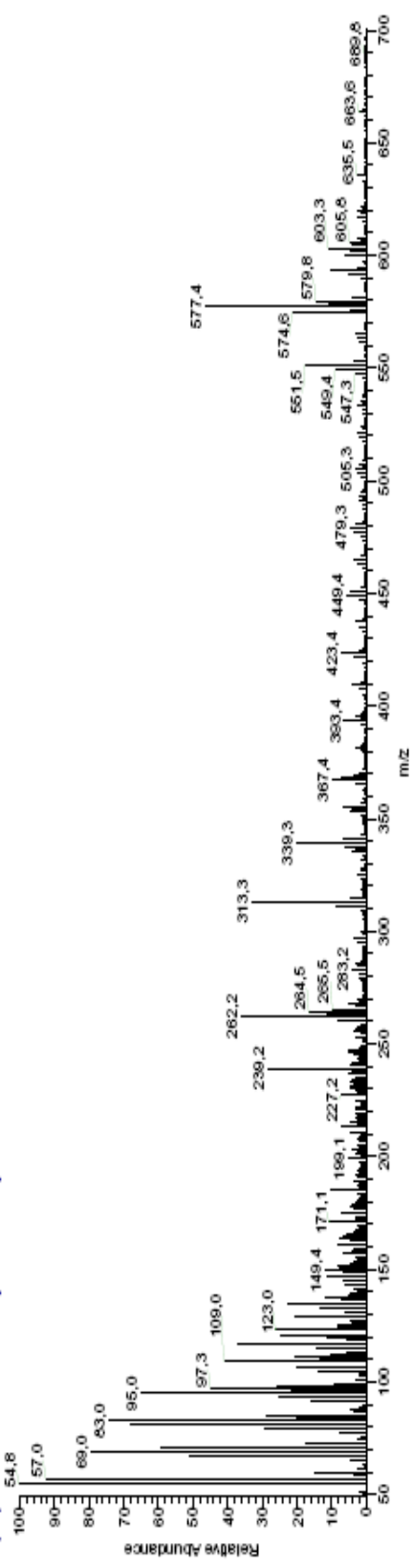
=====  
\*\*\* End Fixed Wavelength Report \*\*\*  
=====

\\voyneg\analysis\em...IFP3

19/04/2006 13:07:47



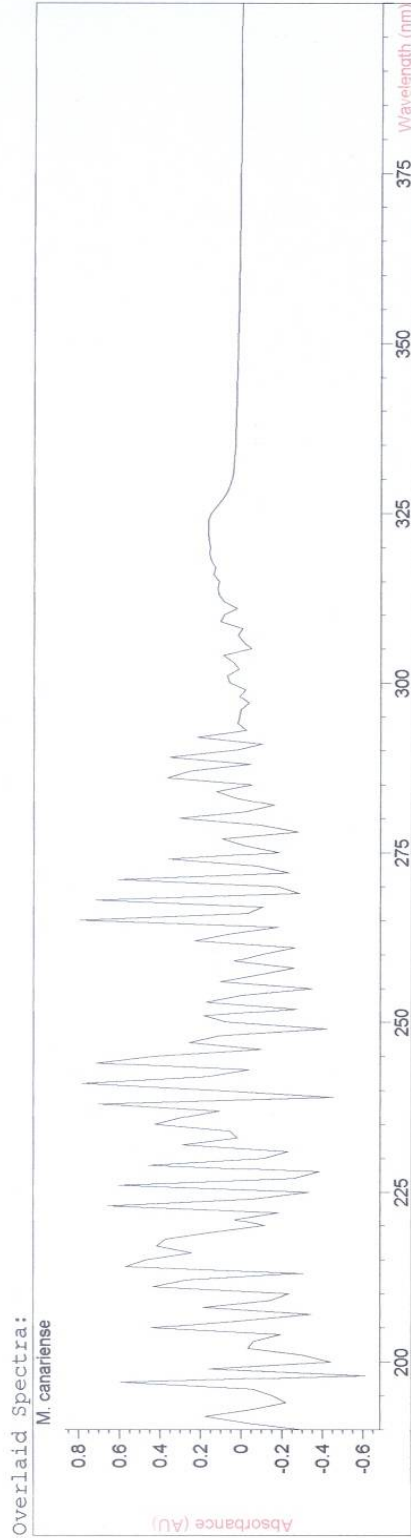
FP3 #110 RT: 1.93 AV: 1 NL: 3.58E8  
T: (0.0) + c EI det=450.00 Full ms [ 50.00-700.00]



**Mycobacterium canariense.**

=====  
Fixed Wavelength Report  
=====  
Date 5/19/2006 Time 12:51:43 Page 1 of 1

Method file : LOWRY.M ( modified )      Last update: Date 5/19/2006 Time 12:47:38 PM  
Information : Default Method  
Data File : <untitled>



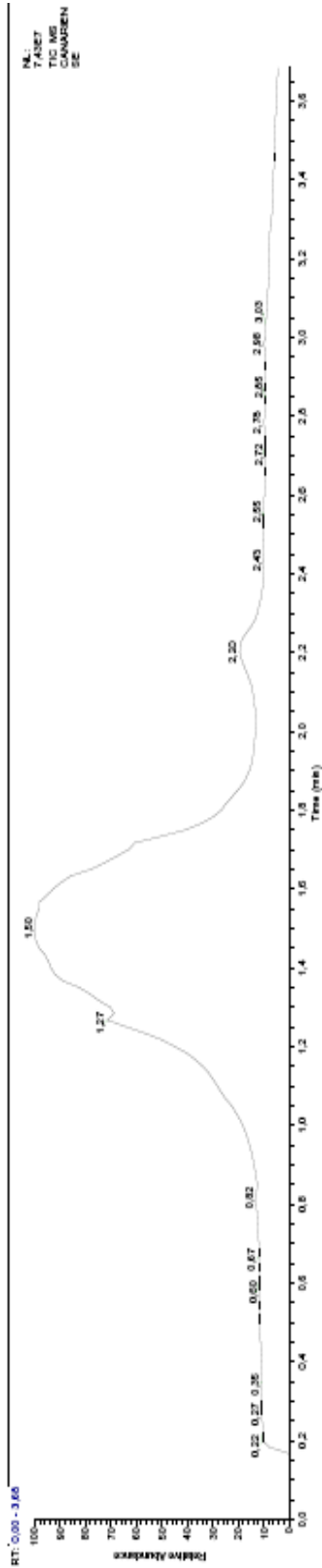
# Name

1 M. canariense

Report generated by : medicina

Signature: .....

\*\*\* End Fixed Wavelength Report \*\*\*



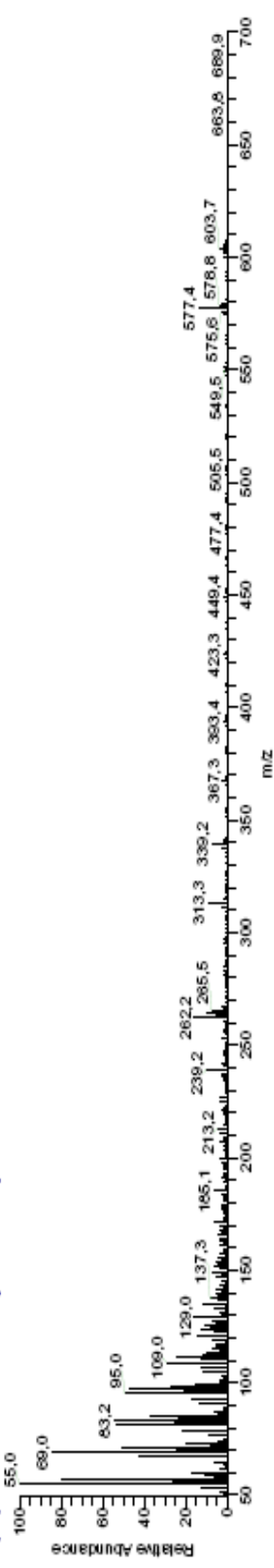
CANARIENSE #76-91 RT: 1.37-1.62 AV: 16 NIL: 6.59E8

T: (0:0) + c EI del=350.00 Full ms [ 50.00-700.00]



CANARIENSE #124-129 RT: 2.17-2.25 AV: 6 NIL: 6.37E5

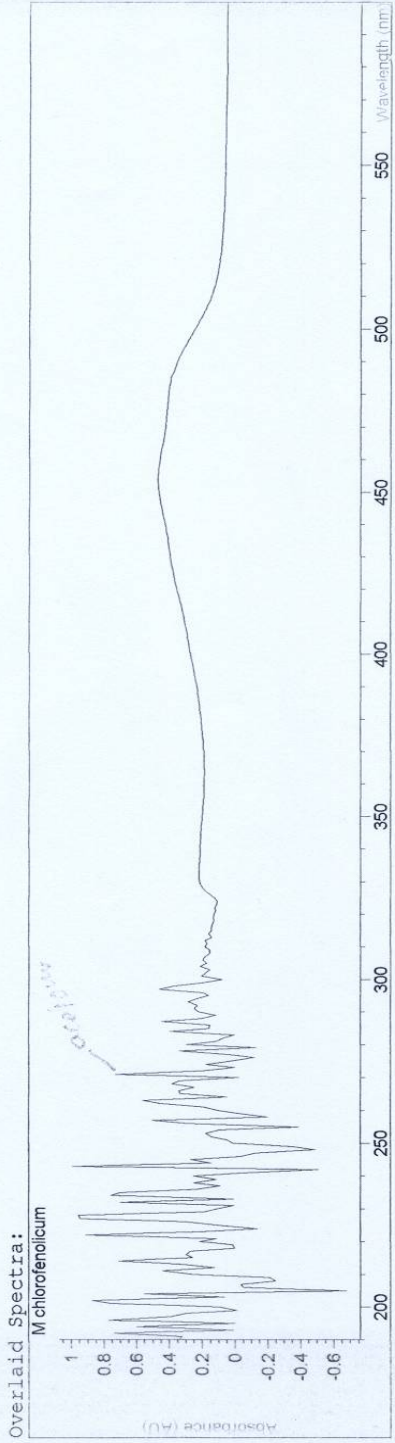
T: (0:0) + c EI del=350.00 Full ms [ 50.00-700.00]



**Mycobacterium chlorophenicum**



Method file : LOWRY.M ( modified ) Last update: Date 4/5/2006 Time 1:35:34 PM  
Information : Default Method  
Data File : <untitled>



# Name Abs<750nm>  
-----  
1 M chlorofenolicu \*\*\*

Report generated by : medicina

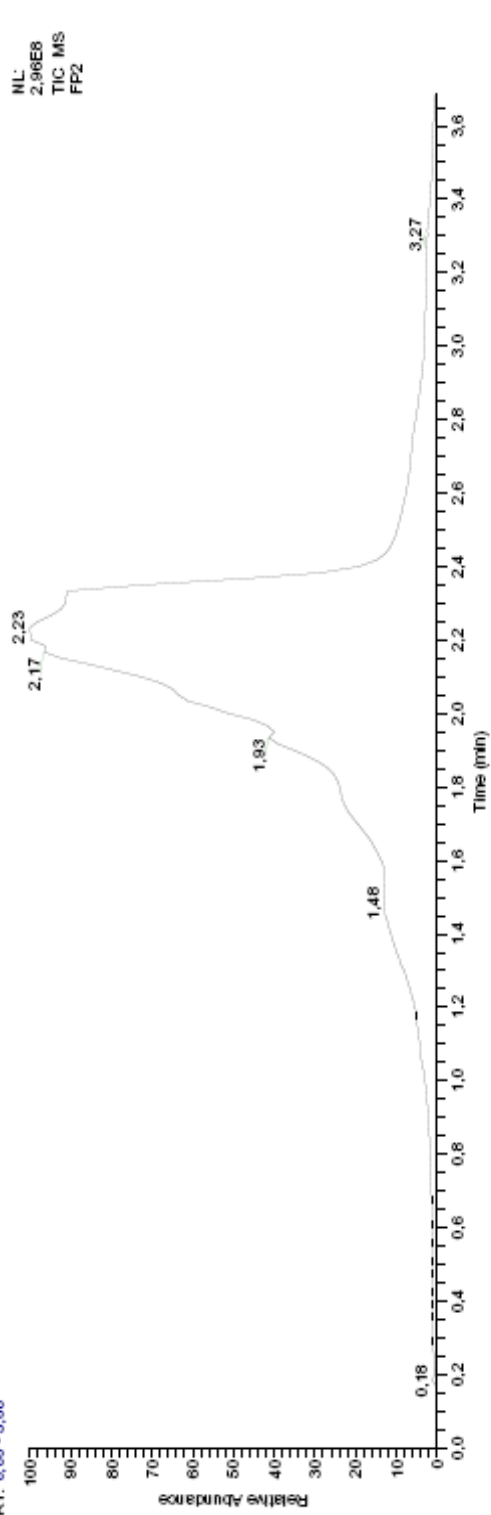
Signature: .....

\*\*\* End Fixed Wavelength Report \*\*\*

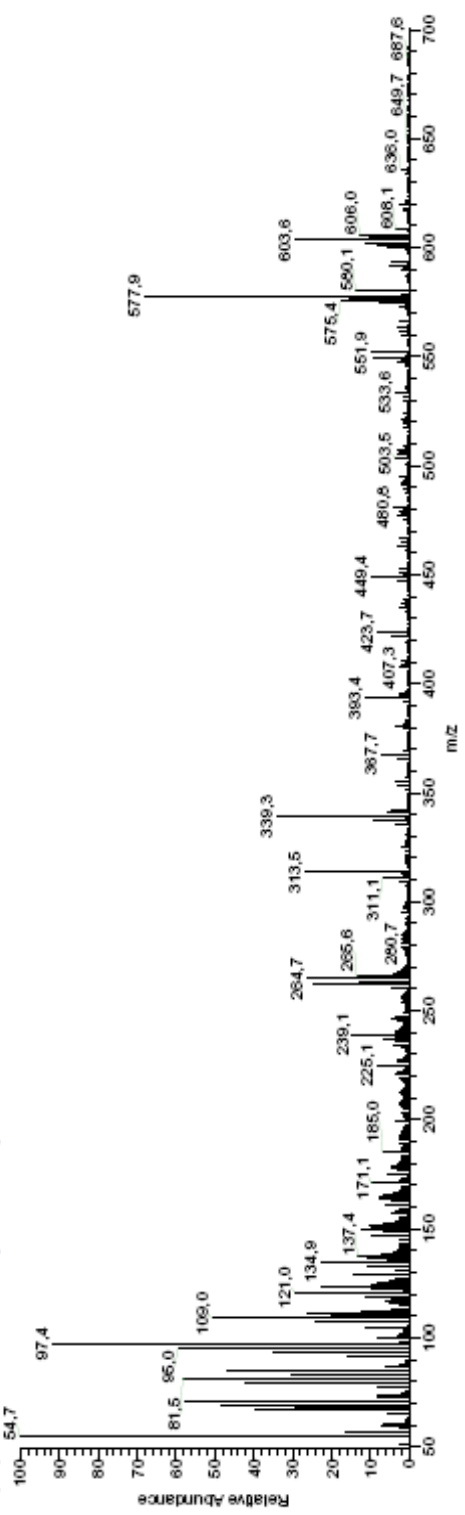
\\voysgen\analisis em... \FP2

19/04/2006 12:46:29

RT: 0,00 - 3,66



FP2 122-132 RT: 2.13-2.30 AV: 11 NL: 1.29E7  
T: (0,0) + c EI det=450,00 Full ms [ 50,00-700,00]

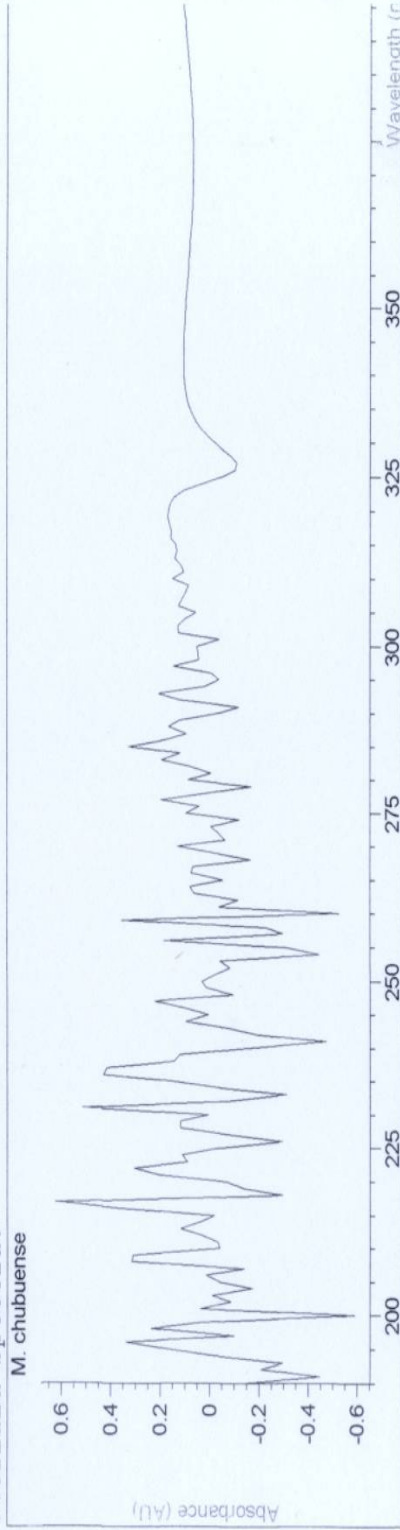


**Mycobacterium chubuense.**

Fixed Wavelength Report      Date 2/20/2006 Time 13:58:49 Page 1 of 1

Method file :      LOWRY.M ( modified )      Last update: Date 2/20/2006 Time  
                  1:55:12 PM  
Information :      Default Method  
Data File :      <untitled>

Overlaid Spectra:



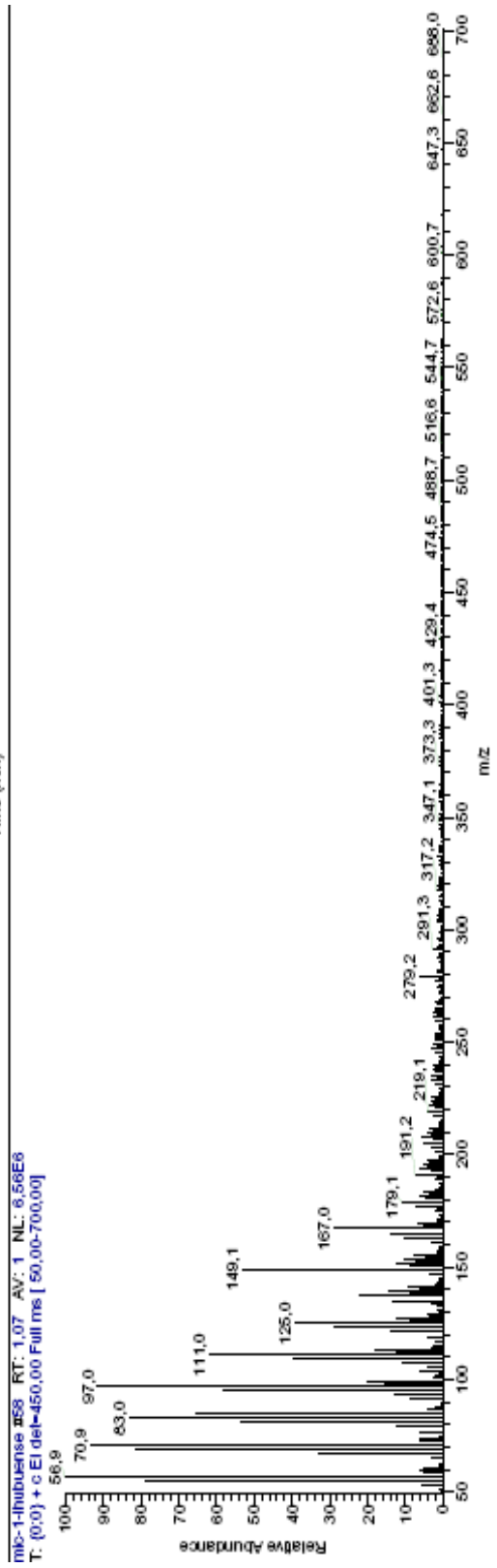
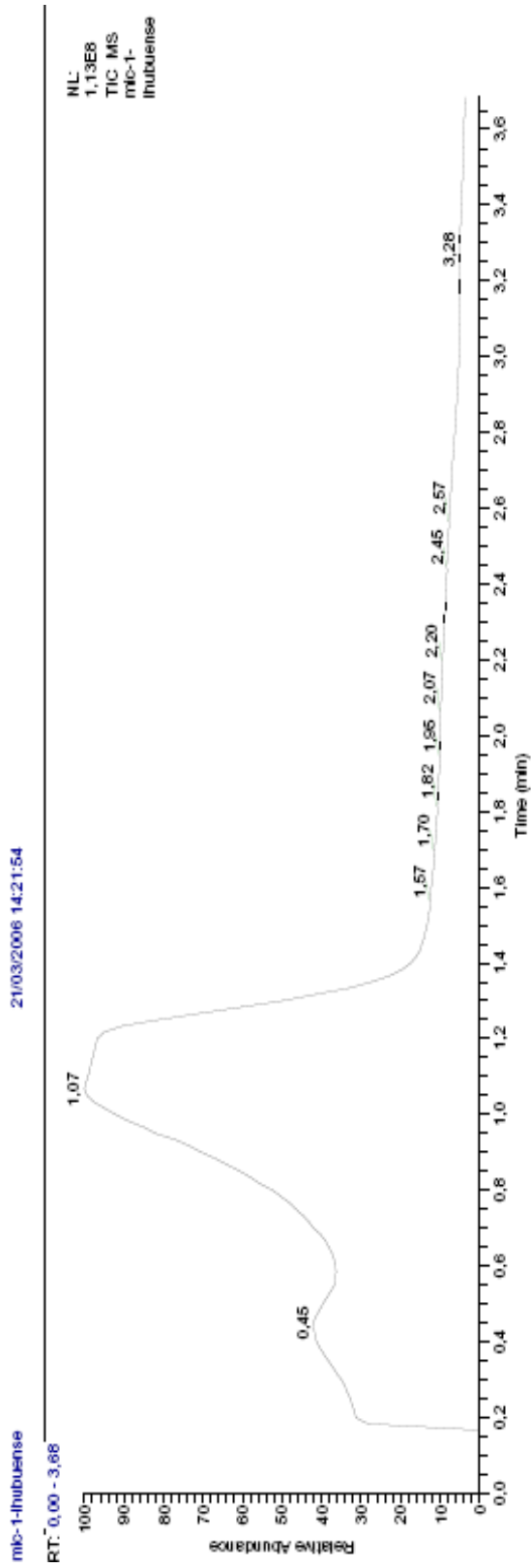
# Name

1 M. chubuense

Report generated by : medicina

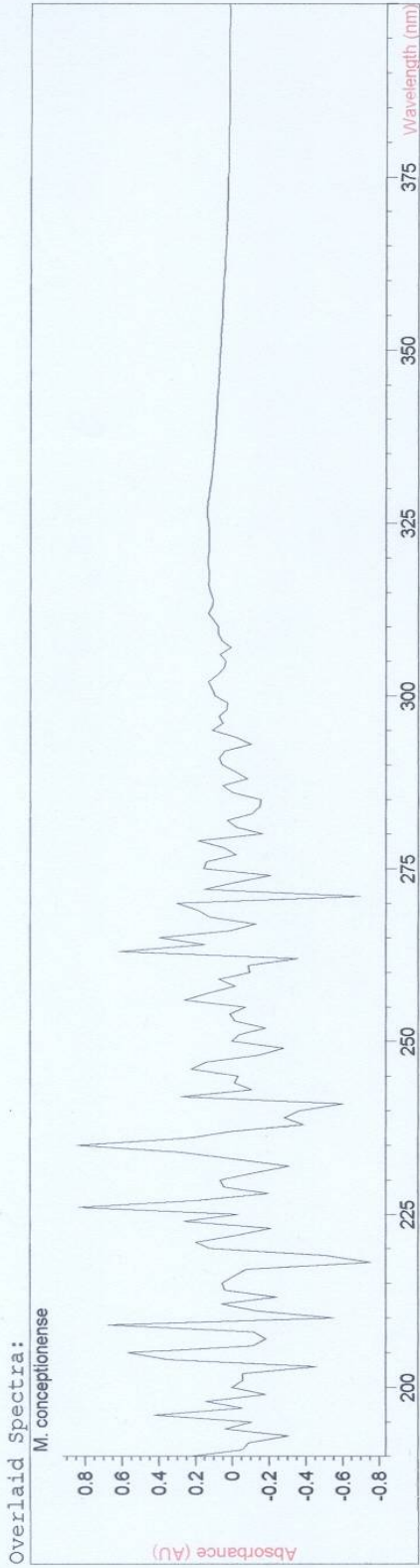
Signature: .....

\*\*\* End Fixed Wavelength Report \*\*\*



**Mycobacterium conceptionense.**

Method file : LOWRY.M ( modified )      Last update: Date 7/25/2006 Time 9:40:05 AM  
Information : Default Method  
Data File : <untitled>



# Name  
-----  
1 M. conceptionens

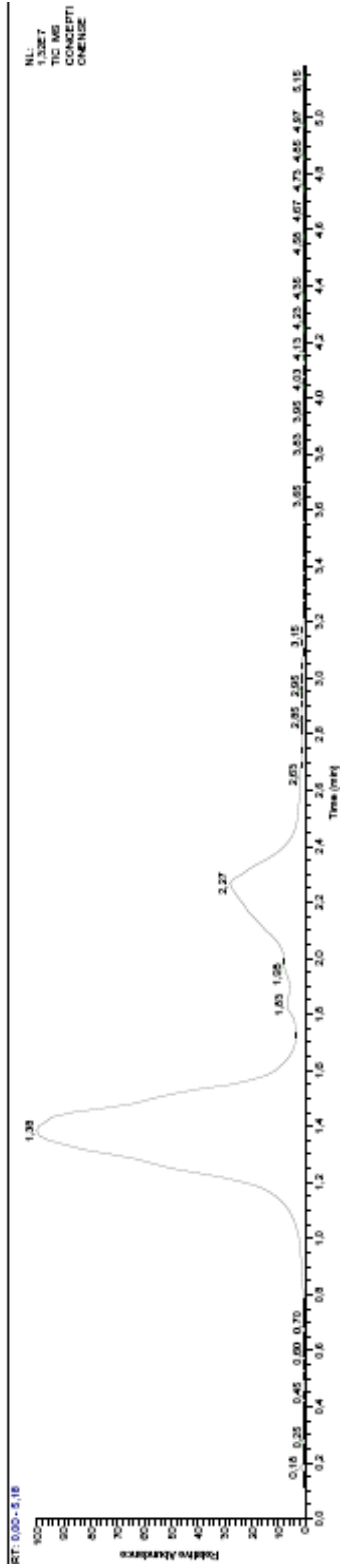
Report generated by : medicina

Signature: .....

\*\*\* End Fixed Wavelength Report \*\*\*

CONCEPTIONENSE

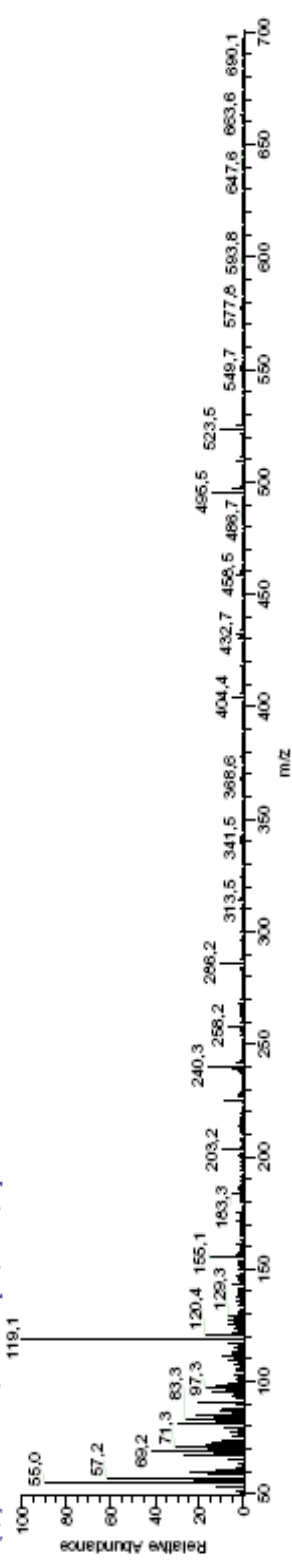
21/09/2006 11:17:05



CONCEPTIONENSE #77 RT: 1.39 AV: 1 NL: 7.72E5  
 T: (0.0) + c EI det=350.00 Full ms [ 50.00-700.00]



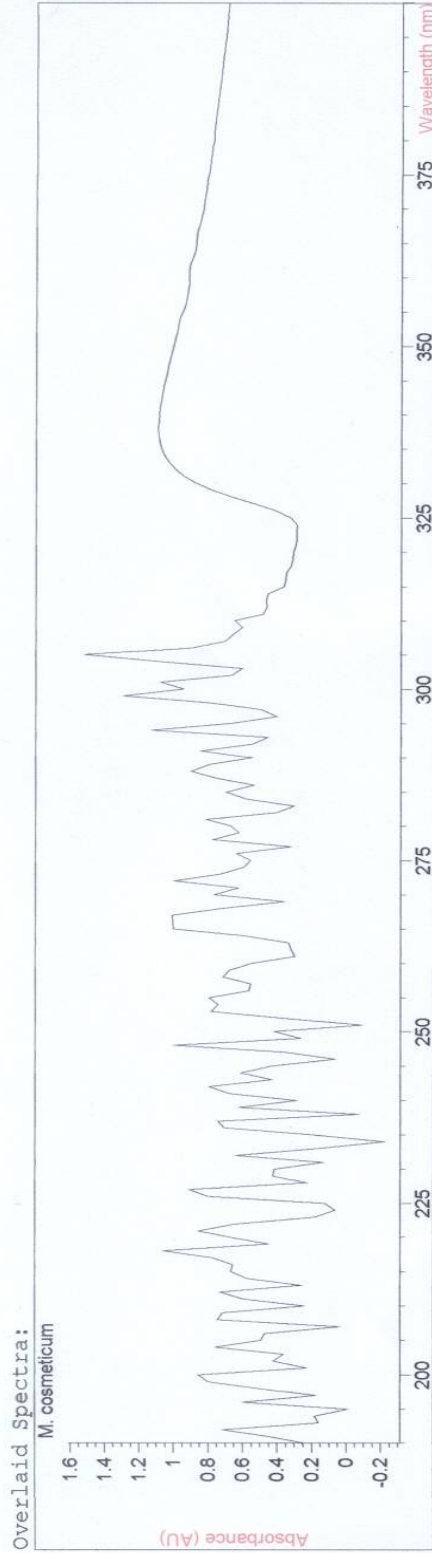
CONCEPTIONENSE #130 RT: 2.27 AV: 1 NL: 2.76E5  
 T: (0.0) + c EI det=350.00 Full ms [ 50.00-700.00]



Mycobacterium cosmeticum.

=====  
Fixed Wavelength Report  
=====  
Date 7/25/2006 Time 10:06:58 Page 1 of 1  
=====

Method file : LOWRY.M ( modified )      Last update: Date 7/25/2006 Time 9:40:05 AM  
Information : Default Method  
Data File : <untitled>

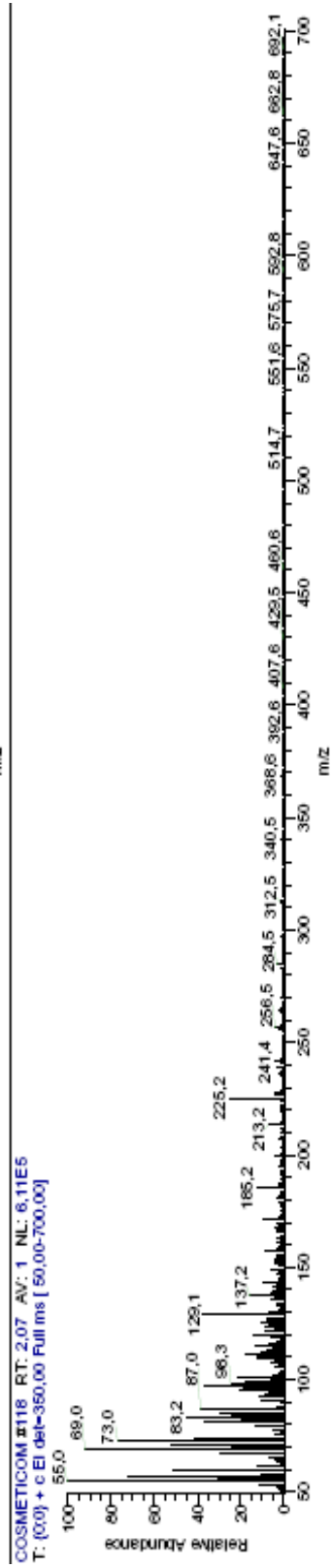
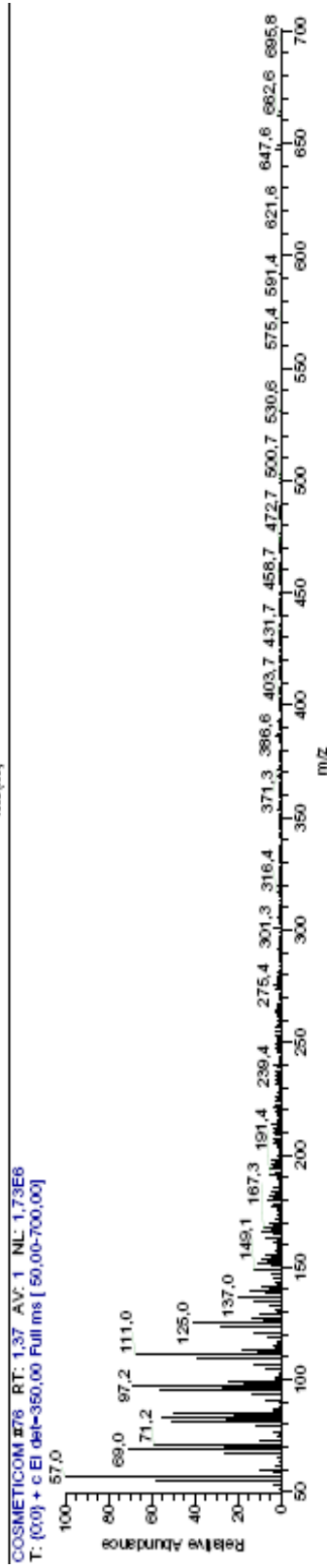
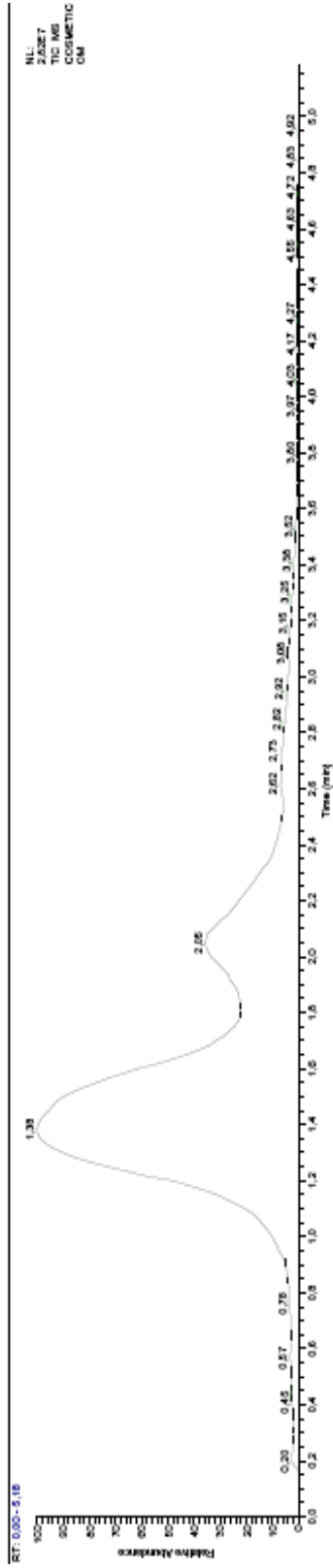


# Name  
-----  
1 M. cosmeticum

Report generated by : medicina

Signature: .....

-----  
\*\*\* End Fixed Wavelength Report \*\*\*  
-----



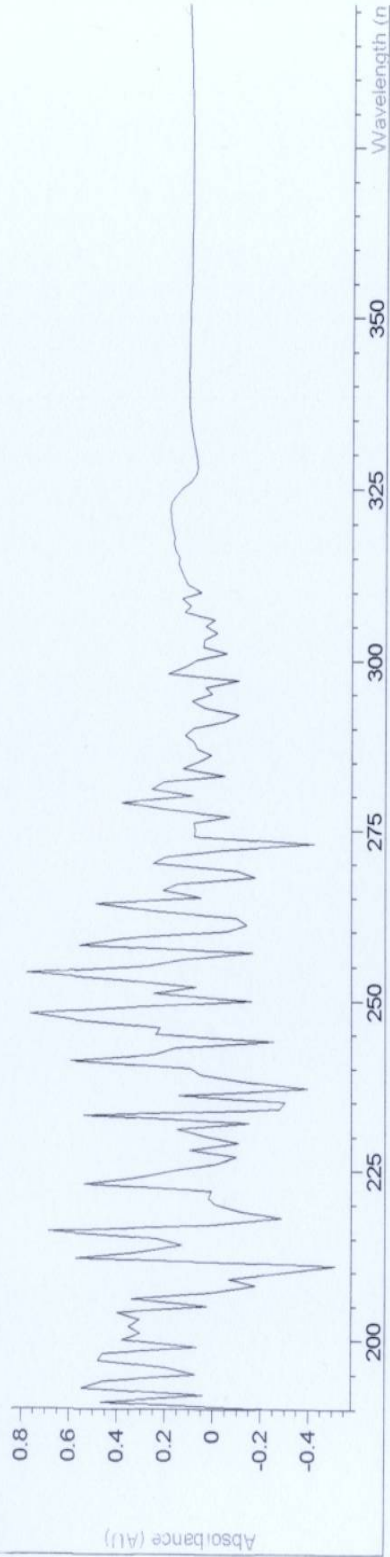


**Mycobacterium duvali.**

=====  
Fixed Wavelength Report  
Date 2/20/2006 Time 13:56:25 Page 1 of 1  
=====

Method file : LOWRY.M ( modified ) Last update: Date 2/20/2006 Time  
1:55:12 PM  
Information : Default Method  
Data File : <untitled>

Overlaid Spectra:



# Name

1 *M. duvali*

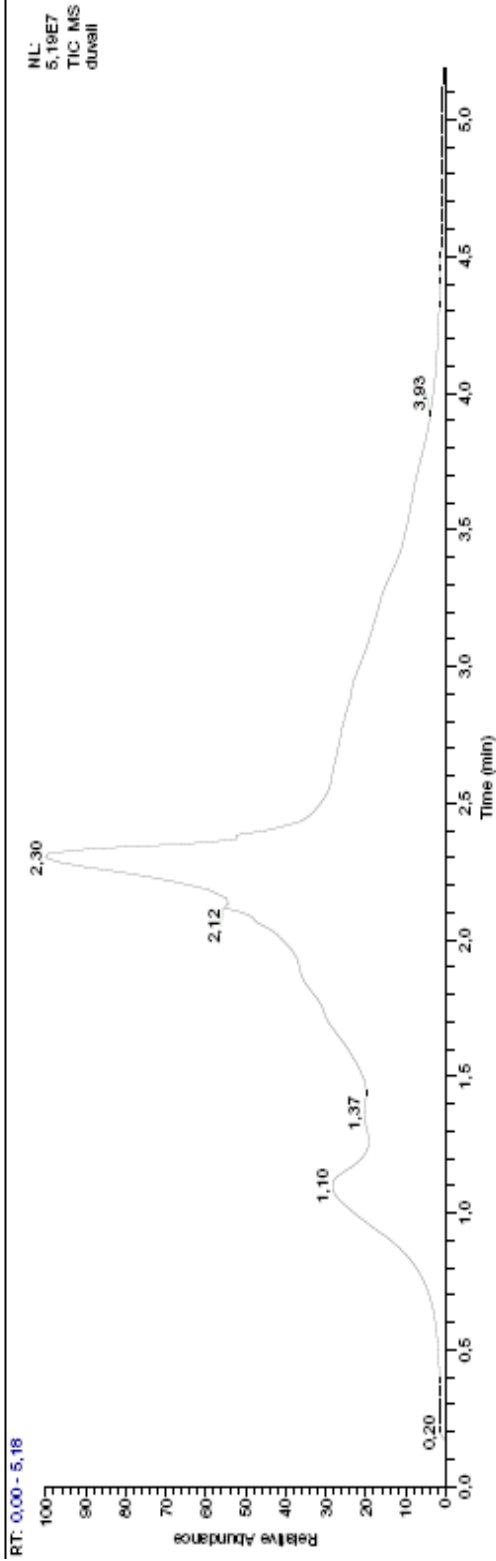
Report generated by : medicina

Signature: .....

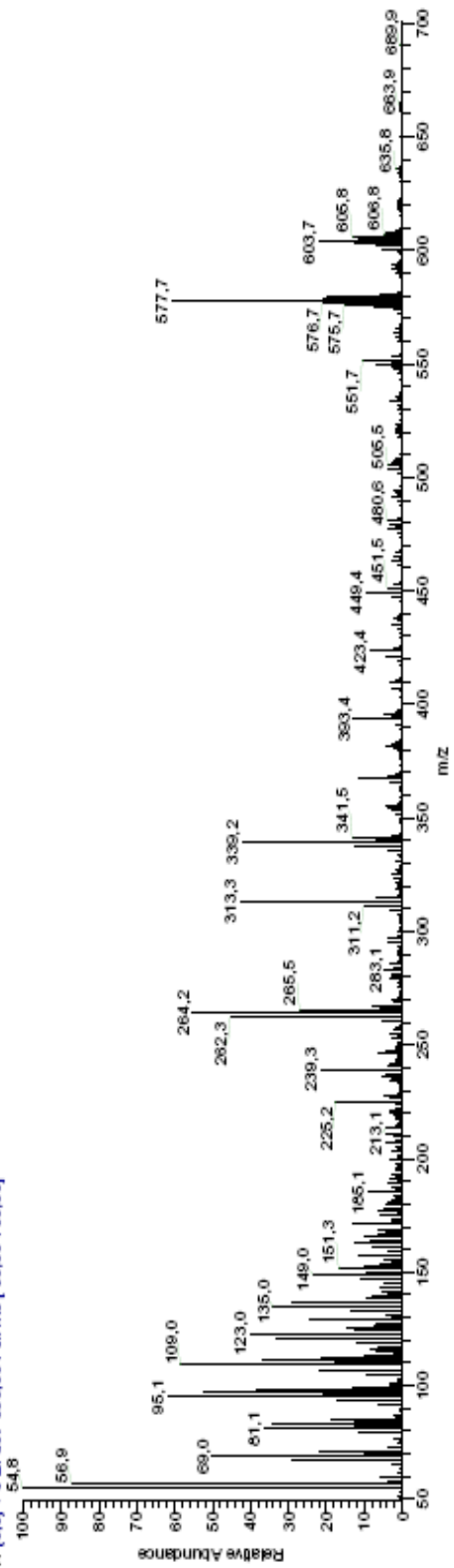
=====  
\*\*\* End Fixed Wavelength Report \*\*\*  
=====

W:\Vogel\analysen\15...duvall

04/12/2006 15:06:10



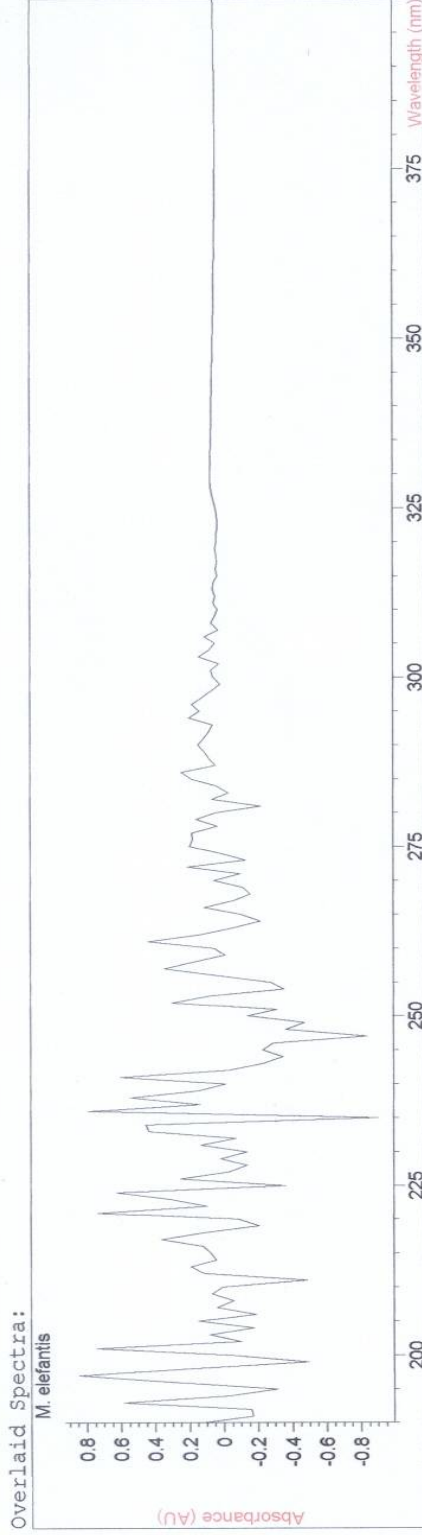
duvall #128-135 RT: 2,20-2,35 AV: 10 NL: 1,78E6  
T: (0,0) + c EI det=350,00 Full ms [ 50,00-700,00]



**Mycobacterium elephantis.**

=====  
Fixed Wavelength Report  
=====  
Date 7/25/2006 Time 10:08:52 Page 1 of 1  
=====

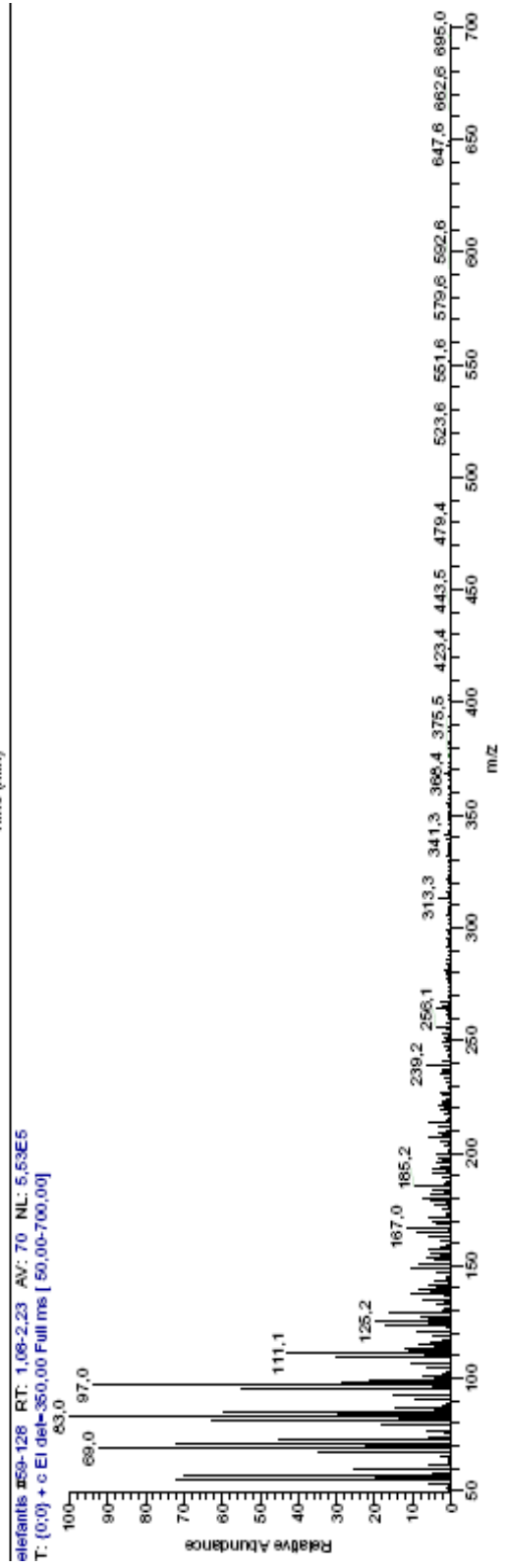
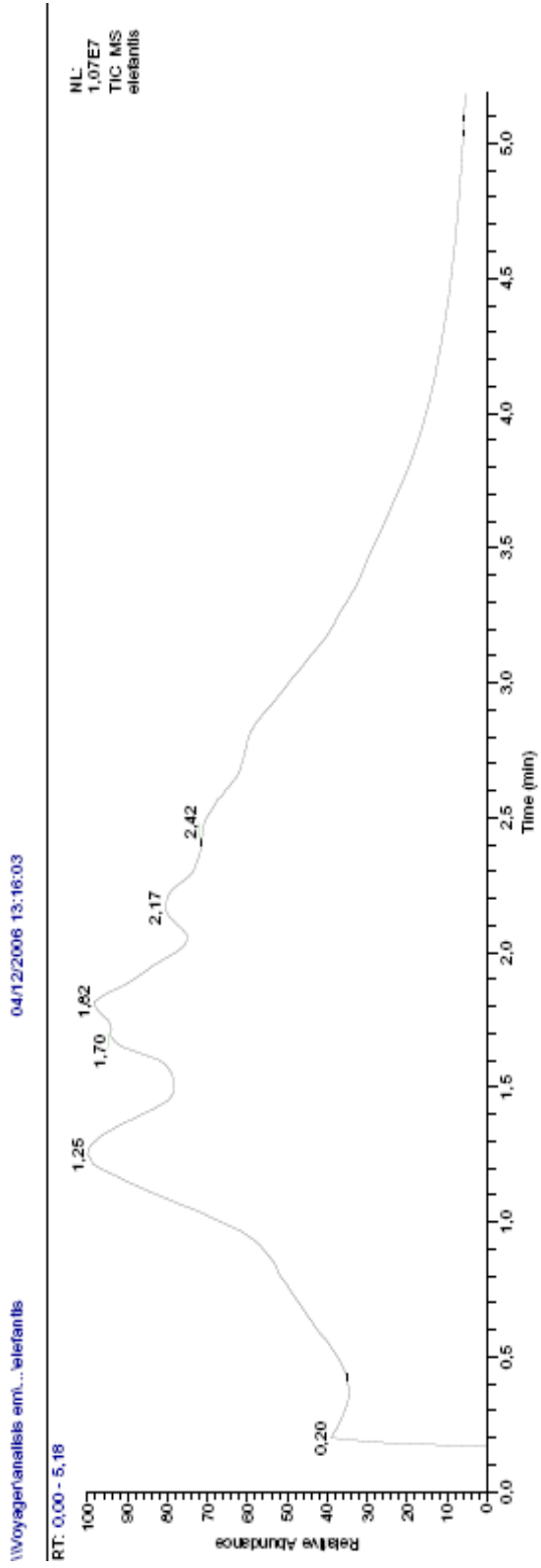
Method file : LOWRY.M ( modified ) Last update: Date 7/25/2006 Time 9:40:05 AM  
Information : Default Method  
Data File : <untitled>



# Name -----  
1 M. elephantis

Report generated by : medicina Signature: .....

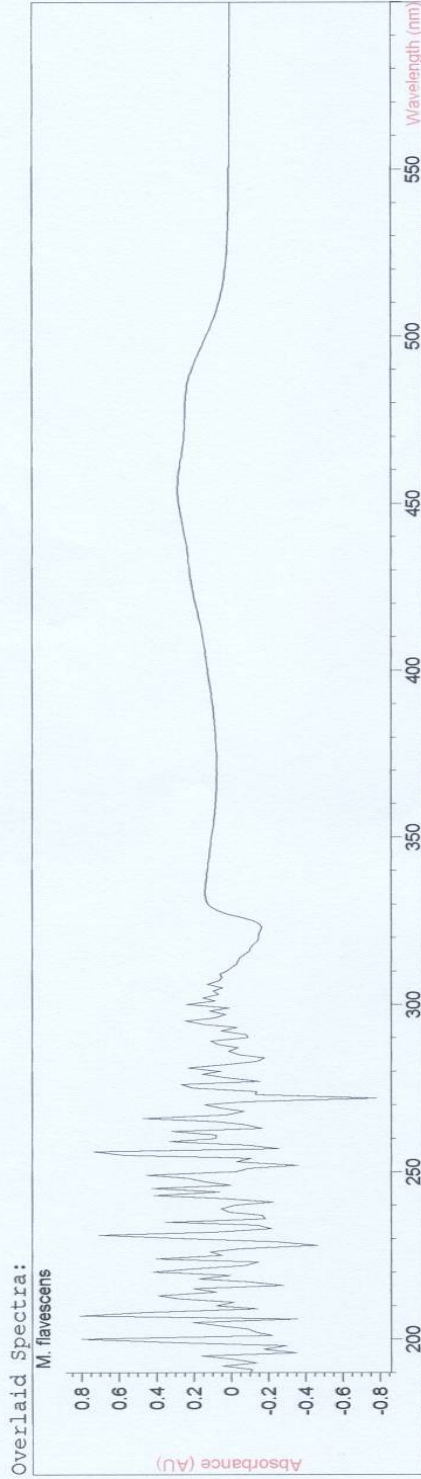
-----  
\*\*\* End Fixed Wavelength Report \*\*\*  
-----



**Mycobacterium flavescens.**

=====  
Fixed Wavelength Report  
=====  
DPage 1 of 106 Time 12:42:53

Method file : LOWRY.M ( modified )      Last update: Date 5/16/2006    Time 12:40:39 PM  
Information :    Default Method  
Data File :    <untitled>

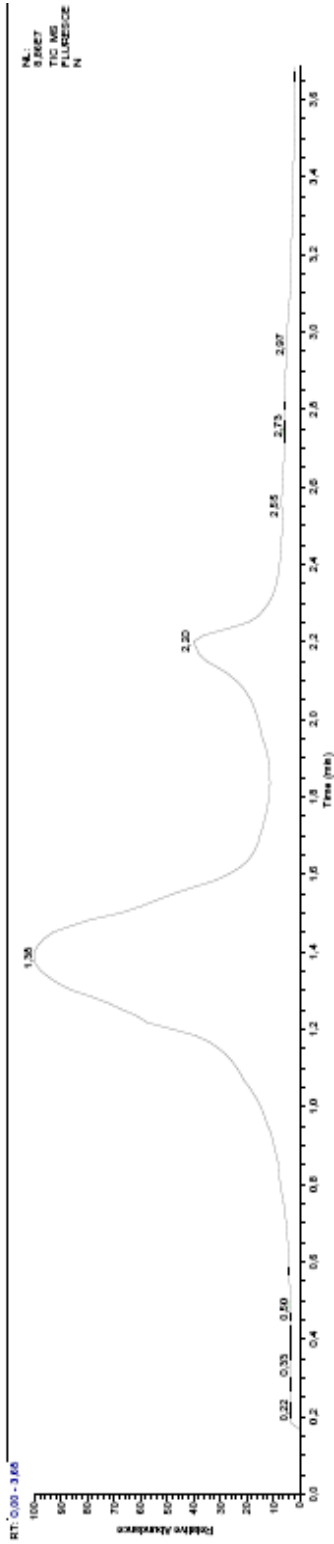


# Name -----  
1 M. flavescens  
Report generated by : medicina  
Signature: .....

\*\*\* End Fixed Wavelength Report \*\*\*

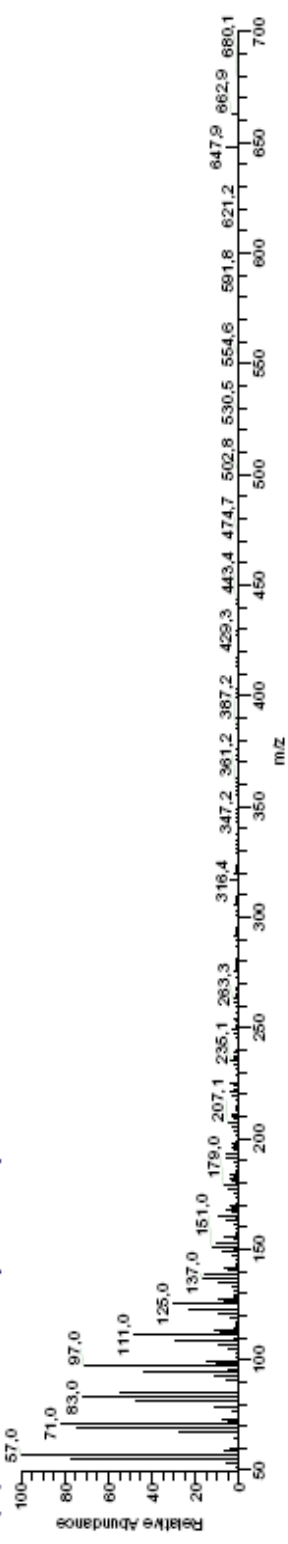
Woyageranalis em...FLUORESCEN

24/05/2006 14:54:06



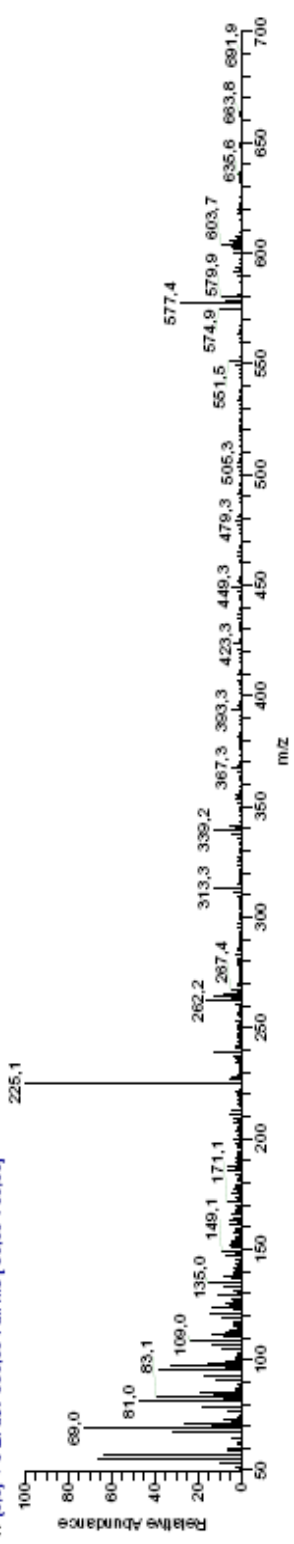
FLUORESCEN #74-80 RT: 1.33-1.43 AV: 7 NL: 6.57E5

T: (0:0) + c EI (61-350.00 Full ms [50.00-700.00])



FLUORESCEN #123-127 RT: 2.15-2.22 AV: 5 NL: 2.12E6

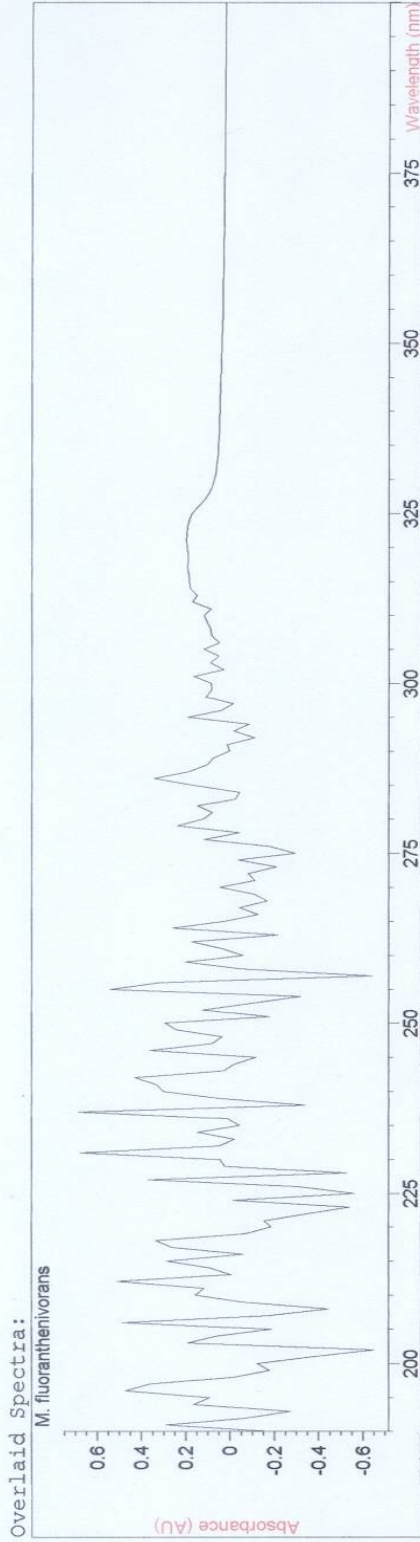
T: (0:0) + c EI (61-350.00 Full ms [50.00-700.00])



**Mycobacterium fluoranthenivorans.**

=====  
Fixed Wavelength Report  
=====  
Date 7/25/2006 Time 10:20:23 Page 1 of 1  
=====

Method file : LOWRY.M ( modified )      Last update: Date 7/25/2006 Time 9:40:05 AM  
Information : Default Method  
Data File : <untitled>



# Name  
-----  
1 M. fluorantheniv

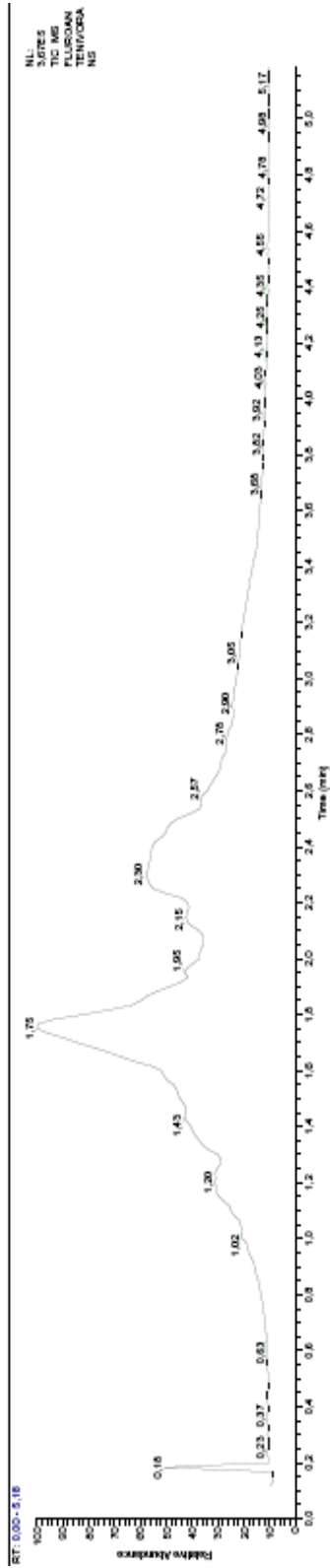
Report generated by : medicina

Signature: .....

-----  
\*\*\* End Fixed Wavelength Report \*\*\*  
-----

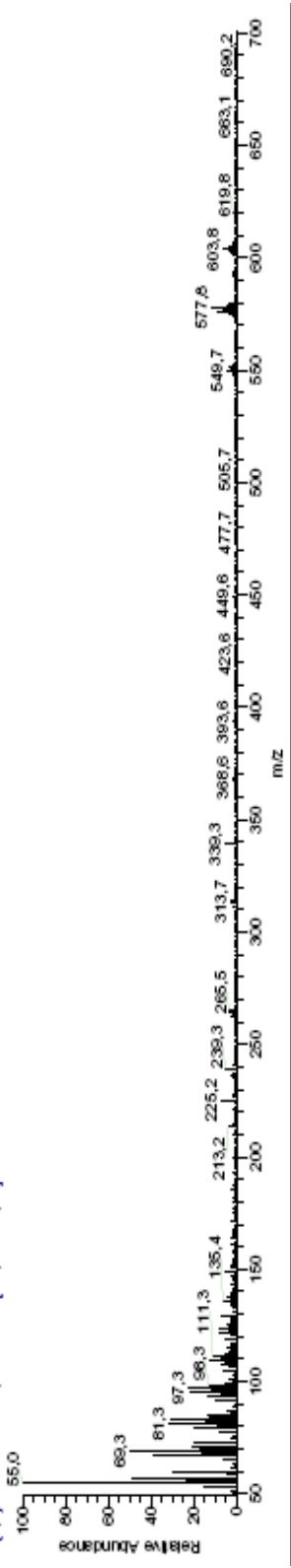
FLUORANTENIVORANS

2009/2006 12:48:35



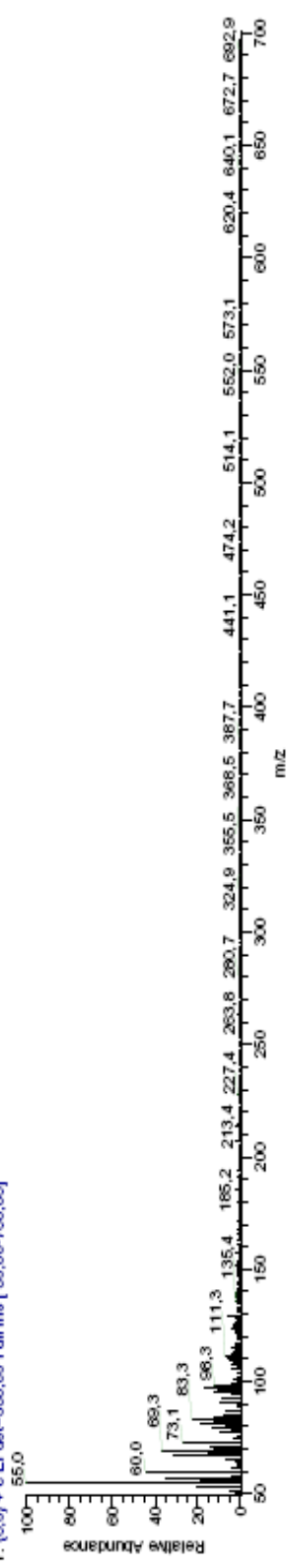
FLUORANTENIVORANS #100 RT: 1.77 AV: 1 NL: 3.04E4

T: (00) + c EI del=350.00 Full ms [ 50.00-700.00]



FLUORANTENIVORANS #135 RT: 2.35 AV: 1 NL: 2.38E4

T: (00) + c EI del=350.00 Full ms [ 50.00-700.00]

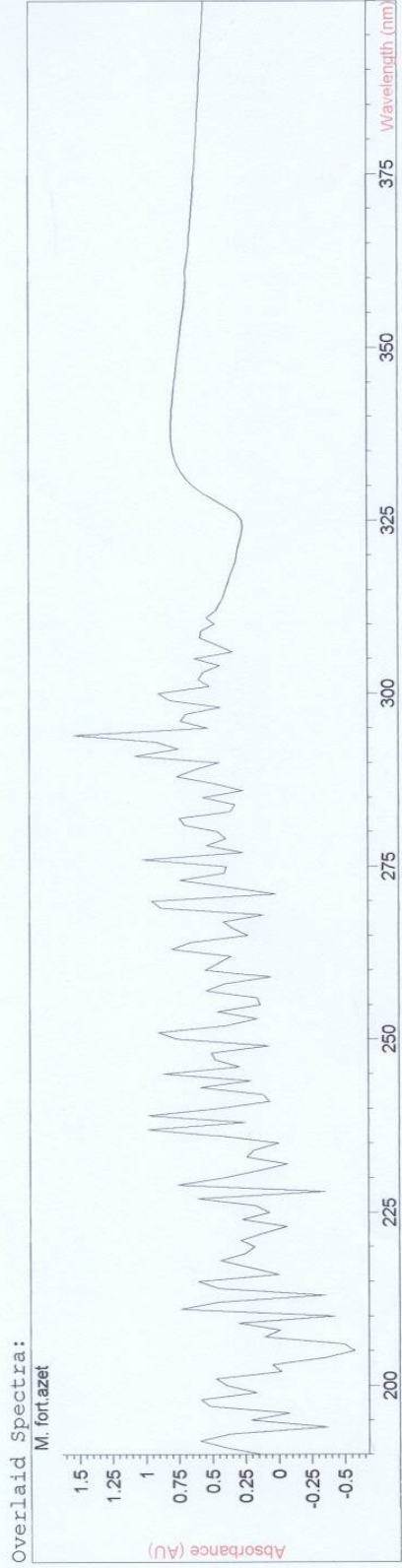




**Mycobacterium fortuitum acetamidolitycum.**

=====  
Fixed Wavelength Report  
=====  
Date 6/27/2006 Time 13:37:10 Page 1 of 1  
=====

Method file : LOWRY.M ( modified )      Last update: Date 6/27/2006 Time 1:28:58 PM  
Information : Default Method  
Data File : <untitled>



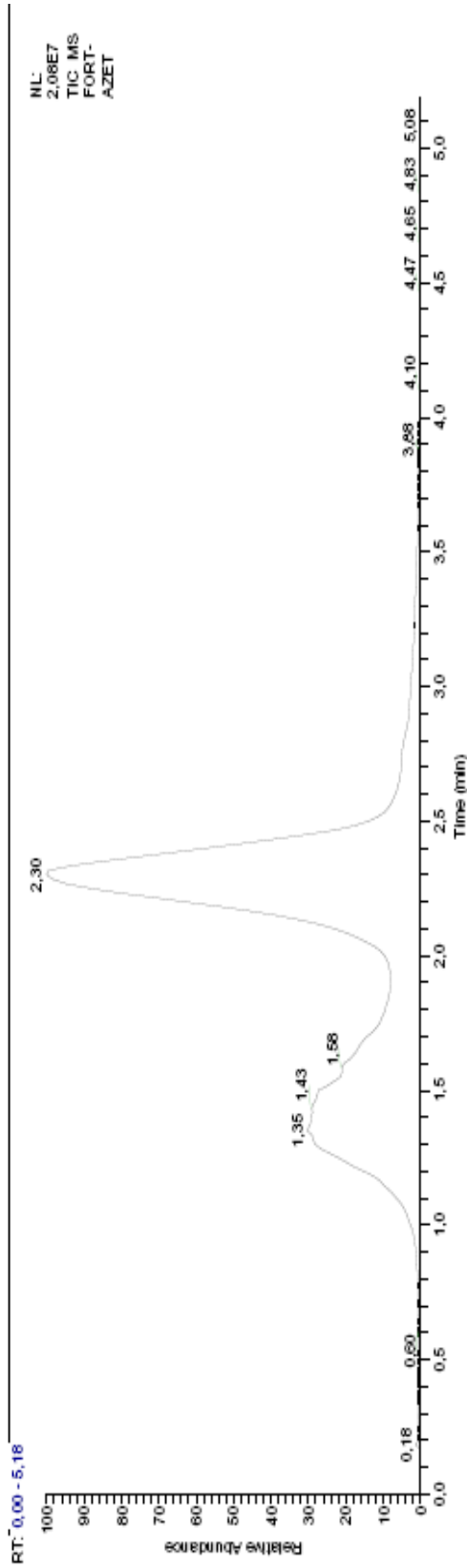
-----  
# Name  
-----  
1 M. fort.azet

Report generated by : medicina      Signature: .....

-----  
\*\*\* End Fixed Wavelength Report \*\*\*  
-----

\\vojager\analysis\em... \FORT-AZET

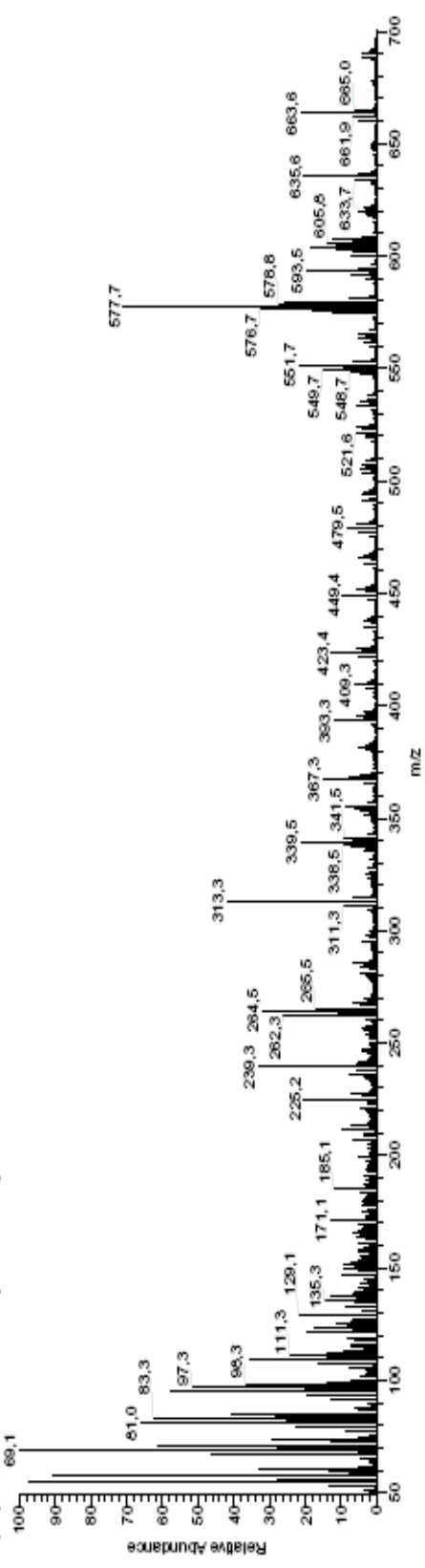
13/07/2006 12:27:48



NL:  
2.08E7  
TIC MS  
FORT-  
AZET

FORT-AZET #128-136 RT: 2.23-2.37 AV: 9 NL: 6.14E5

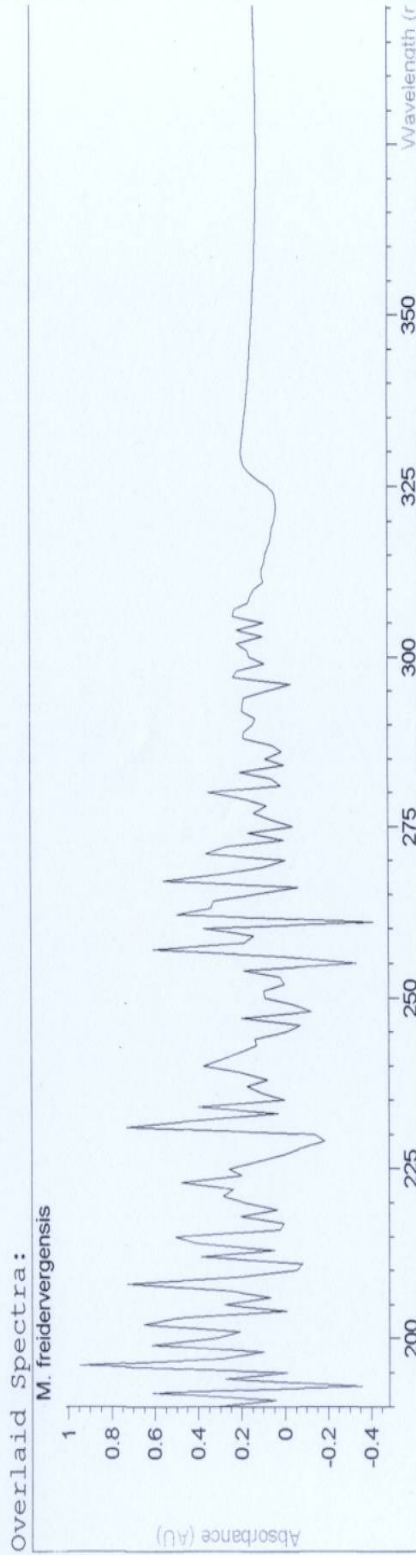
T: (0.0) + e EI det=350.00 Full ms [ 50.00-700.00]



**Mycobacterium frederiksbergense.**

=====  
Fixed Wavelength Report  
=====  
Date 2/21/2006 Time 13:55:34 Page 1 of 1  
=====

Method file : LOWRY.M ( modified ) Last update: Date 2/21/2006 Time  
1:48:55 PM  
Information : Default Method  
Data File : <untitled>

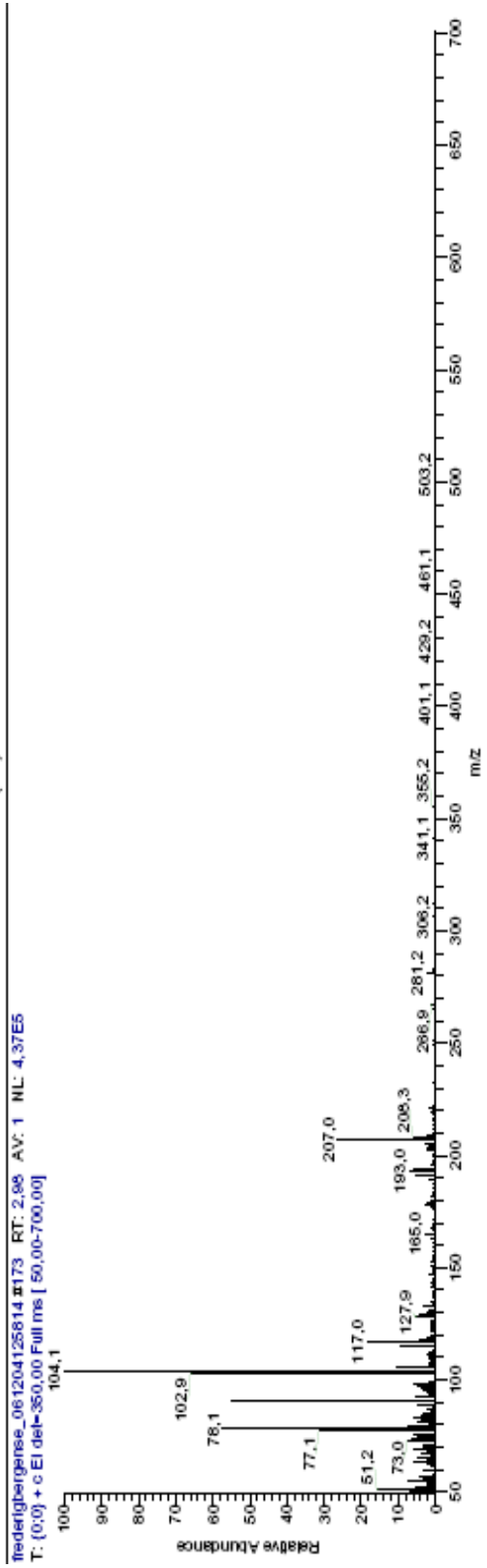
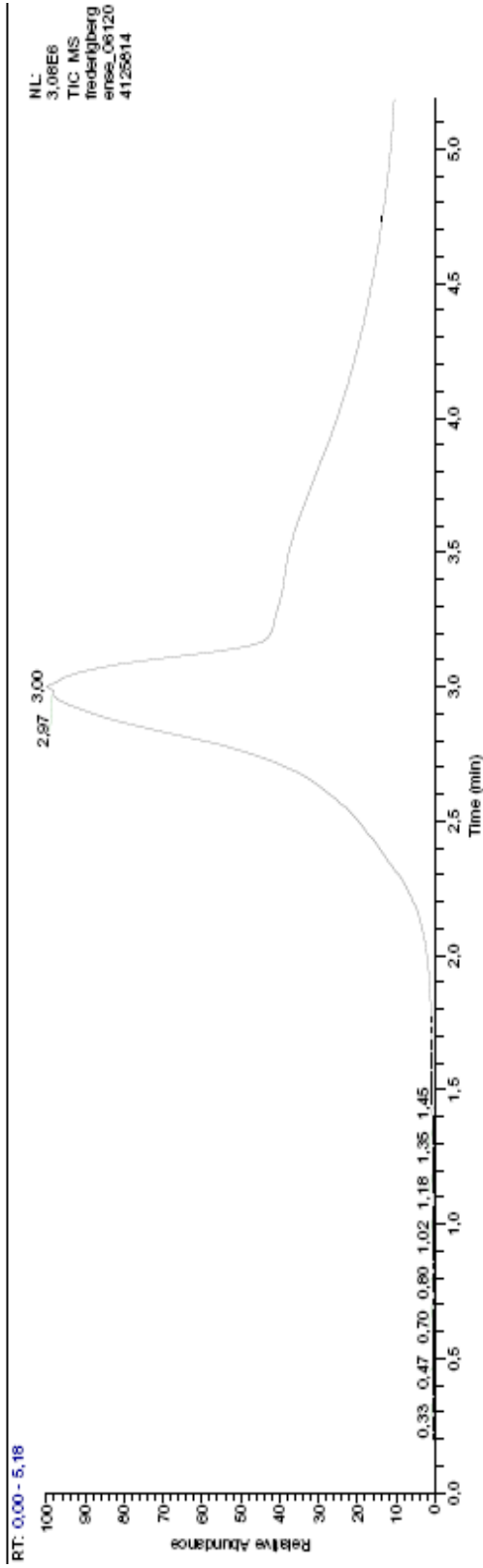


# Name  
-----  
1 M. frederiksbergensis

Report generated by : medicina  
Signature: .....

-----  
\*\*\* End Fixed Wavelength Report \*\*\*  
-----

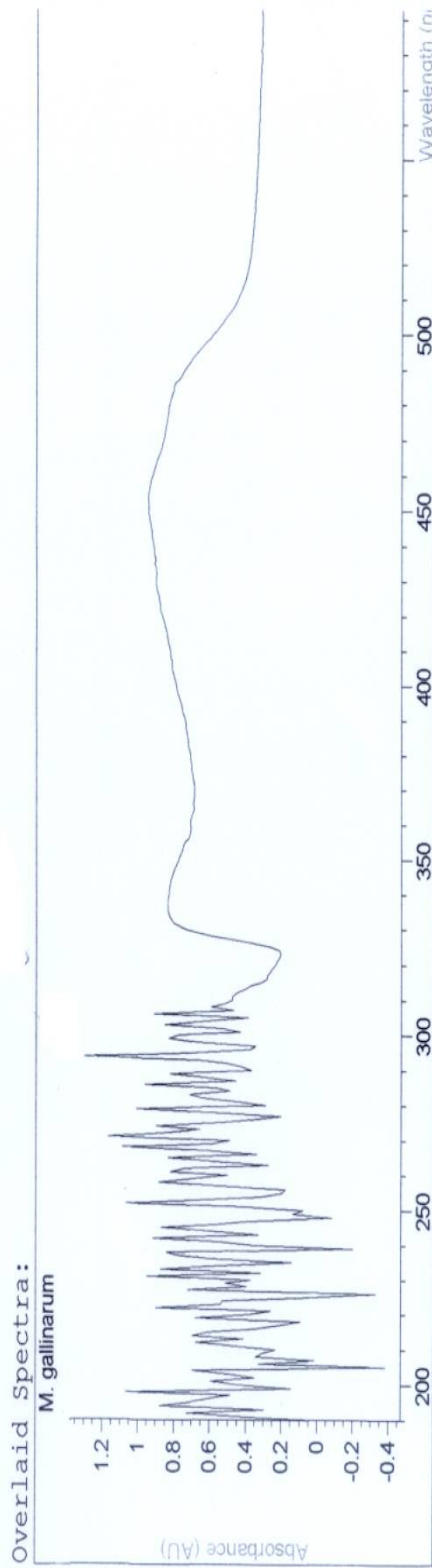
fredartighergense\_061204125614 04/12/2006 12:58:14



**Mycobacterium gallinarum.**

=====  
 Fixed Wavelength Report  
 Date 4/5/2006 Time 13:37:00 Page 1 of 1  
 =====

Method file : LOWRY.M ( modified ) Last update: Date 4/5/2006 Time 1:35:34 PM  
 Information : Default Method  
 Data File : <untitled>

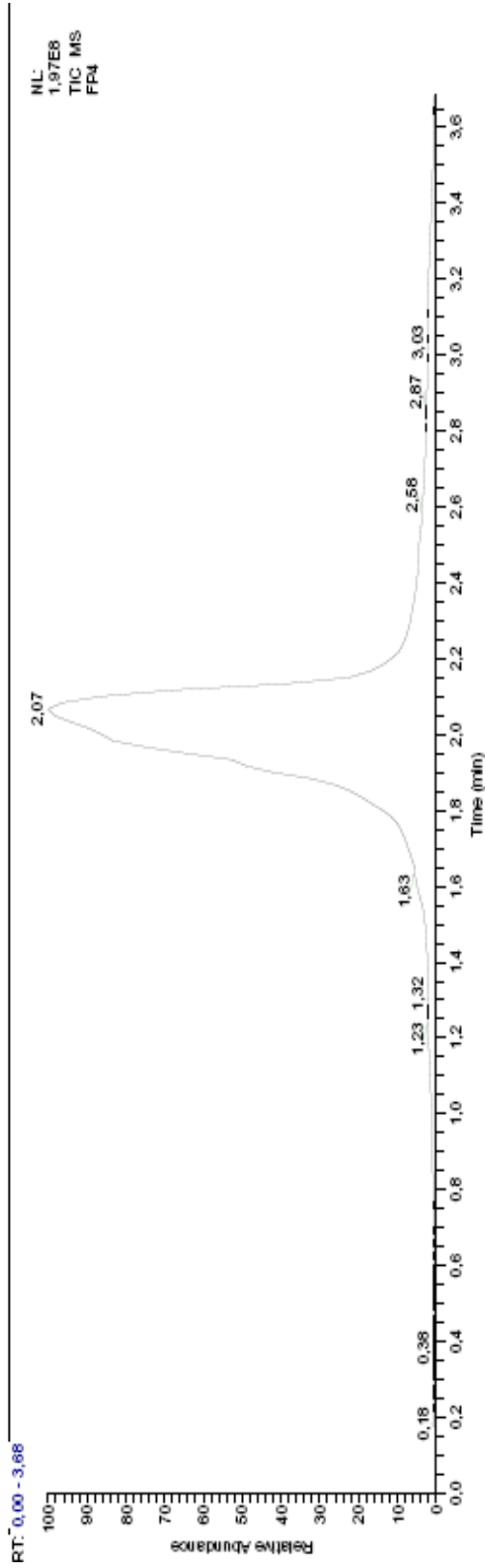


# Name Abs<750nm>  
 -----  
 1 M. gallinarum \*\*\*

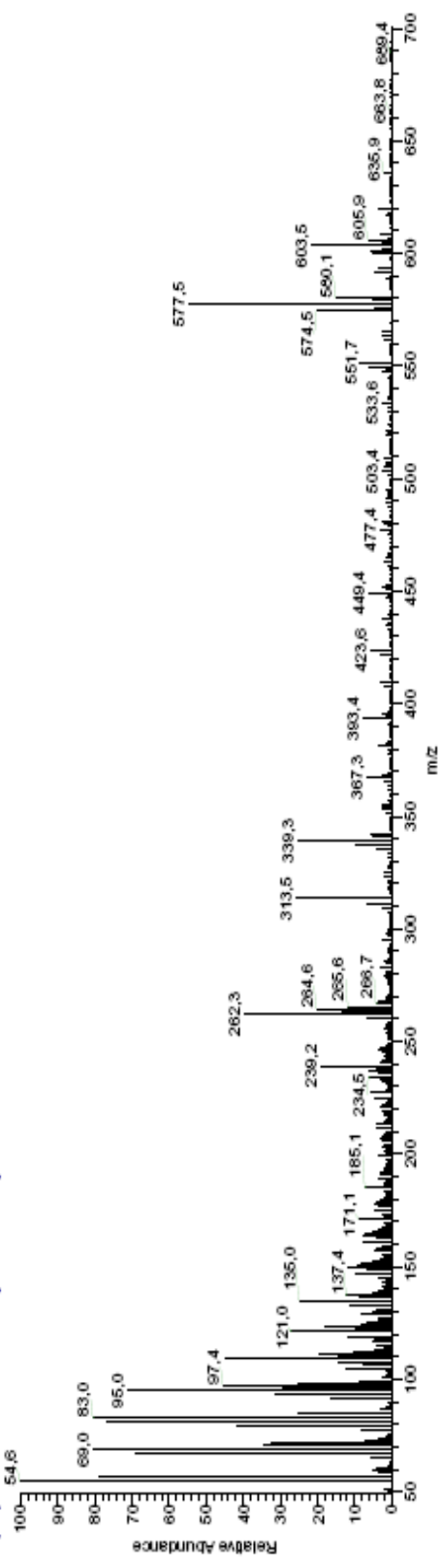
Report generated by : medicina

Signature: .....

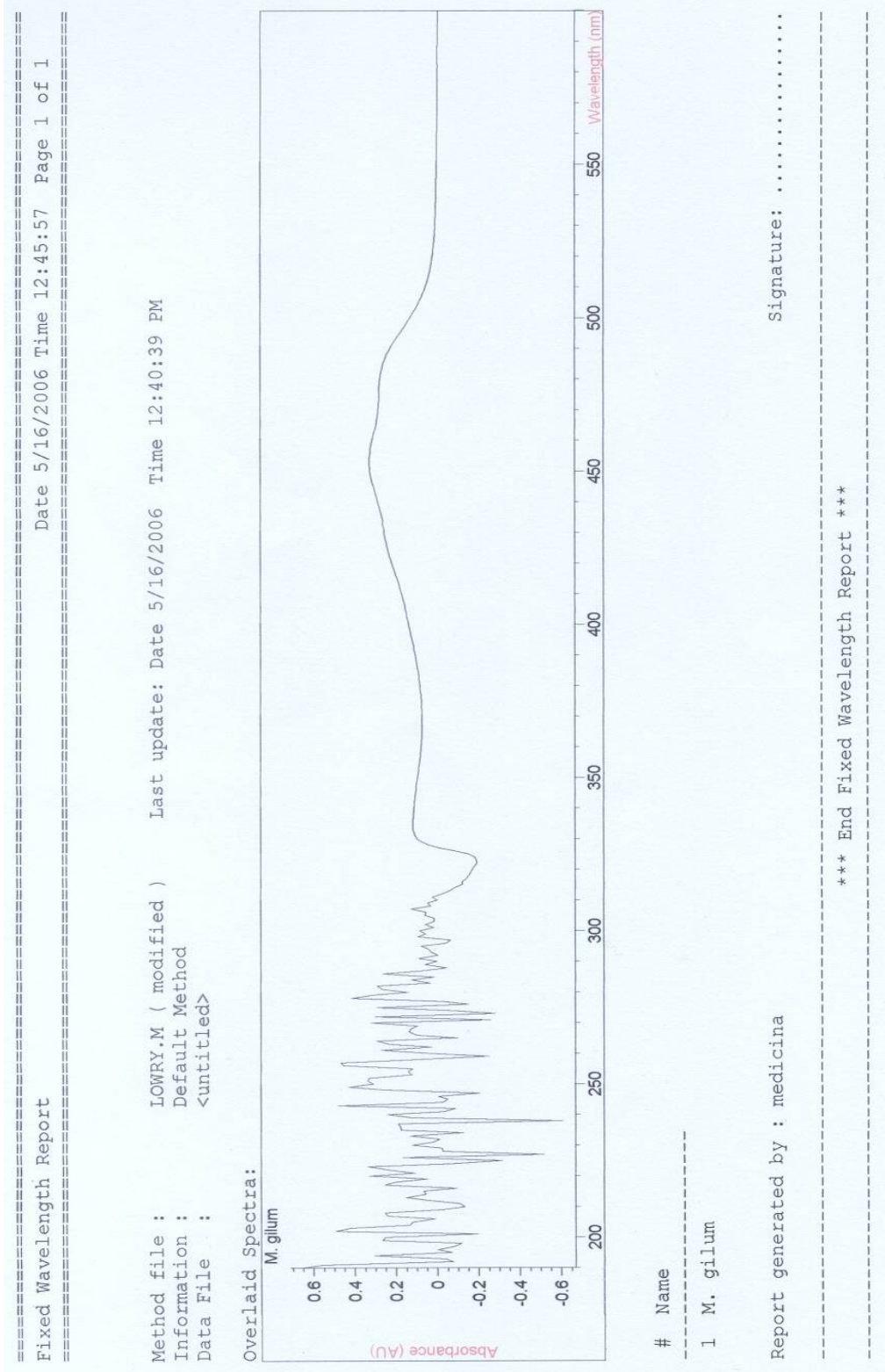
-----  
 \*\*\* End Fixed Wavelength Report \*\*\*



FP4 #117 RT: 2.05 AV: 1 NL: 9.11E6  
T: (0.0) + c EI det-450.00 Full ms [ 50.00-700.00]

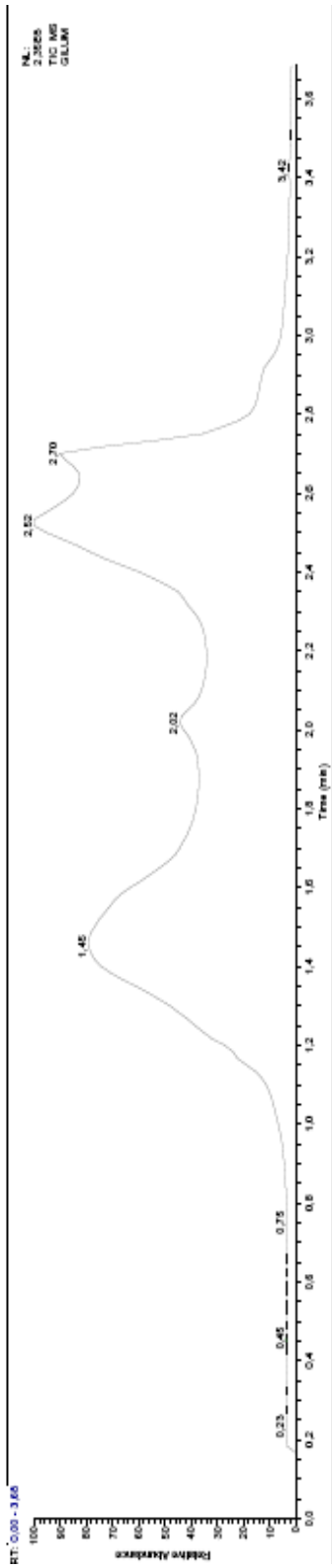


**Micobacterium gilvum.**

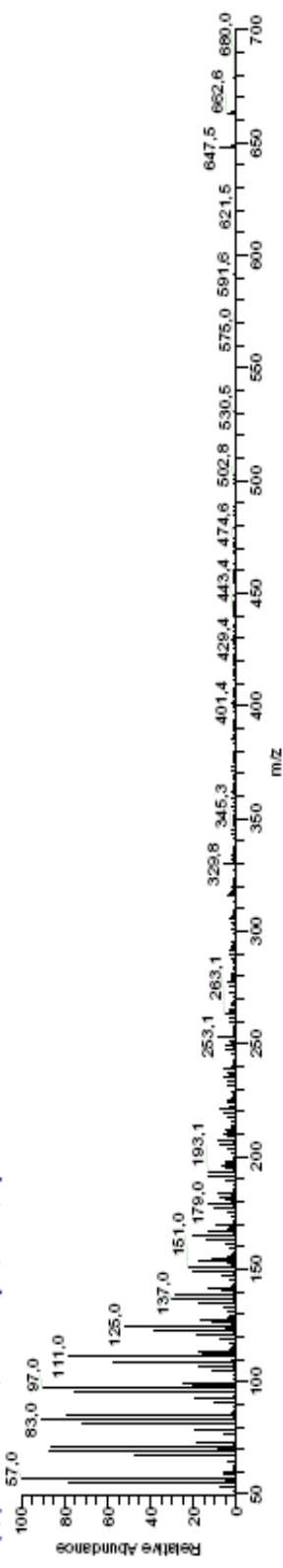


Woyogenanalis erit...GILUM

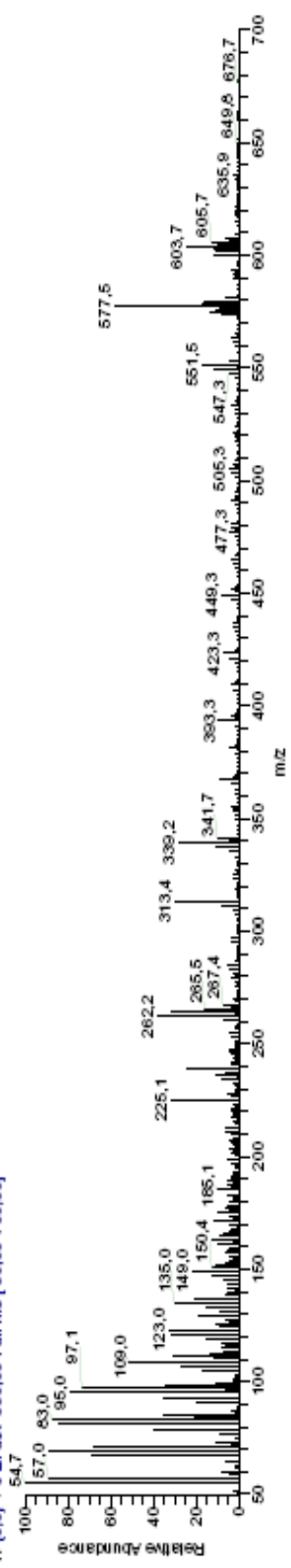
24/06/2008 14:43:12



GILUM #76-87 RT: 1.37-1.55 AV: 12 NL: 8,37E6  
T: (0.0) + c EI ds1-350,00 Full ms [50,00-700,00]

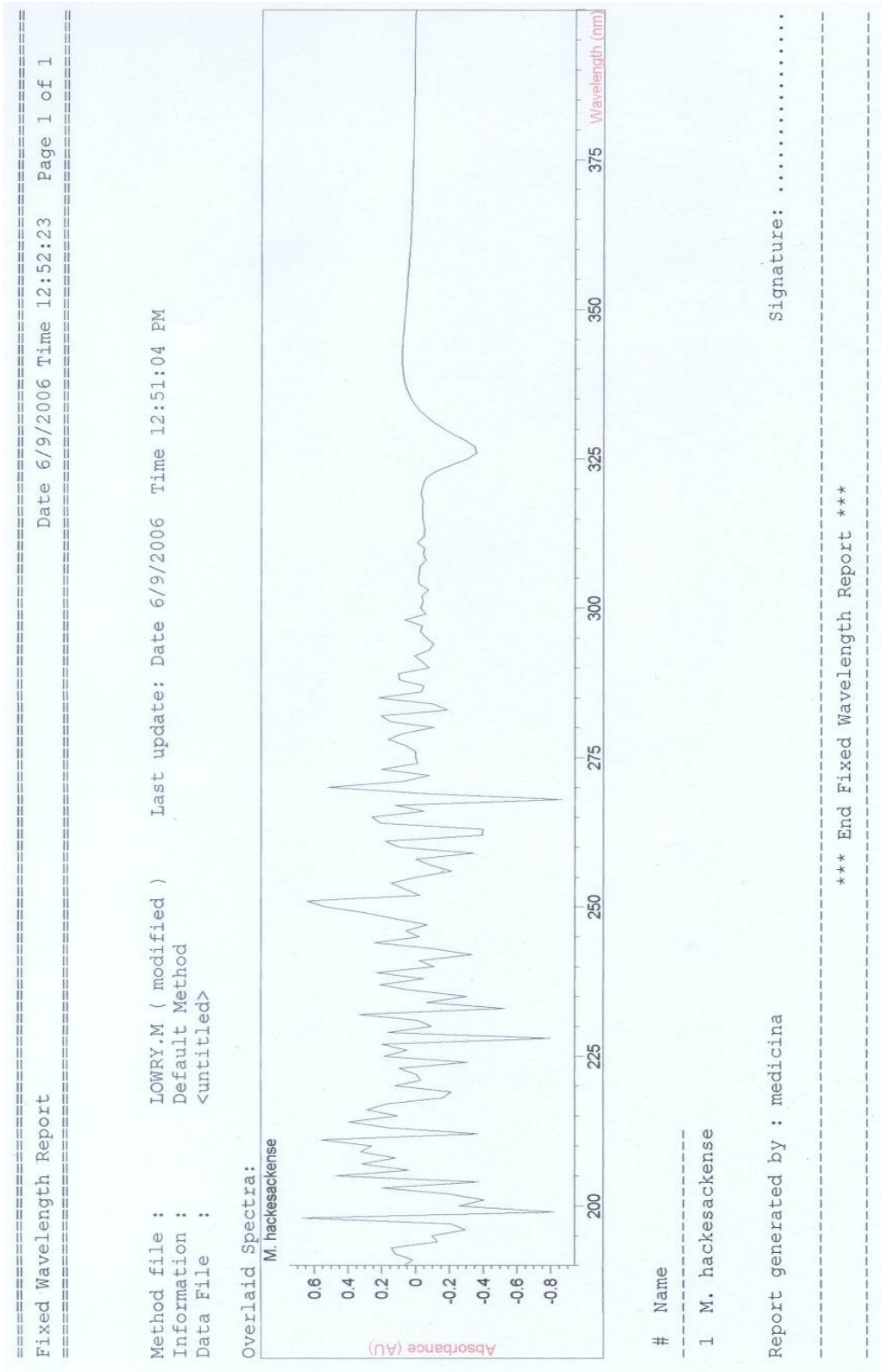


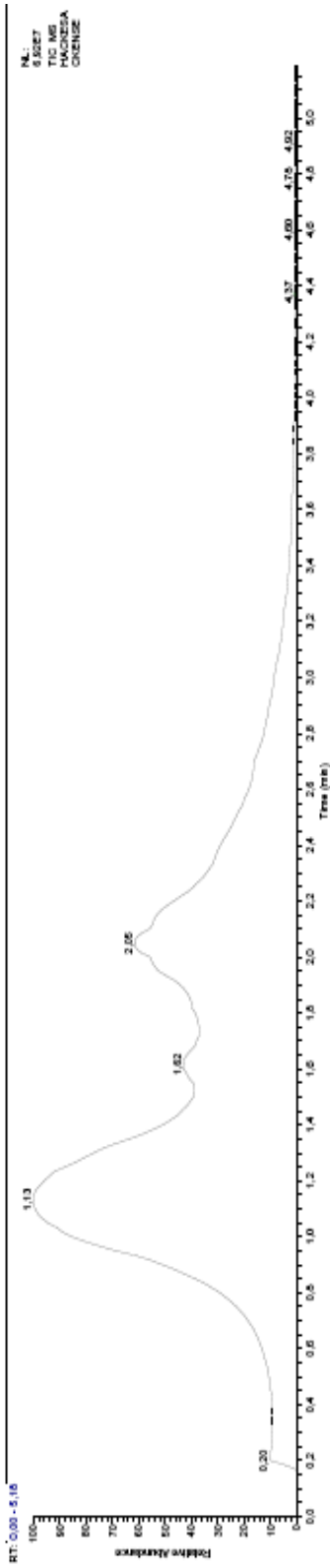
GILUM #141-150 RT: 2.45-2.60 AV: 10 NL: 7,96E6  
T: (0.0) + c EI ds1-350,00 Full ms [50,00-700,00]





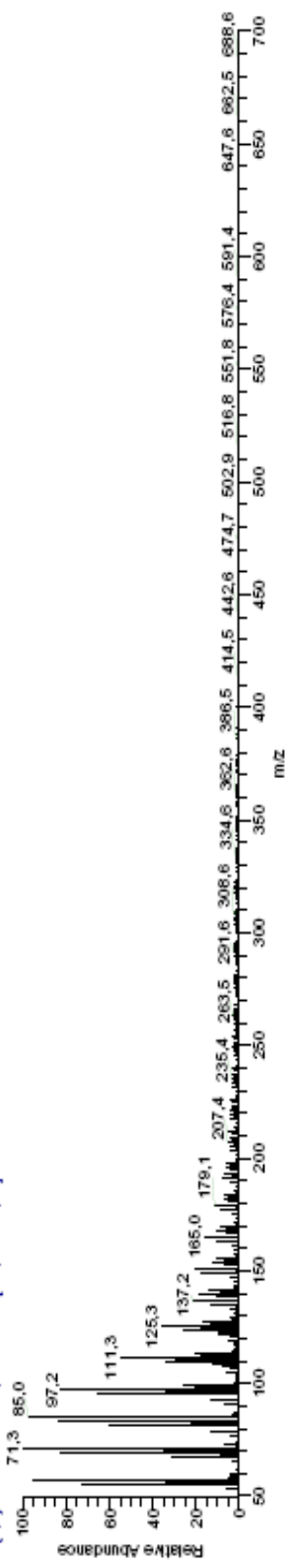
**Mycobacterium hackesackense.**





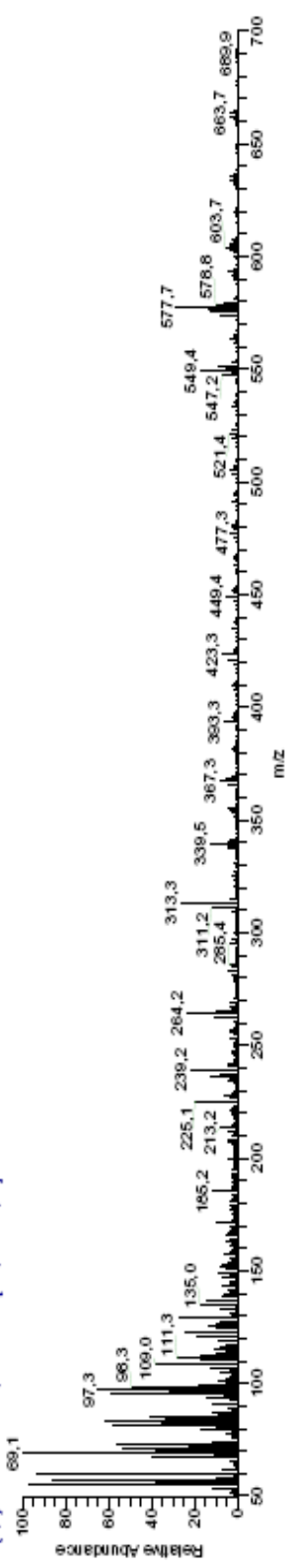
HACKESACKENSE #65-70 RT: 1.02-1.27 AV: 16 NL: 3.40E6

T: (0:0) + c EI 491-350.00 Full ms [50.00-700.00]



HACKESACKENSE #110-125 RT: 1.93-2.18 AV: 16 NL: 1.48E6

T: (0:0) + c EI 491-350.00 Full ms [50.00-700.00]

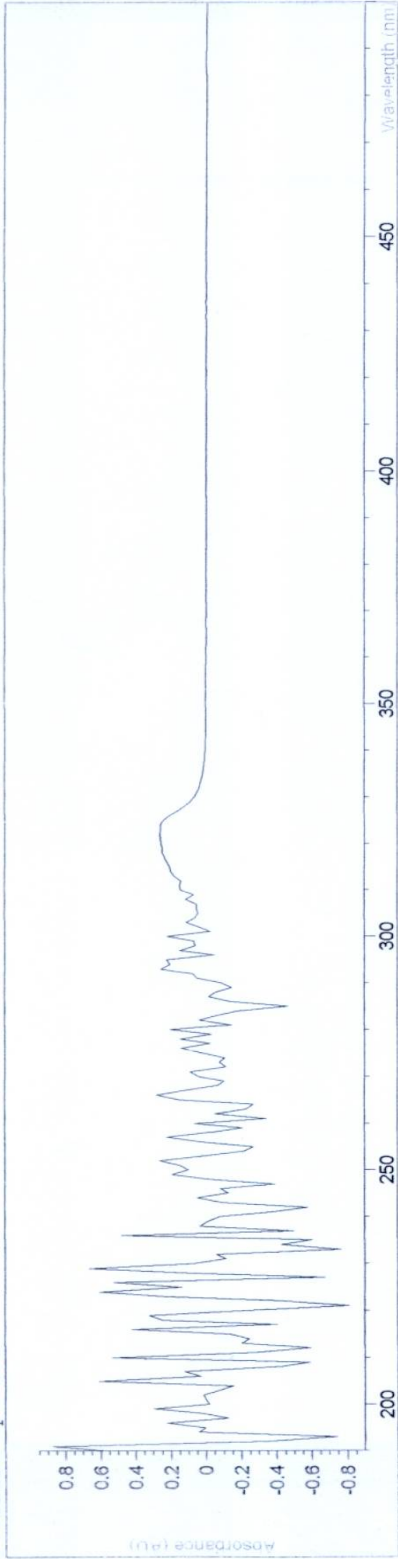


**Mycobacterium hodleri.**

=====  
Fixed Wavelength Report  
=====  
Date 4/7/2006 Time 12:52:11 Page 1 of 1  
=====

Method file : LOWRY.M ( modified )      Last update: Date 4/7/2006 Time 12:49:21 PM  
Information : Default Method  
Data File : <untitled>

Overlaid Spectra:

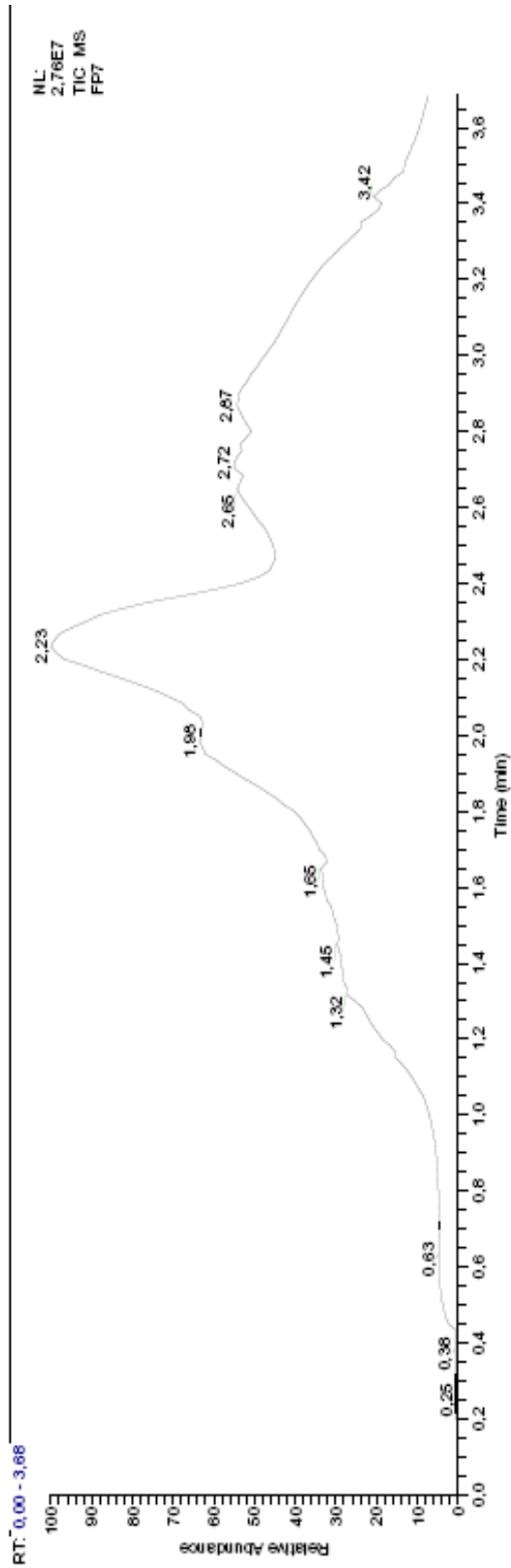


# Name      Abs<750nm>

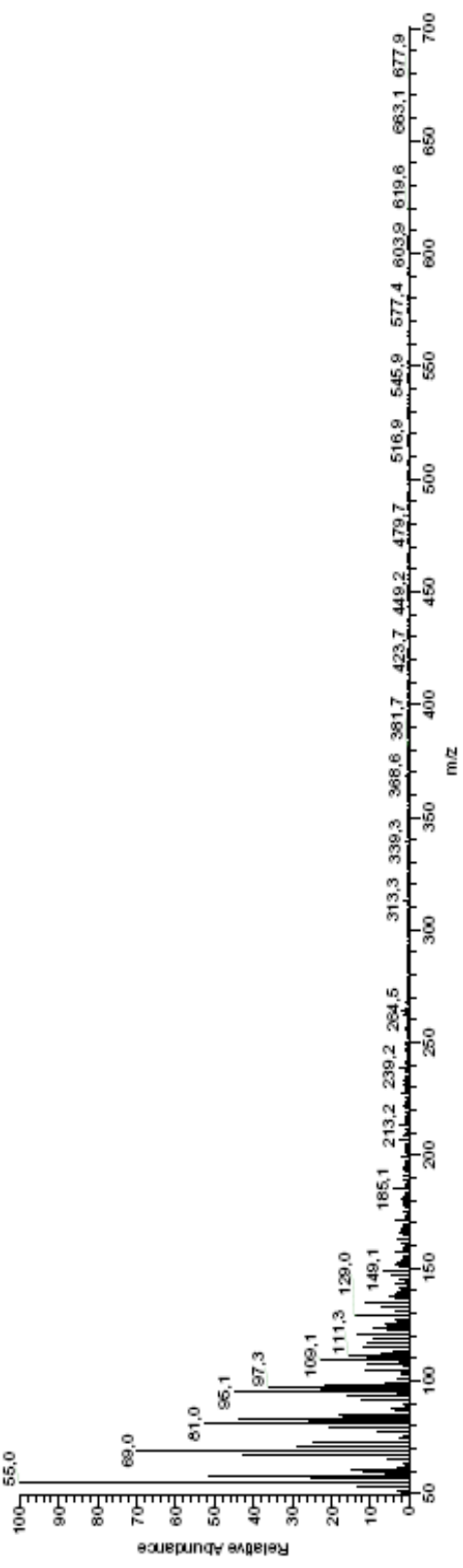
Report generated by : medicina

Signature: .....

=====  
\*\*\* End Fixed Wavelength Report \*\*\*  
=====



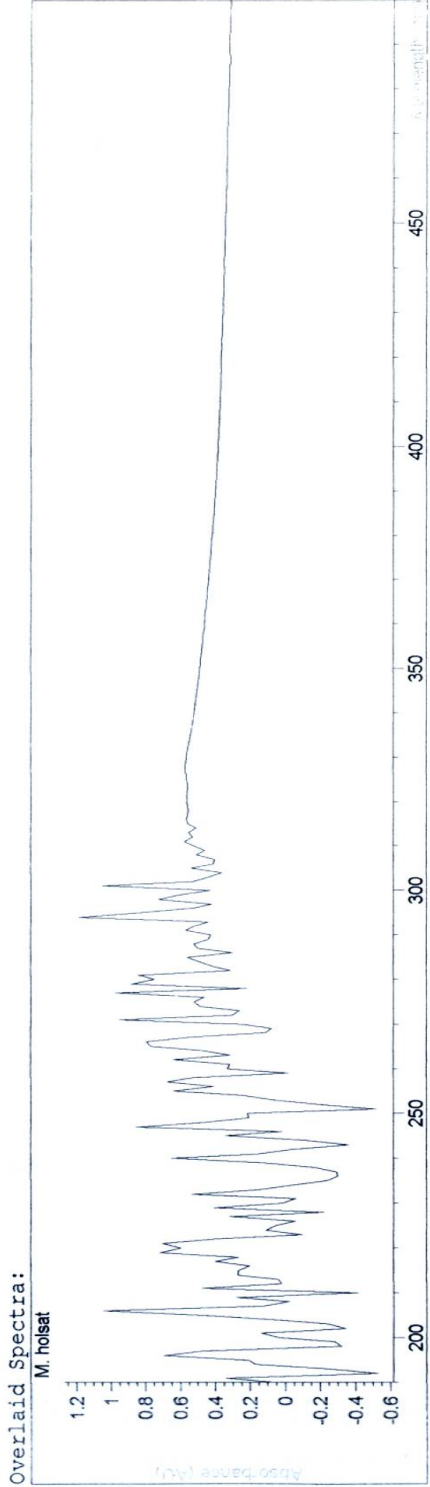
FP7 #124-133 RT: 2.17-2.32 AV: 10 NL: 2.17E6  
T: (0;0) + c EI del-450,00 Full ms [ 50,00-700,00]



**Mycobacterium holsaticum.**

=====  
Fixed Wavelength Report  
=====  
Date 4/7/2006 Time 12:55:36 Page 1 of 1  
=====

Method file : LOWRY.M ( modified )      Last update: Date 4/7/2006 Time 12:49:21 PM  
Information : Default Method  
Data File : <untitled>

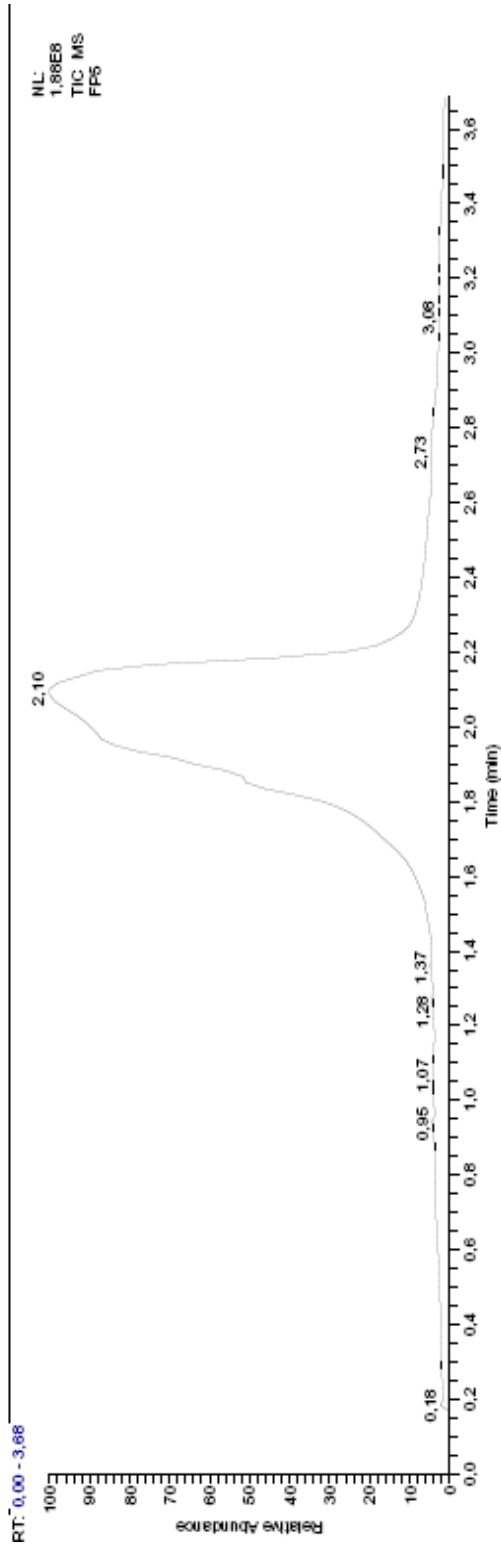


# Name      Abs<750nm>  
-----  
1 M. holsat      \*\*\*

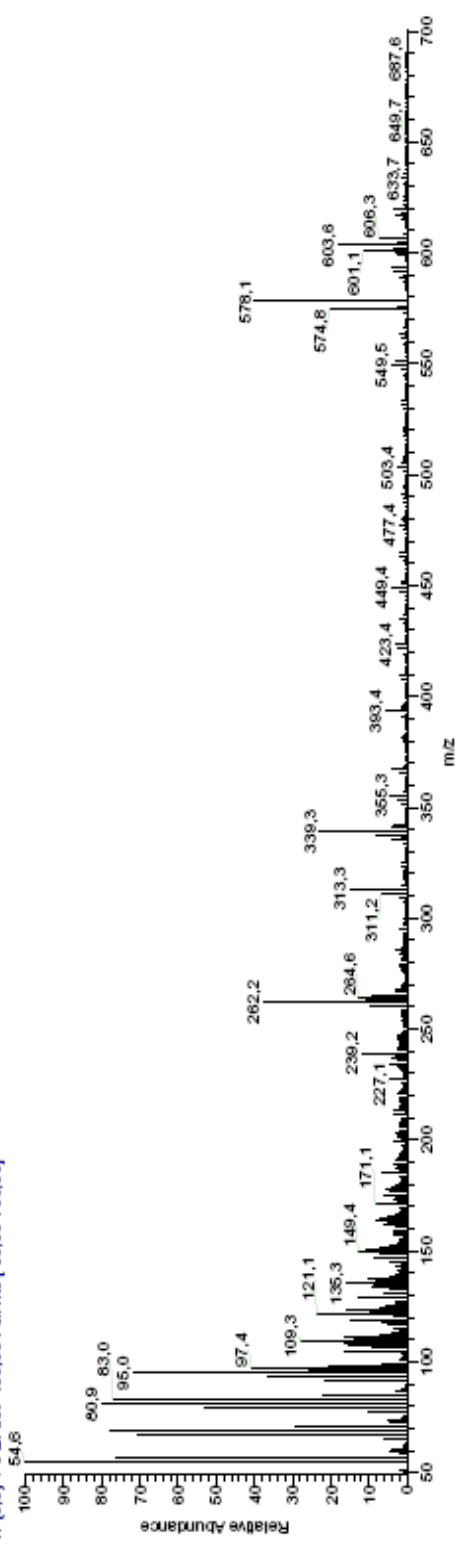
Report generated by : medicina

Signature: .....

=====  
\*\*\* End Fixed Wavelength Report \*\*\*  
=====



FPS:117-121 RT: 2.05-2.12 AV: 5 NL: 9.20E6  
T: [0.0] cEI det=450.00 Full ms [ 50,00-700,00]

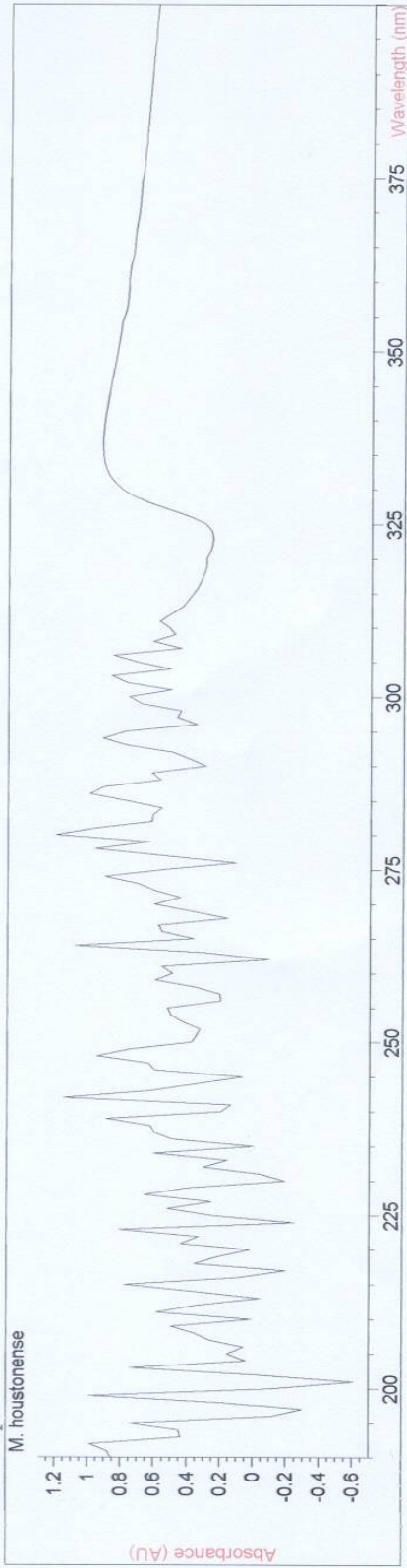


**Mycobacterium houstonense.**

=====  
Fixed Wavelength Report  
=====  
Date 6/27/2006 Time 13:30:10 Page 1 of 1  
=====

Method file : LOWRY.M ( modified )      Last update: Date 6/27/2006 Time 1:28:58 PM  
Information : Default Method  
Data File : <untitled>

Overlaid Spectra:



# Name

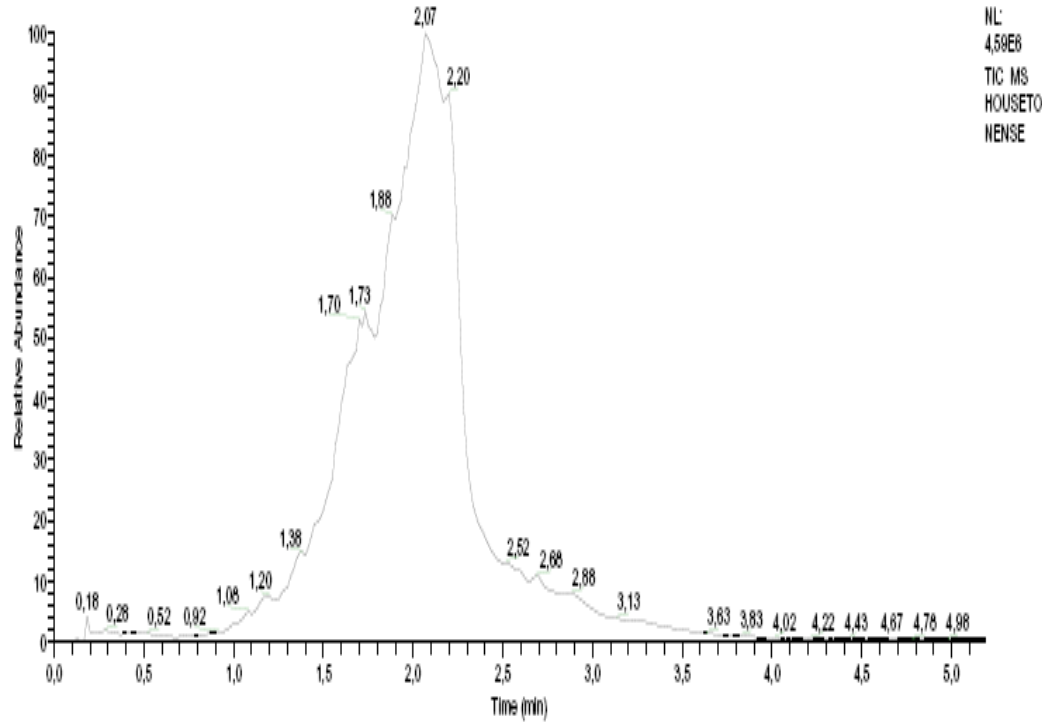
-----  
1 M. houstonense

Report generated by : medicina

Signature: .....

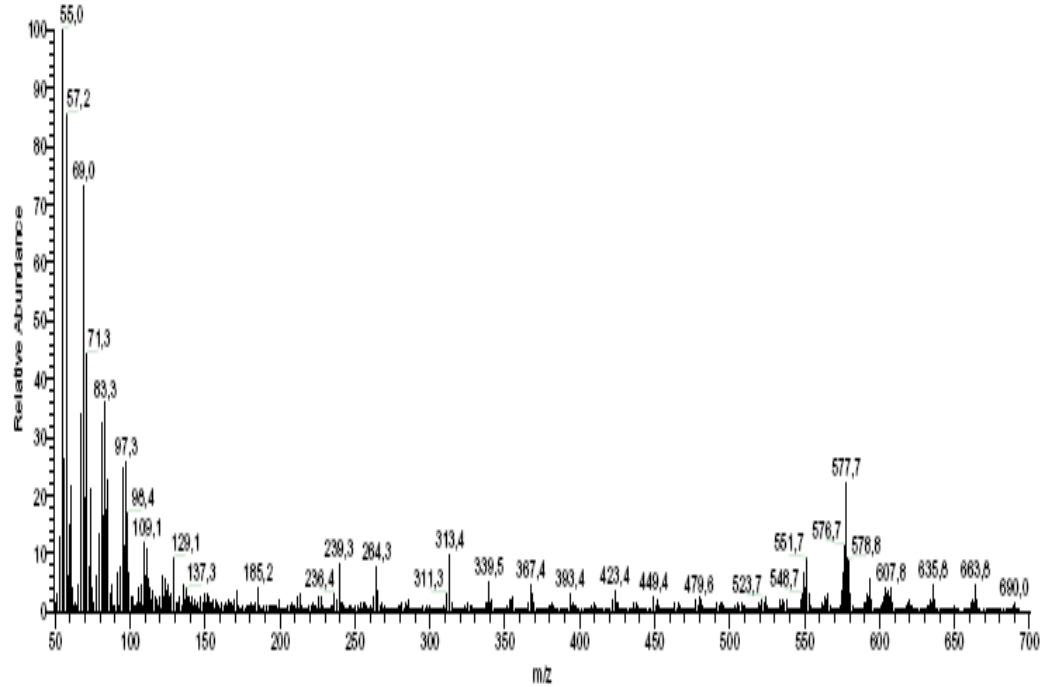
-----  
\*\*\* End Fixed Wavelength Report \*\*\*  
-----

RT: 0,00 - 5,18



HOUSETONENSE #113-120 RT: 1,98-2,10 AV: 8 NL: 3,13E5

T: (0,0) + c EI del=350,00 Full ms [ 50,00-700,00]

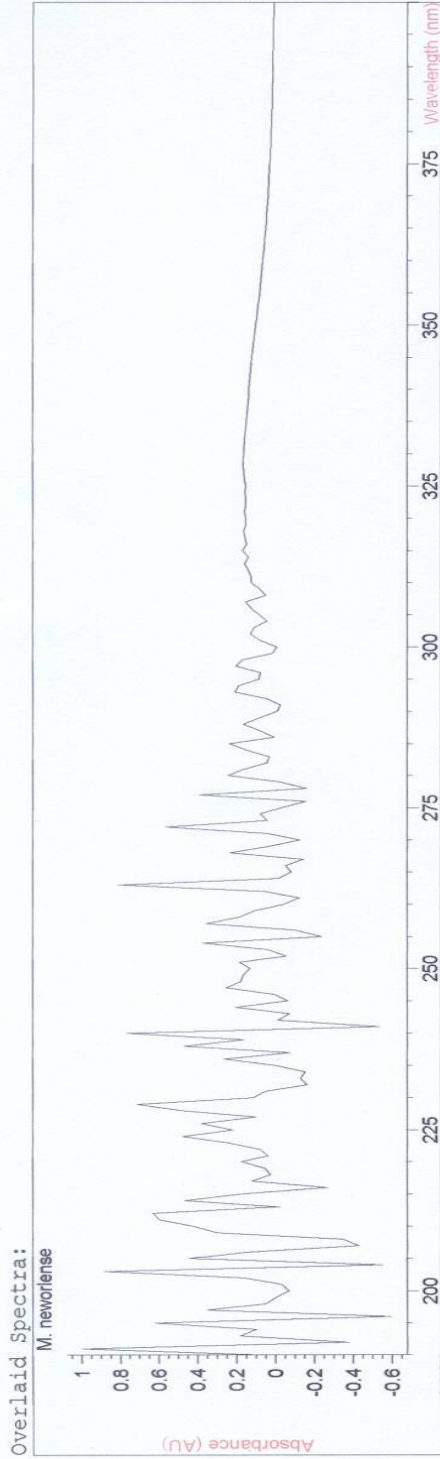




**Mycobacterium neworleansense.**

=====  
Fixed Wavelength Report  
=====  
Date 5/19/2006 Time 12:54:30 Page 1 of 1

Method file : LOWRY.M ( modified )      Last update: Date 5/19/2006 Time 12:47:38 PM  
Information : Default Method  
Data File : <untitled>

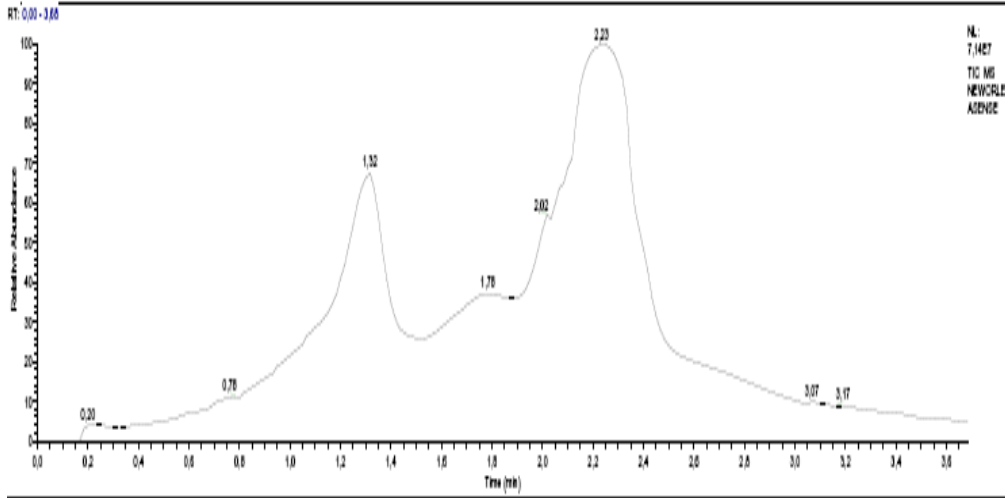


# Name  
-----  
1 M. neworlense

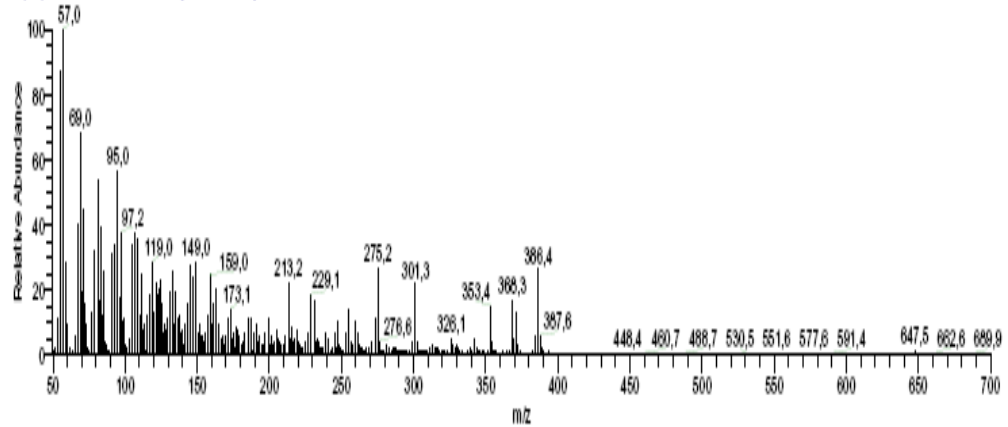
Report generated by : medicina

Signature: .....

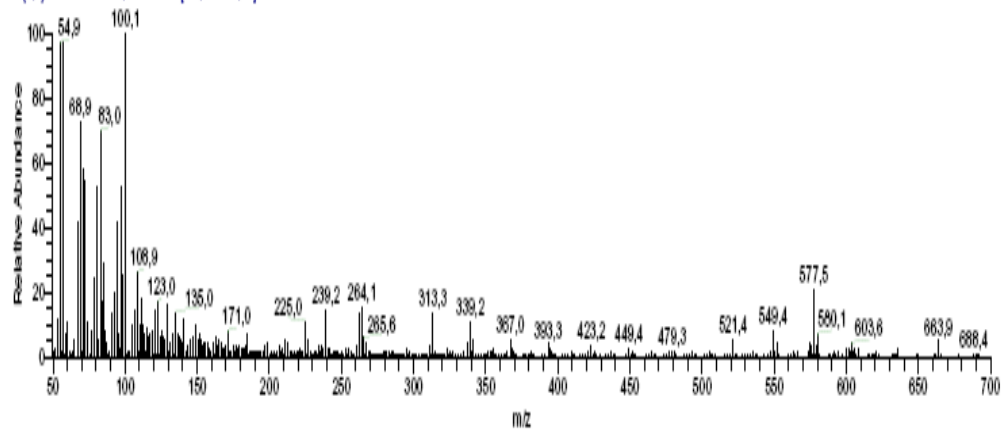
-----  
\*\*\* End Fixed Wavelength Report \*\*\*  
-----



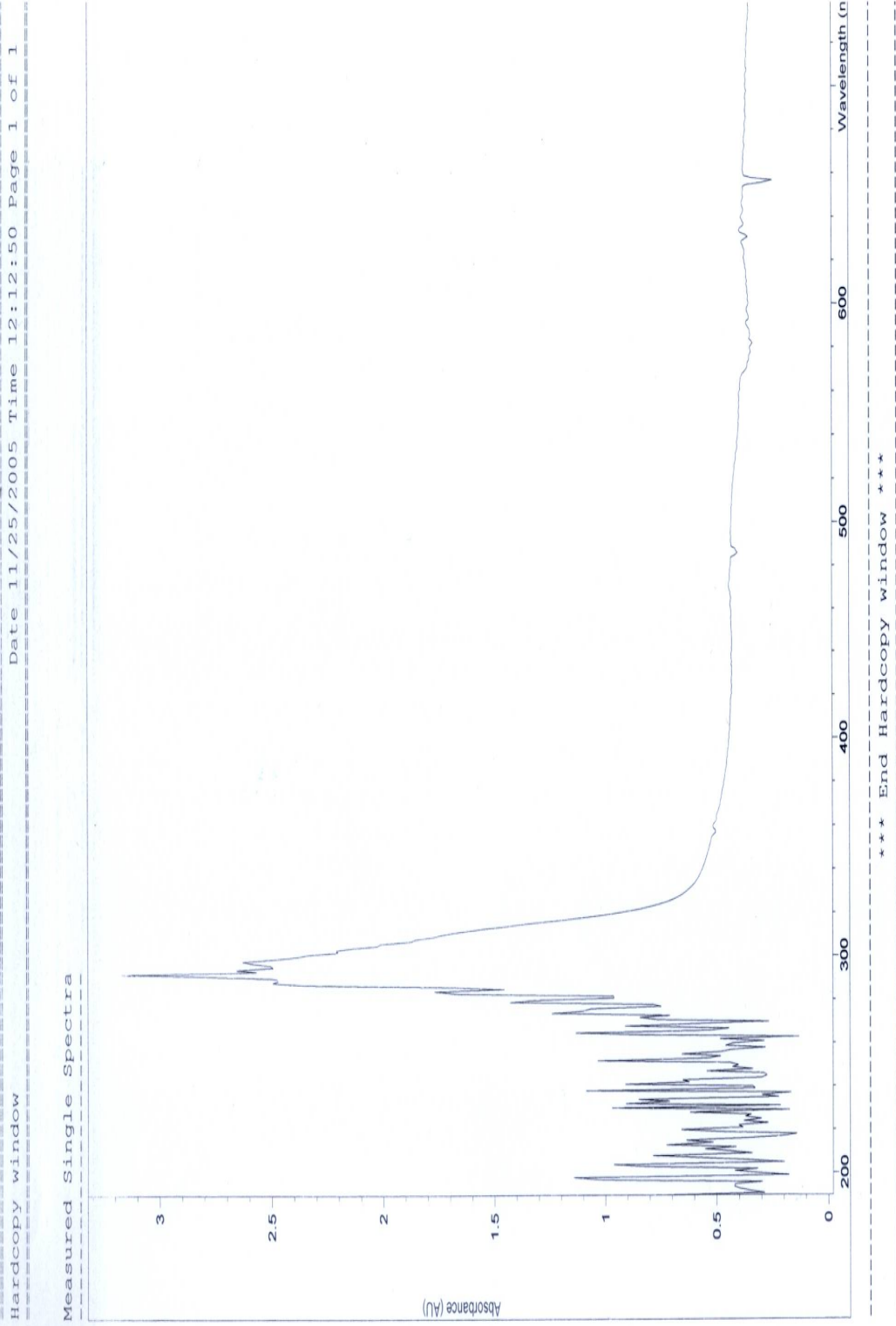
NEWORLEAENSE #89-75 RT: 1.25-1.35 AV: 7 NL: 1,95E6  
T: (0,0) +c EI del=350,00 Full ms [50,00-700,00]



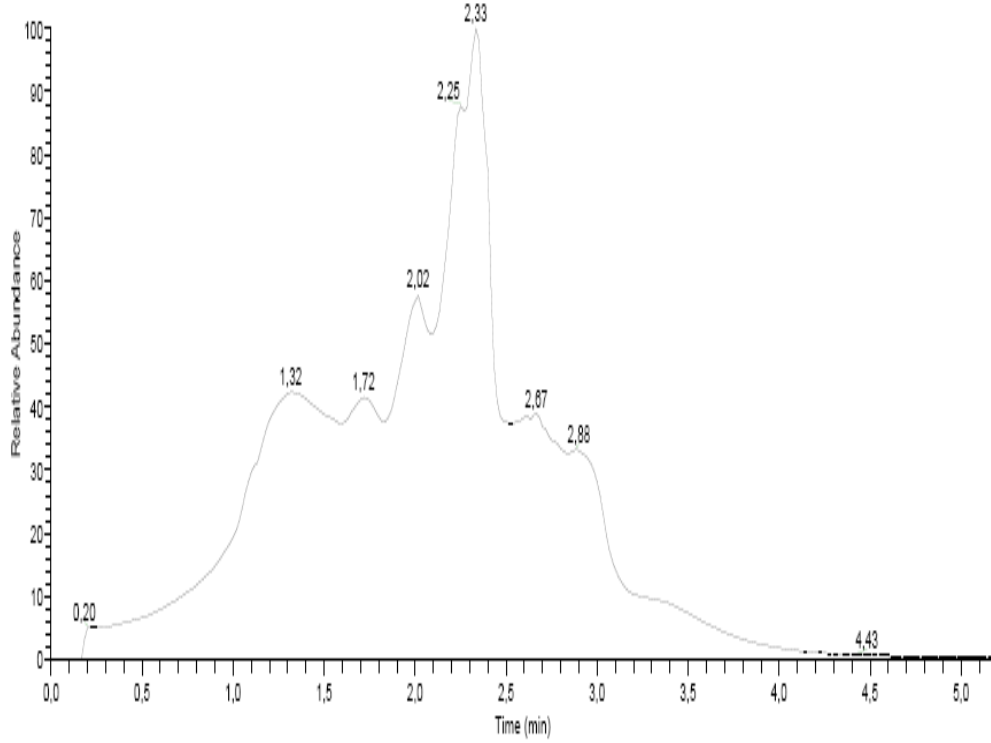
NEWORLEAENSE #121-135 RT: 2.12-2.35 AV: 15 NL: 3,45E6  
T: (0,0) +c EI del=350,00 Full ms [50,00-700,00]



**Mycobacterium phlei.**



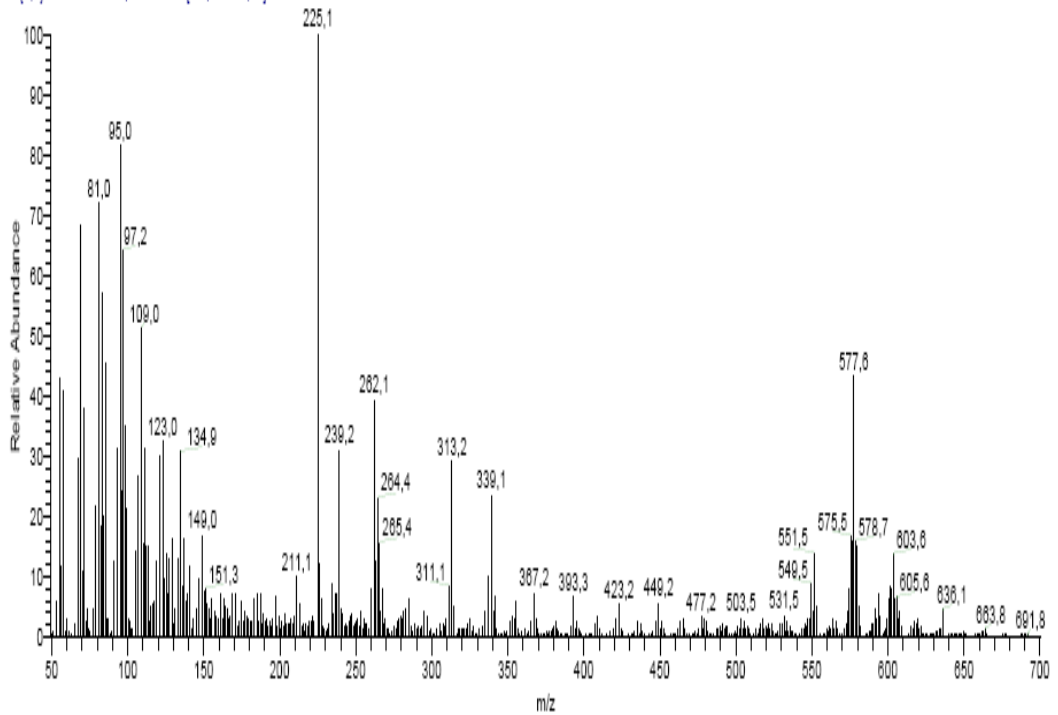
RT: 0,00 - 5,18



NL:  
1,33E9  
TIC MS  
MPHLI

MPHLI #132 RT: 2,30 AV: 1 NL: 4,84E8

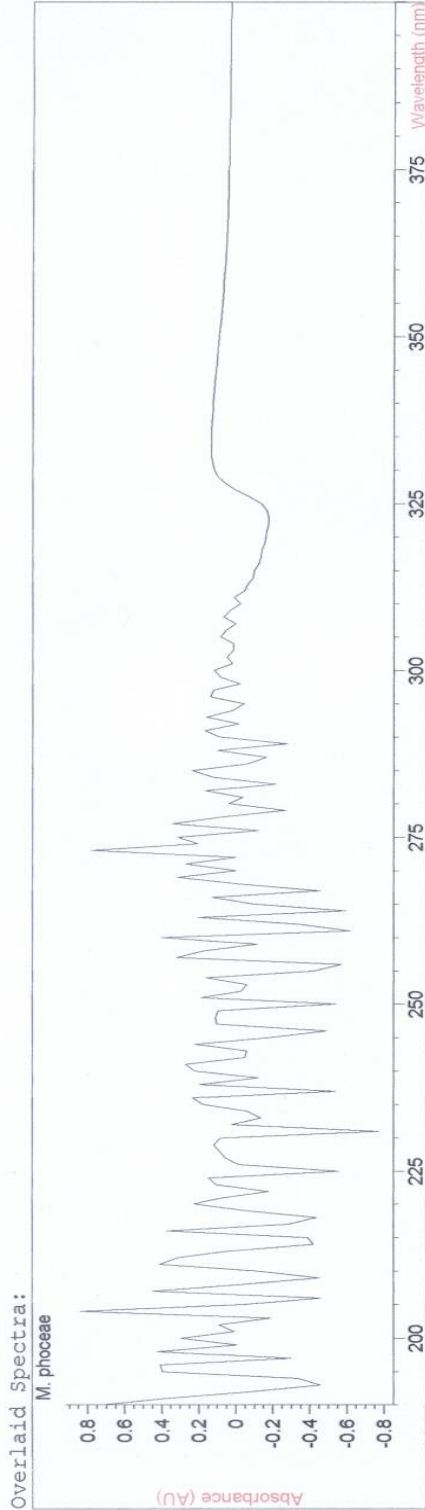
T: (0,0) + c EI det=360,00 Full ms [ 60,00-700,00]



**Mycobacterium phoceae.**

=====  
Fixed Wavelength Report  
=====  
Date 7/25/2006 Time 10:21:47 Page 1 of 1  
=====

Method file : LOWRY.M ( modified )      Last update: Date 7/25/2006 Time 9:40:05 AM  
Information : Default Method  
Data File : <untitled>

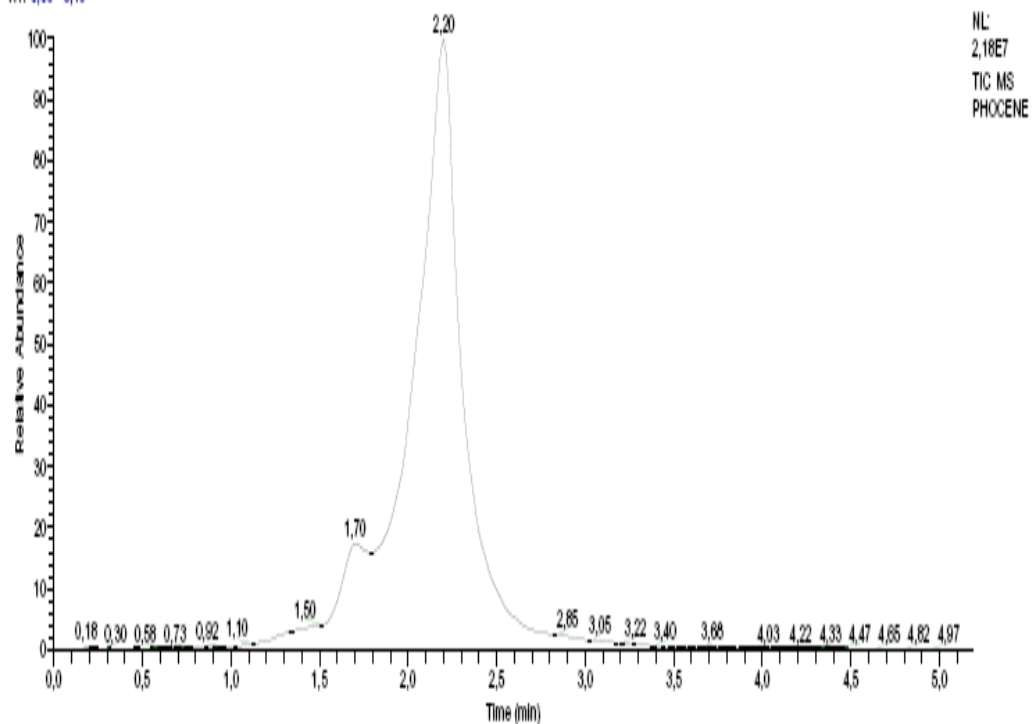


# Name -----  
1 M. phoceae

Report generated by : medicina      Signature: .....

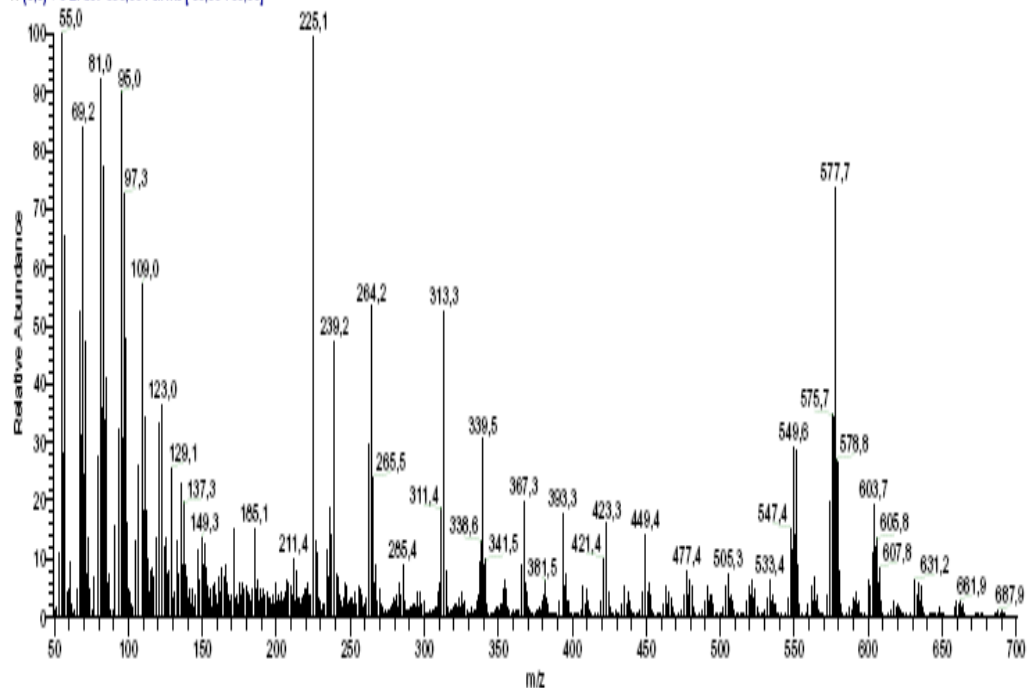
-----  
\*\*\* End Fixed Wavelength Report \*\*\*  
-----

RT: 0,00 - 5,18



PHOCENE #125 RT: 2,18 AV: 1 NL: 5,81E5

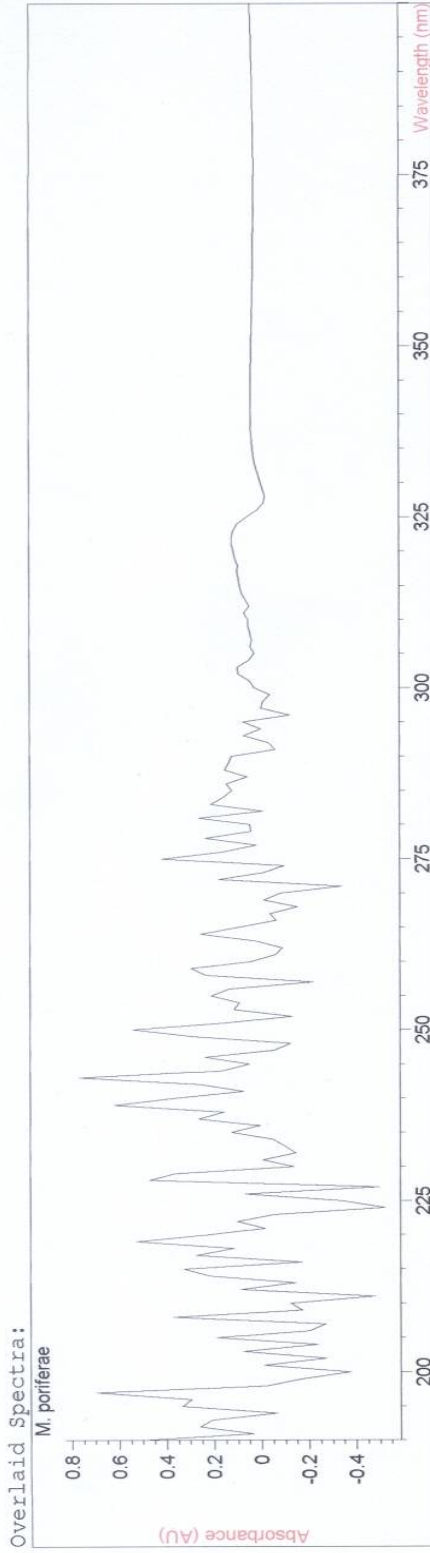
T: (0,0) + c EI det=350,00 Full ms [ 50,00-700,00]



**Mycobacterium poriferae.**

=====  
Fixed Wavelength Report  
=====  
Date 6/9/2006 Time 12:56:53 Page 1 of 1

Method file : LOWRY.M ( modified )      Last update: Date 6/9/2006 Time 12:51:04 PM  
Information : Default Method  
Data File : <untitled>



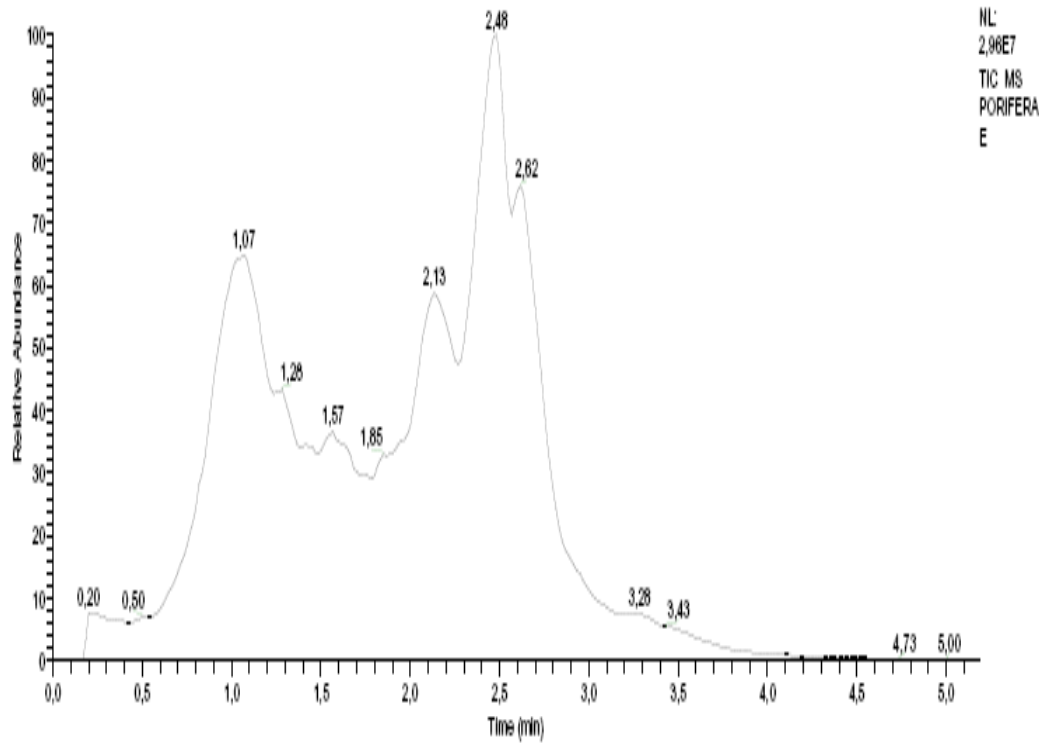
# Name  
-----  
1 M. poriferae

Report generated by : medicina

Signature: .....

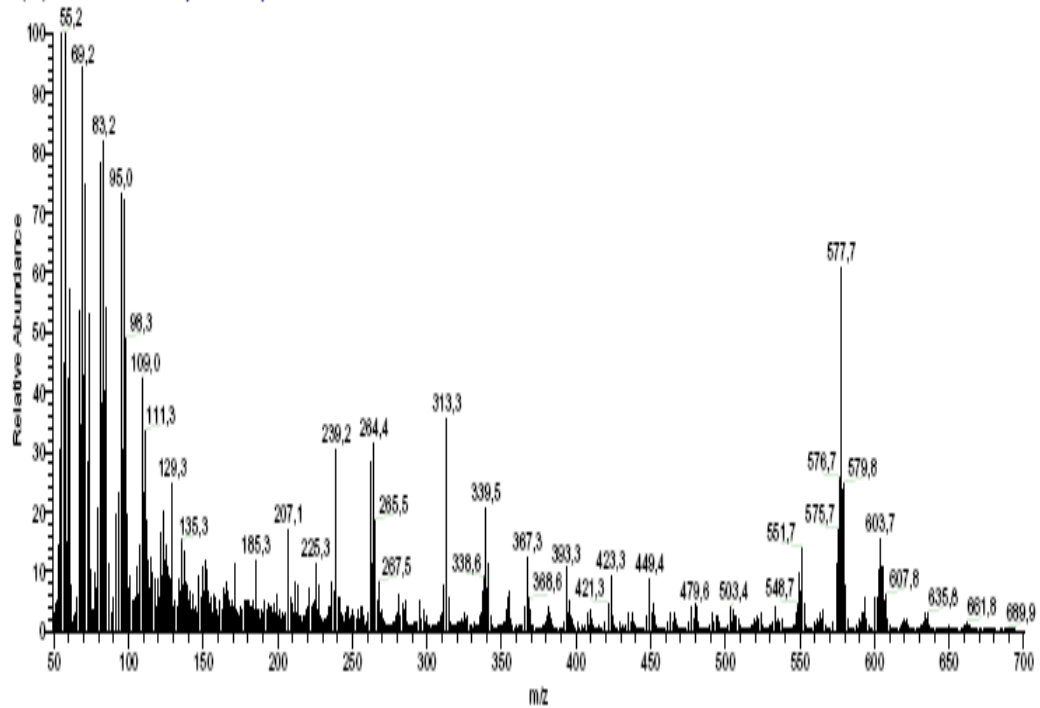
-----  
\*\*\* End Fixed Wavelength Report \*\*\*  
-----

RT: 0,00 - 5,18



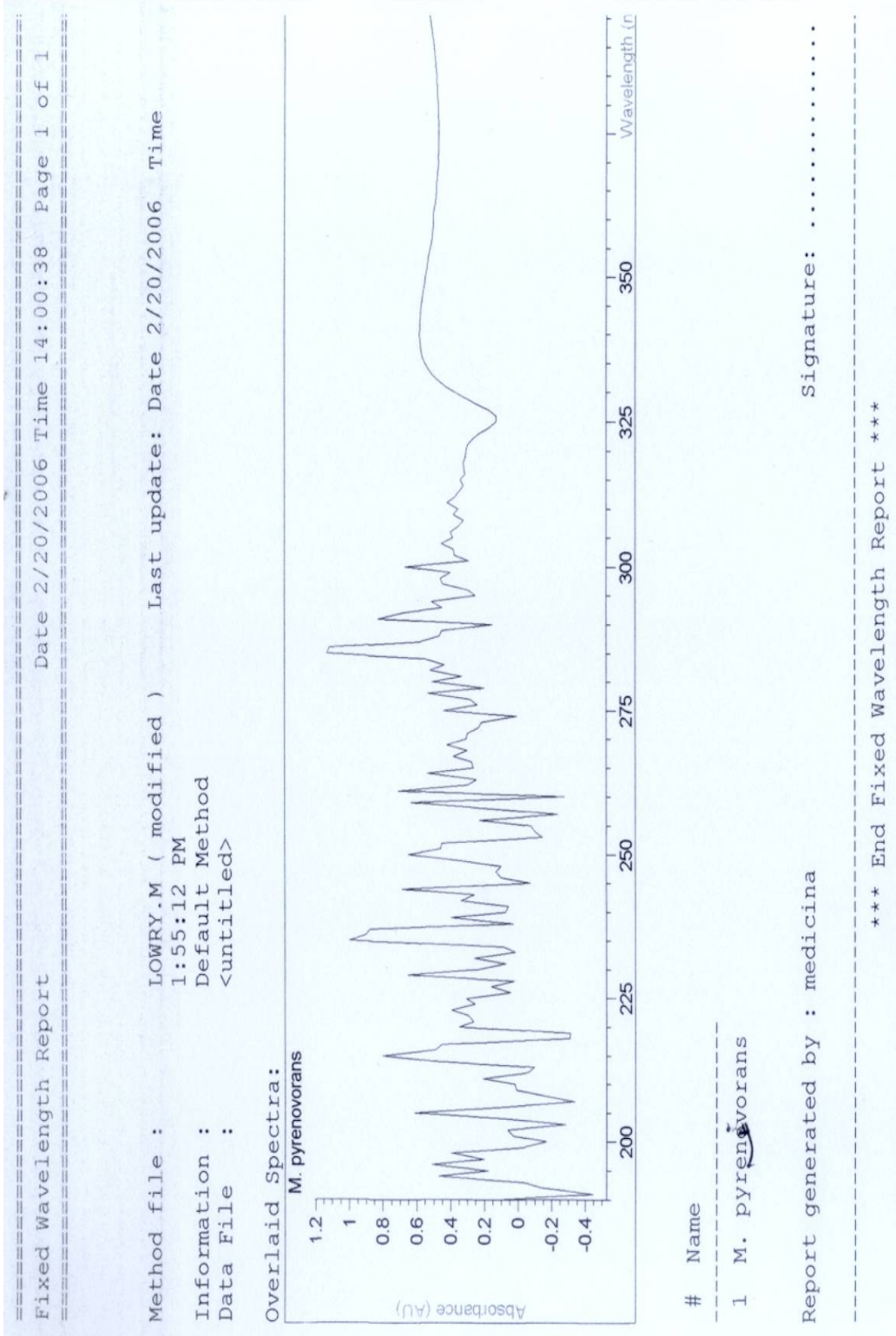
PORIFERA#141 RT: 2.45 AV: 1 NL: 8,44E5

T: (0,0) + c El det=350,00 Full ms [ 50,00-700,00]

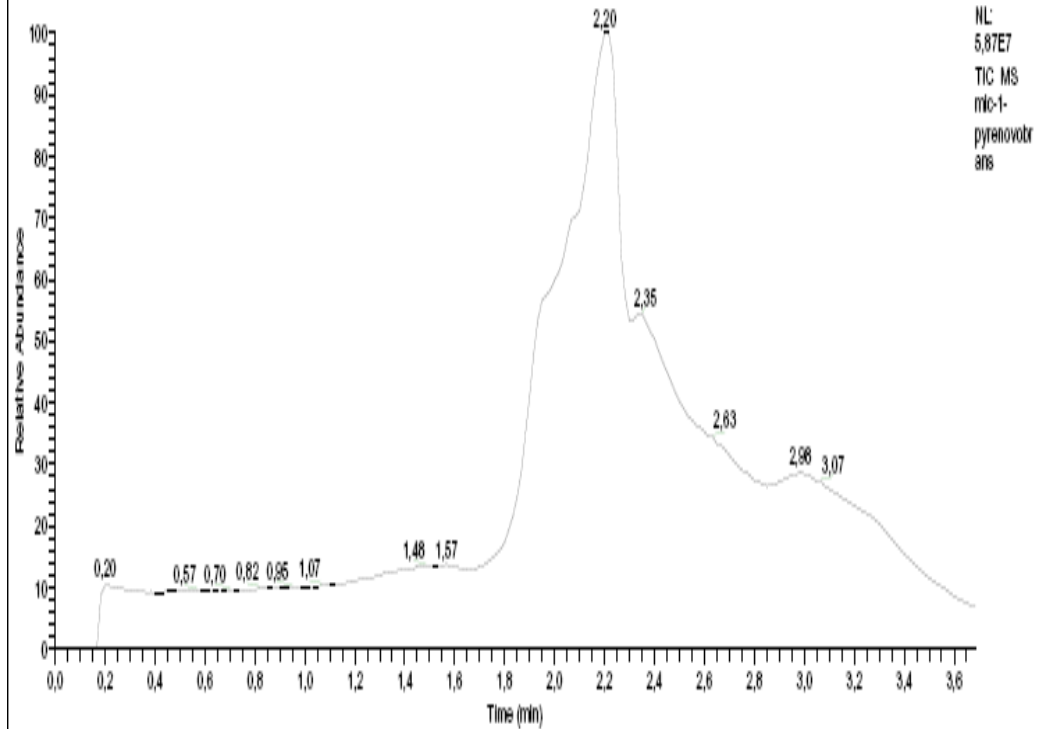




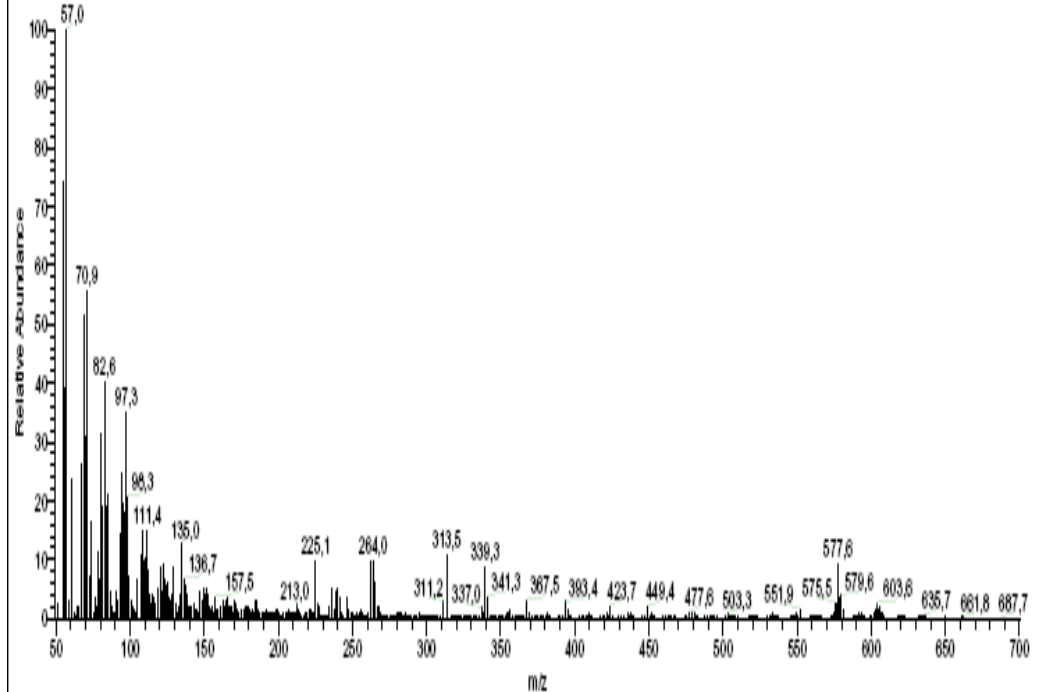
**Mycobacterium pyrenivorans.-**



RT: 0,00 - 3,68



mic-1-pyrenovobrans #128 RT: 2.20 AV: 1 NL: 4.41E8  
T: (0.0) + c EI del=450.00 Full ms [ 50.00-700.00]



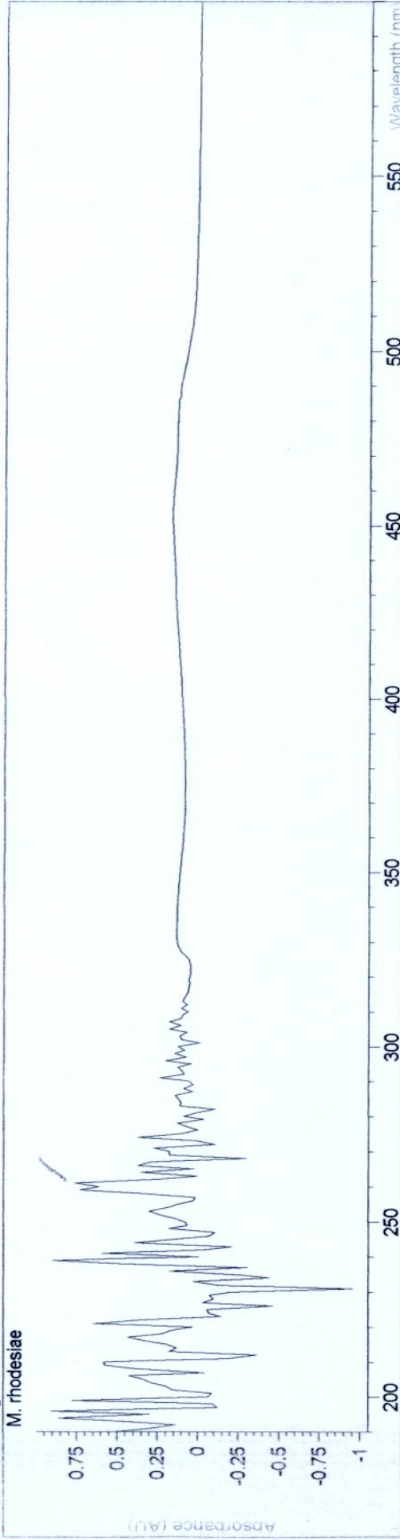
**Mycobacterium rhodesiae.-**

=====  
Fixed Wavelength Report  
=====

DPage 1 of 16 Time 13:40:41

Method file : LOWRY.M ( modified )      Last update: Date 4/5/2006    Time 1:35:34 PM  
Information :    Default Method  
Data File :    <untitled>

Overlaid Spectra:  
M. rhodesiae      *rhodesiae*



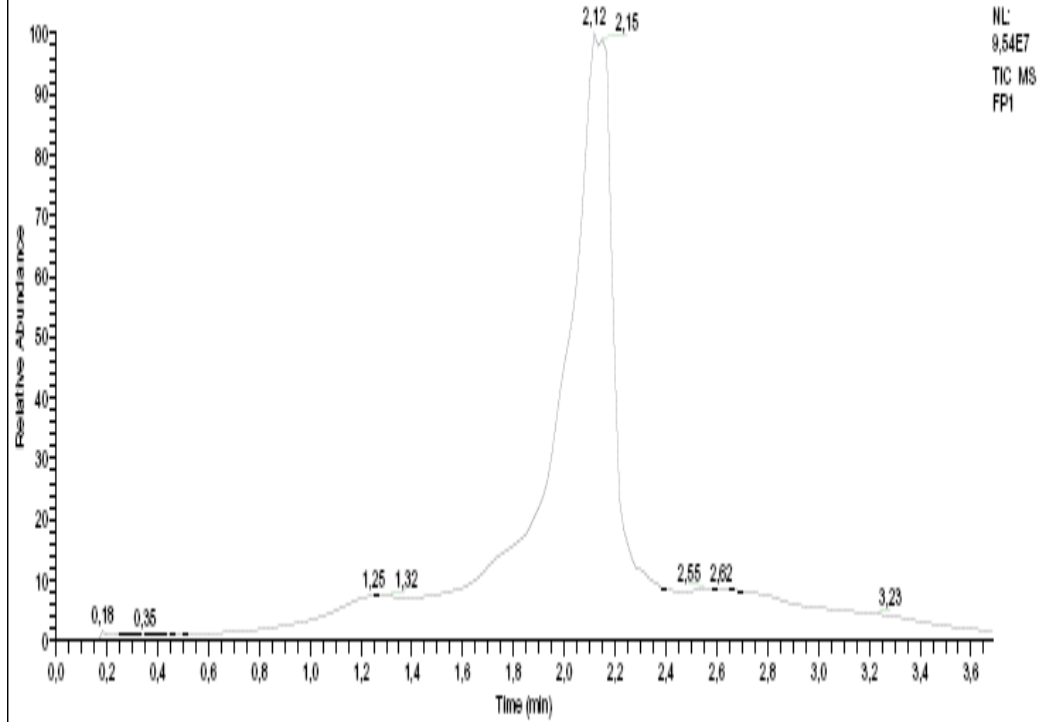
# Name                    Abs<750nm>  
-----  
1 M. rhodesiae            \*\*\*

Report generated by : medicina

Signature: .....

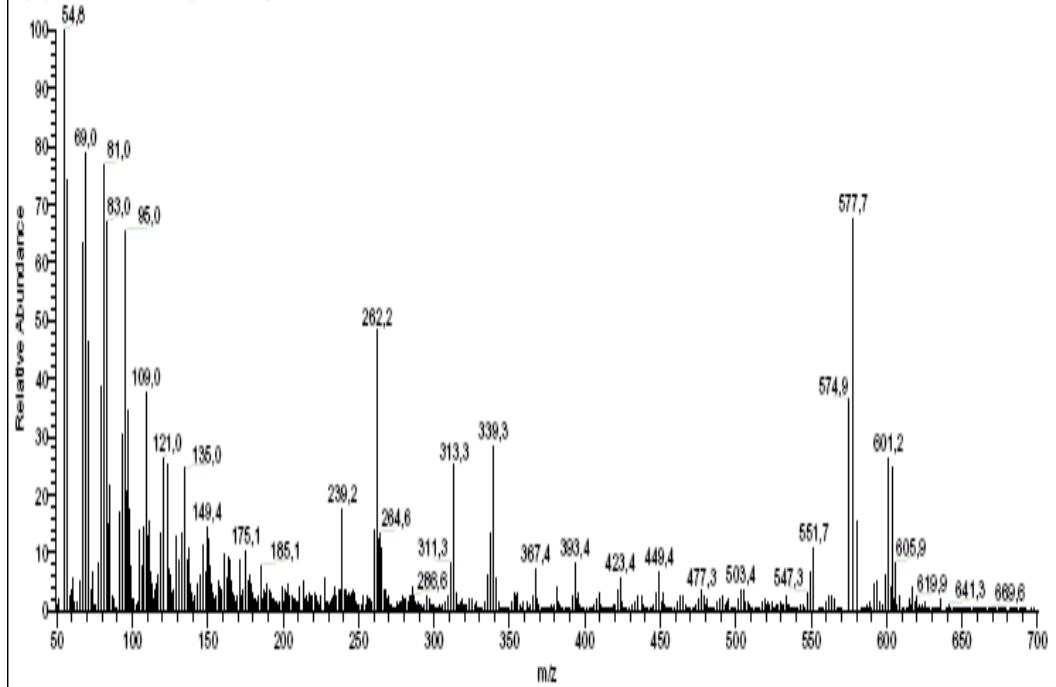
=====  
\*\*\* End Fixed Wavelength Report \*\*\*  
=====

RT: 0,00 - 3,68



FP1 #121 RT: 2.12 AV: 1 NL: 4,35E8

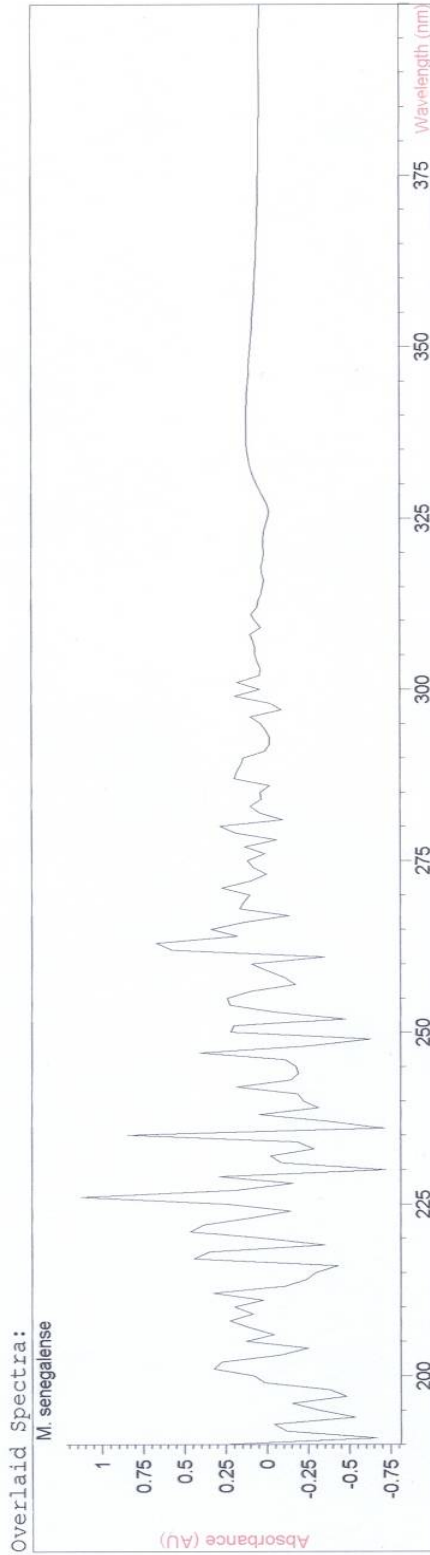
T: (0,0) + c El det=450,00 Full ms [ 50,00-700,00]



**Mycobacterium senegalense.-**

=====  
Fixed Wavelength Report  
=====  
Date 6/9/2006 Time 12:54:26 Page 1 of 1  
=====

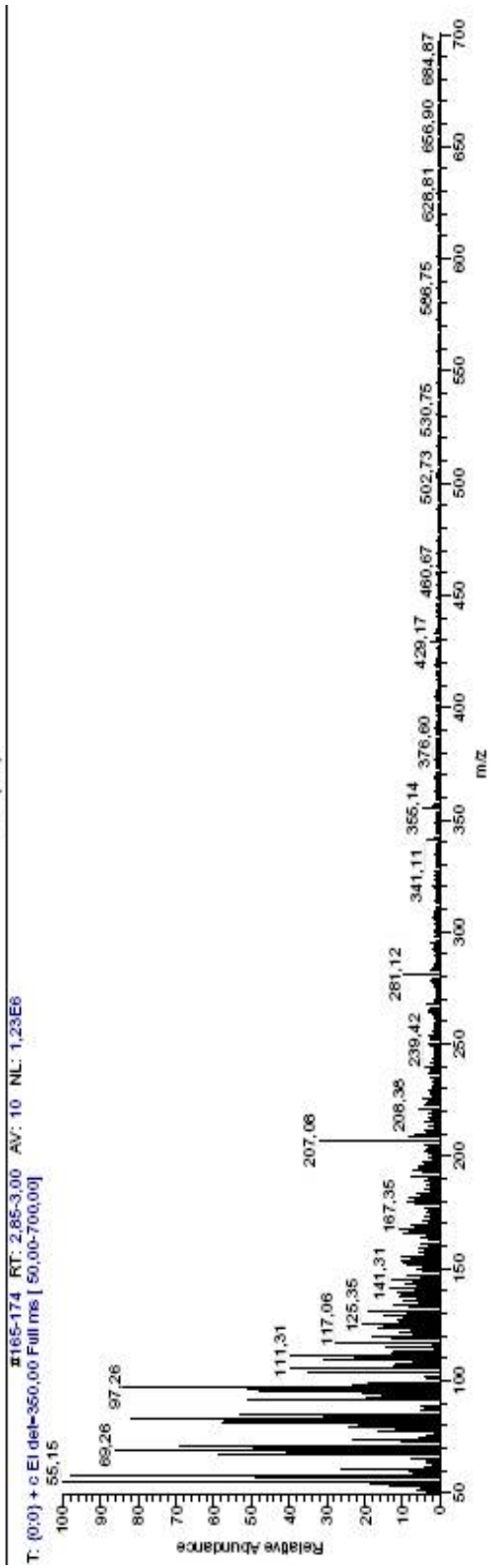
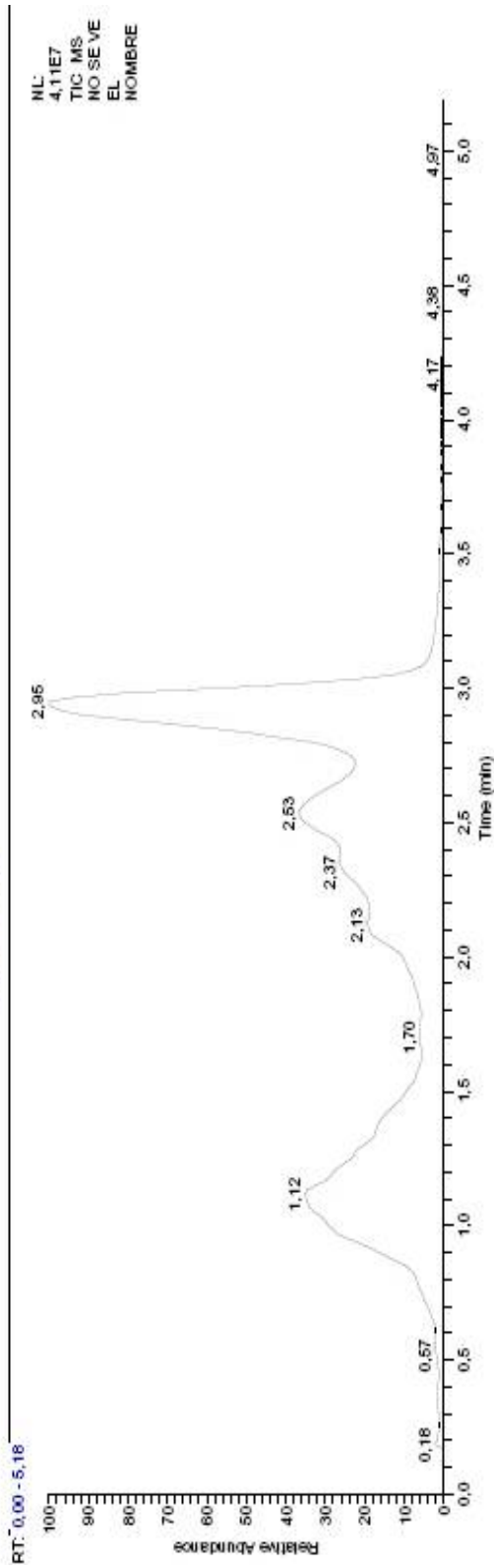
Method file : IOWRY.M ( modified )      Last update: Date 6/9/2006 Time 12:51:04 PM  
Information : Default Method  
Data File : <untitled>



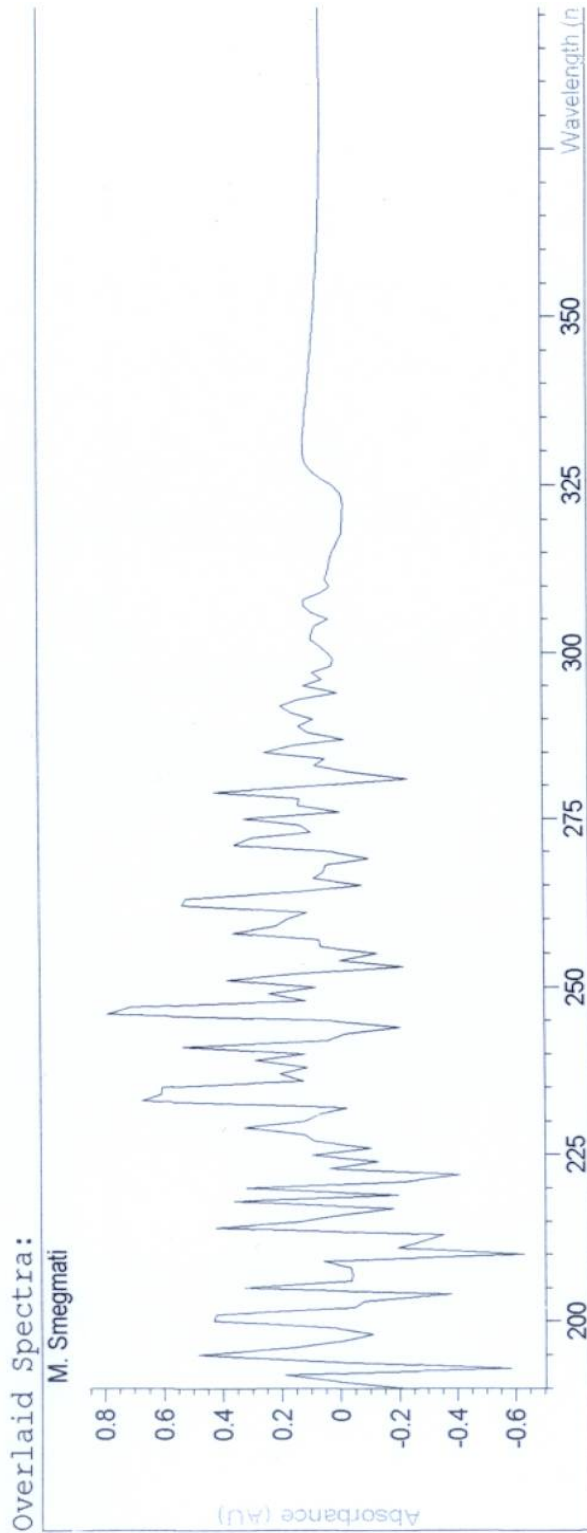
# Name  
-----  
1 M. senegalense

Report generated by : medicina      Signature: .....  
-----  
\*\*\* End Fixed Wavelength Report \*\*\*  
-----

10/07/2006 10:27:56



**Mycobacterium smegmatis.-**

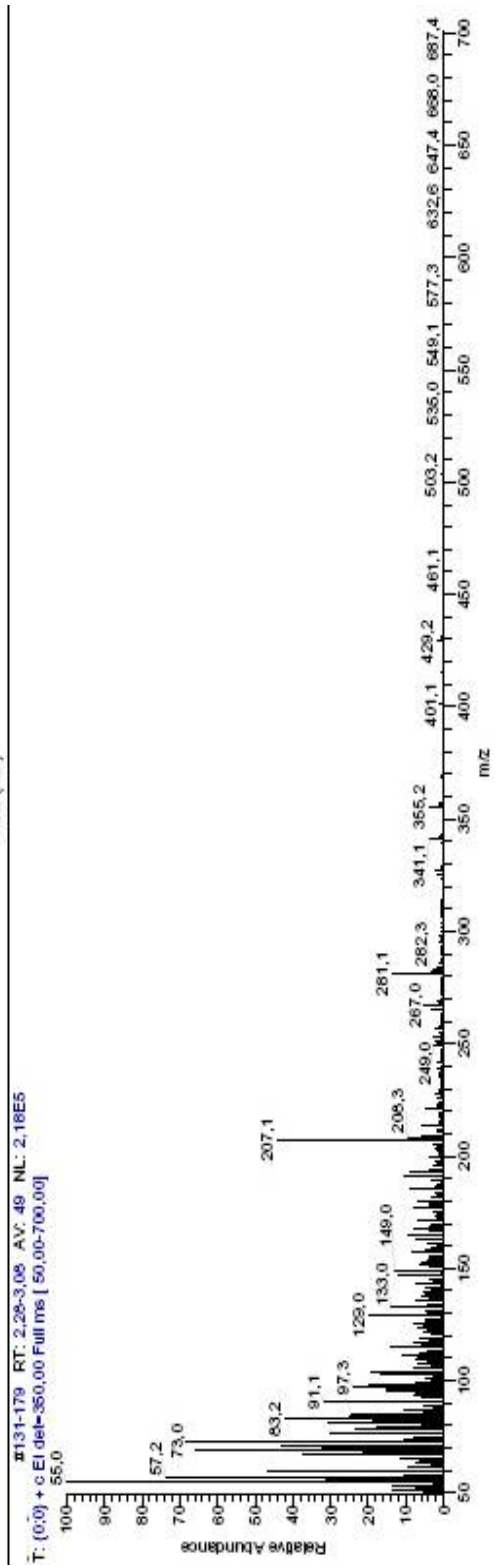
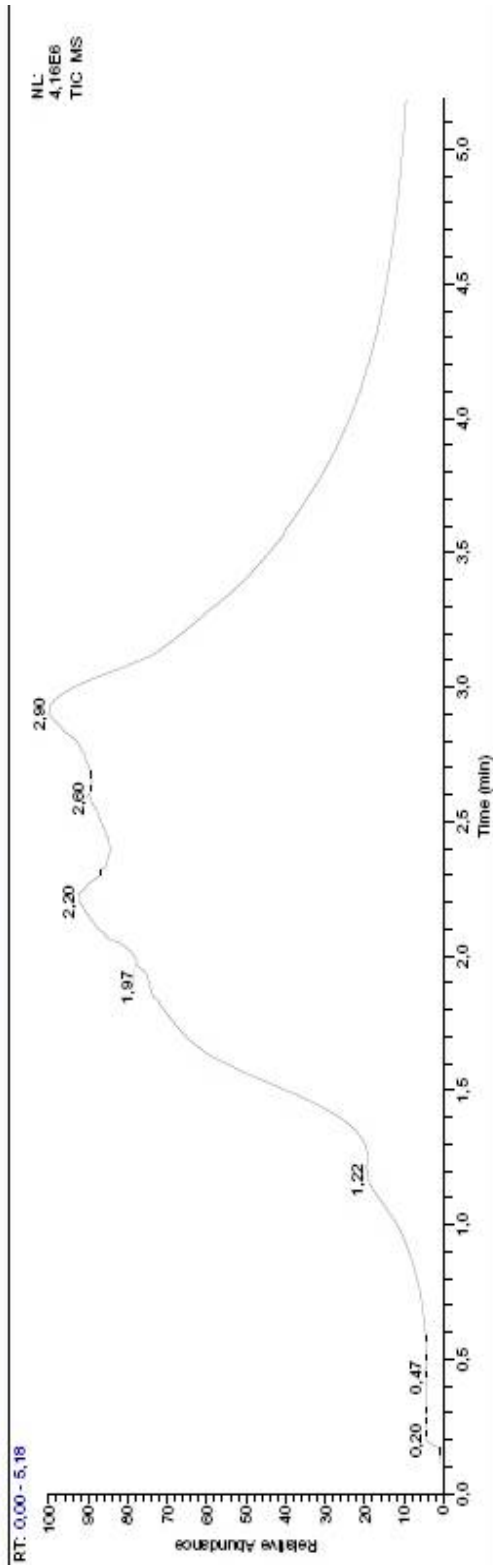


# Name -----  
1 M. Smegmatis

Report generated by : medicina  
Signature: .....  
-----  
\*\*\* End Fixed Wavelength Report \*\*\*  
-----

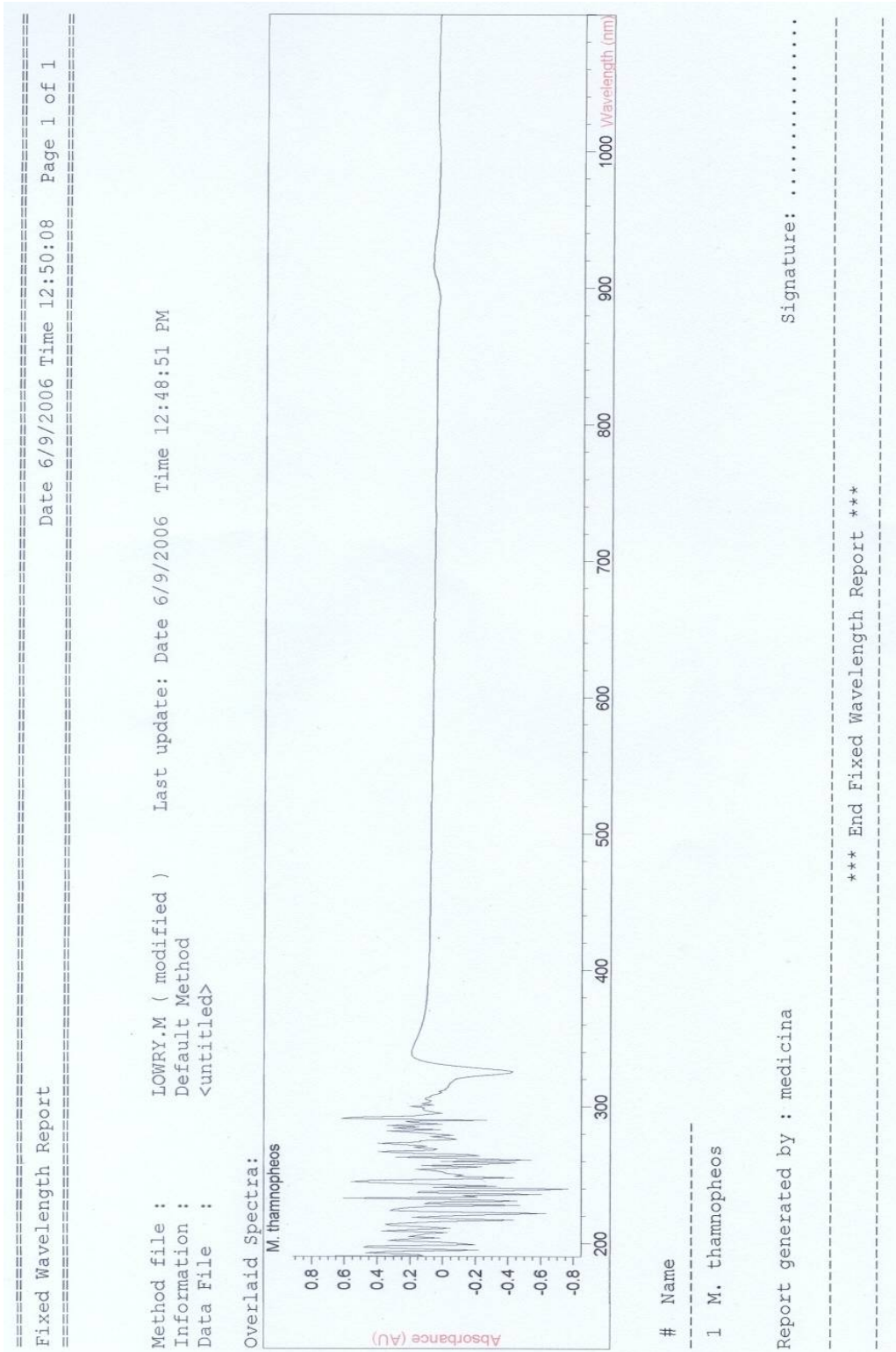
\\voxygen\analisis\eml...

04/12/2006 13:52:22

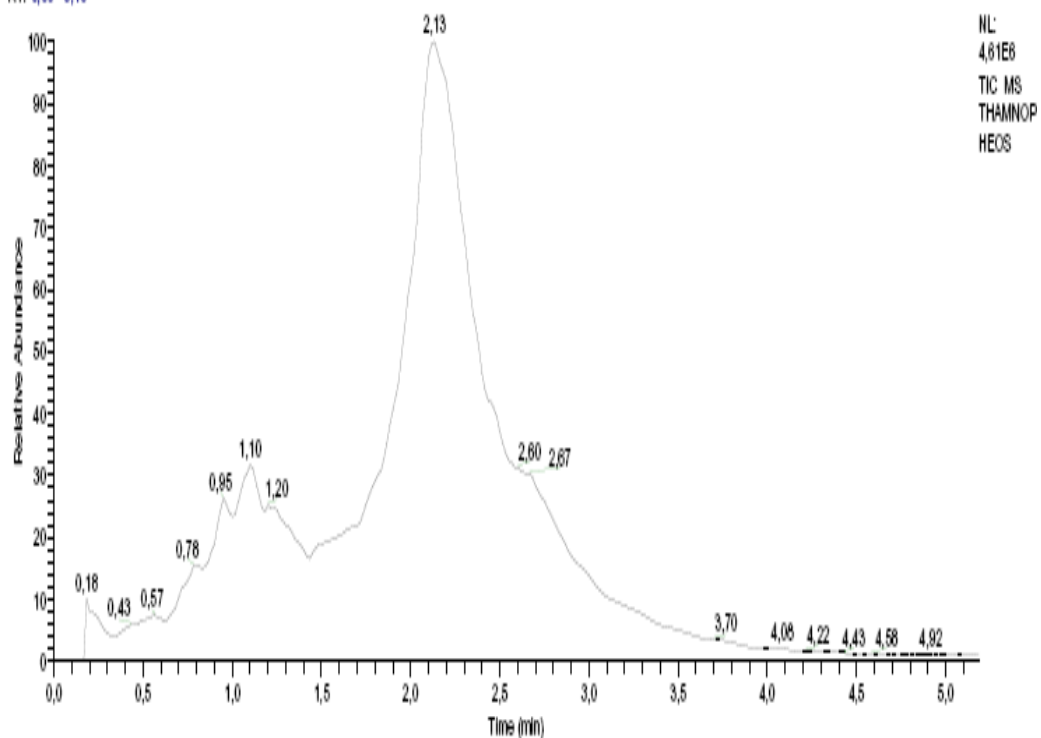




**Mycobacterium thamnopheos.-**



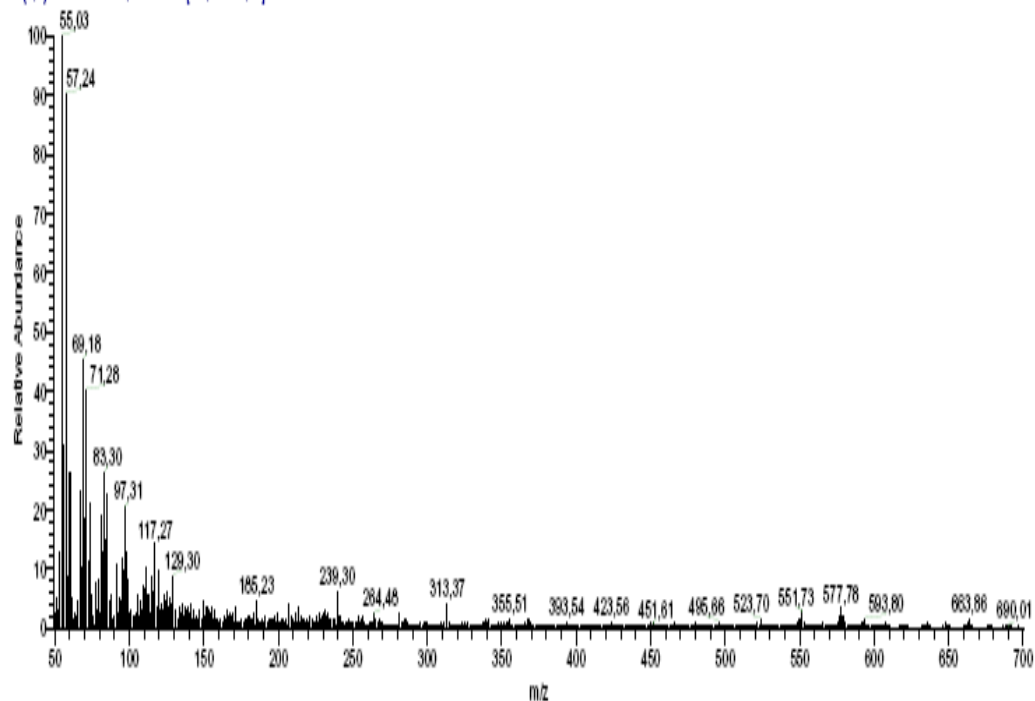
RT: 0,00 - 5,18



NL:  
4.81E6  
TIC MS  
THAMNOP  
HEOS

THAMNOPHEOS #114-133 RT: 2,00-2,32 AV: 20 NL: 3,13E5

T: (0.0) + c EI del=350,00 Full ms [ 50,00-700,00]



m/z	Intensity	Relative	98,35	39075,8	12,48	145,32	5549,7	1,77
			99,36	24761,8	7,91	146,32	3564,8	1,14
50,31	7684,9	2,46	100,38	7525,8	2,40	147,29	8695,5	2,78
51,22	15081,8	4,82	101,32	8560,9	2,73	148,34	3502,3	1,12
52,22	9660,3	3,09	102,34	5228,4	1,67	149,20	14327,9	4,58
53,15	39919,4	12,75	103,29	6548,1	2,09	150,38	5277,3	1,69
55,03	313020,8	100,00	104,28	7500,1	2,40	151,35	9878,5	3,16
56,27	95521,6	30,52	105,27	16727,2	5,34	152,37	10127,3	3,24
57,24	282268,8	90,18	106,34	6100,4	1,95	153,39	8307,5	2,65
58,36	27587,8	8,81	107,29	13143,2	4,20	154,39	6647,2	2,12
59,22	81496,0	26,04	108,33	8779,6	2,80	155,37	10768,8	3,44
60,24	81464,0	26,03	109,31	21191,8	6,77	156,41	3740,0	1,19
61,33	14726,6	4,70	110,34	19555,8	6,25	157,34	8360,9	2,67
62,30	3451,1	1,10	111,34	32213,4	10,29	158,39	3773,1	1,21
63,21	7259,9	2,32	112,38	17190,4	5,49	159,36	3856,8	1,23
64,21	5667,3	1,81	113,37	17283,4	5,52	160,36	2434,3	0,78
65,21	14605,4	4,67	114,34	7542,9	2,41	161,34	4662,3	1,49
67,05	71474,4	22,83	115,23	27324,2	8,73	162,38	2833,8	0,91
68,26	31799,4	10,16	116,31	19245,8	6,15	163,34	6031,9	1,93
69,18	142120,0	45,40	117,27	43780,2	13,99	164,38	3756,4	1,20
70,32	57983,2	18,52	118,35	10849,9	3,47	165,35	8264,8	2,64
71,28	125514,4	40,10	119,28	29377,2	9,39	166,42	6491,4	2,07
72,36	34677,8	11,08	120,37	9801,4	3,13	167,39	7343,7	2,35
73,25	65034,4	20,78	121,34	12021,8	3,84	168,42	5589,3	1,79
74,33	17782,0	5,68	122,34	9443,1	3,02	169,42	7325,9	2,34
75,32	5479,7	1,75	123,33	16329,6	5,22	170,43	3315,6	1,06
76,22	1341,4	0,43	124,36	13162,4	4,20	171,33	10214,5	3,26
77,02	23882,4	7,63	125,36	18131,4	5,79	172,45	3014,9	0,96
78,27	8792,4	2,81	126,38	10678,8	3,41	173,38	3404,0	1,09
79,23	24488,6	7,82	127,36	15795,8	5,05	174,39	2622,3	0,84
80,29	7220,8	2,31	128,34	11619,2	3,71	175,38	3737,8	1,19
81,13	58914,4	18,82	129,30	27574,8	8,81	176,40	2516,2	0,80
82,32	40505,0	12,94	130,41	6216,3	1,99	177,38	4297,9	1,37
83,30	82166,4	26,25	131,33	8978,1	2,87	178,38	4246,6	1,36
84,34	46826,6	14,96	132,34	4842,8	1,55	179,38	5032,4	1,61
85,32	70677,6	22,58	133,29	11215,3	3,58	180,42	4972,4	1,59
86,40	13614,6	4,35	134,33	6849,3	2,19	181,43	4656,6	1,49
87,29	17717,0	5,66	135,32	11734,2	3,75	182,44	4154,6	1,33
88,36	4796,3	1,53	136,36	5896,4	1,88	183,43	6613,9	2,11
89,28	5622,8	1,80	137,32	11368,0	3,63	184,41	1103,3	0,35
91,08	32661,4	10,43	138,36	8925,0	2,85	185,23	14667,7	4,69
92,35	6626,3	2,12	139,36	10511,4	3,36	186,47	3513,6	1,12
93,28	15478,8	4,94	140,38	7183,6	2,29	187,42	2977,1	0,95
94,31	14276,2	4,56	141,36	12760,8	4,08	188,41	1940,0	0,62
95,29	37053,2	11,84	142,39	4234,1	1,35	189,37	3491,9	1,12
96,33	29775,4	9,51	143,31	9381,3	3,00	190,40	2748,0	0,88
97,31	63596,0	20,32	144,38	3542,0	1,13	191,37	5167,1	1,65

192,43	3093,9	0,99	239,30	19411,8	6,20	286,52	1800,7	0,58
193,39	4493,0	1,44	240,52	5300,1	1,69	287,53	1036,6	0,33
194,44	4607,3	1,47	241,47	5770,6	1,84	288,56	718,0	0,23
195,45	4142,9	1,32	242,51	2652,6	0,85	289,51	1214,6	0,39
196,47	3800,4	1,21	243,48	2496,0	0,80	290,55	953,4	0,30
197,45	5980,6	1,91	244,46	1620,9	0,52	291,53	1138,7	0,36
198,47	2661,4	0,85	245,42	2831,3	0,90	292,57	1122,8	0,36
199,40	6599,4	2,11	246,42	3349,7	1,07	293,56	1137,8	0,36
200,46	2592,3	0,83	247,42	4913,4	1,57	294,55	1445,7	0,46
201,42	2830,6	0,90	248,48	2234,7	0,71	295,53	2813,9	0,90
202,37	4206,8	1,34	249,45	2555,7	0,82	296,57	1519,8	0,49
203,39	4646,6	1,48	250,47	2593,6	0,83	297,53	2024,8	0,65
204,42	2965,7	0,95	251,47	2214,1	0,71	298,55	1873,5	0,60
205,40	3842,1	1,23	252,48	2627,9	0,84	299,53	1921,6	0,61
206,41	1515,2	0,48	253,47	5404,9	1,73	300,52	1313,6	0,42
207,19	12720,7	4,06	254,52	2125,9	0,68	301,49	1329,3	0,42
208,44	5412,0	1,73	255,46	3928,8	1,26	302,50	924,1	0,30
209,45	4210,6	1,35	256,49	6467,0	2,07	303,51	1095,7	0,35
210,46	3170,7	1,01	257,53	3235,6	1,03	304,54	785,3	0,25
211,43	7353,9	2,35	258,52	1445,3	0,46	305,52	1050,3	0,34
212,46	2871,8	0,92	259,48	1564,2	0,50	306,56	984,4	0,31
213,38	10781,5	3,44	260,49	1464,1	0,47	307,56	978,5	0,31
214,47	3166,7	1,01	261,47	1861,8	0,59	308,57	1206,1	0,39
215,37	6240,0	1,99	262,49	2460,6	0,79	309,56	1948,3	0,62
216,40	4061,1	1,30	263,49	2513,3	0,80	310,57	1247,6	0,40
217,40	4032,2	1,29	264,48	7089,6	2,26	311,51	2697,8	0,86
218,42	2813,6	0,90	265,53	4283,6	1,37	312,53	538,9	0,17
219,41	3944,9	1,26	266,53	2383,6	0,76	313,37	12259,2	3,92
220,43	3113,3	0,99	267,47	4902,5	1,57	314,59	2864,2	0,92
221,39	5469,1	1,75	268,53	1913,1	0,61	315,54	1752,4	0,56
222,46	3709,2	1,18	269,46	2783,3	0,89	316,53	1307,8	0,42
223,45	3305,8	1,06	270,51	1745,2	0,56	317,52	975,6	0,31
224,45	3231,4	1,03	271,50	1609,3	0,51	318,54	781,4	0,25
225,45	5467,8	1,75	272,54	886,0	0,28	319,53	946,8	0,30
226,46	3016,4	0,96	273,50	976,8	0,31	320,56	992,2	0,32
227,42	6684,1	2,14	274,51	819,9	0,26	321,55	993,7	0,32
228,45	4442,9	1,42	275,51	1238,5	0,40	322,58	1222,8	0,39
229,41	5203,2	1,66	276,53	1027,9	0,33	323,59	1939,0	0,62
230,38	7150,0	2,28	277,52	1269,5	0,41	324,61	1208,5	0,39
231,39	9199,0	2,94	278,53	1561,6	0,50	325,53	1893,2	0,60
232,42	5582,8	1,78	279,51	1731,2	0,55	326,56	1486,6	0,47
233,41	6600,4	2,11	280,51	1131,8	0,36	327,51	2077,7	0,66
234,46	3465,8	1,11	281,27	6815,9	2,18	328,55	923,3	0,29
235,45	3558,7	1,14	282,51	2076,1	0,66	329,49	1353,1	0,43
236,47	4175,1	1,33	283,47	2906,3	0,93	330,54	1001,7	0,32
237,47	3929,6	1,26	284,52	3775,8	1,21	331,56	1211,1	0,39
238,43	1086,1	0,35	285,51	4462,3	1,43	332,59	798,5	0,26

333,57	944,5	0,30	380,64	1097,0	0,35	427,66	382,1	0,12
334,58	1059,7	0,34	381,58	1751,9	0,56	428,57	221,8	0,07
335,55	1175,3	0,38	382,60	1449,5	0,46	429,30	1630,8	0,52
336,58	1334,6	0,43	383,60	1006,0	0,32	429,96	17,2	0,01
337,56	2443,1	0,78	384,61	772,0	0,25	430,57	1349,0	0,43
338,59	2070,3	0,66	385,62	693,0	0,22	431,62	941,7	0,30
339,54	3922,9	1,25	386,62	660,0	0,21	432,65	1104,9	0,35
340,58	2116,8	0,68	387,63	610,0	0,19	433,67	654,5	0,21
341,50	3598,8	1,15	388,64	466,1	0,15	434,68	574,9	0,18
342,55	1363,4	0,44	389,66	528,0	0,17	435,65	1074,0	0,34
343,51	1029,7	0,33	390,66	495,1	0,16	436,70	757,0	0,24
344,51	958,1	0,31	391,65	570,8	0,18	437,63	1349,9	0,43
345,49	1231,9	0,39	392,64	692,6	0,22	438,66	908,3	0,29
346,50	1481,2	0,47	393,54	2534,7	0,81	439,65	614,5	0,20
347,51	1810,2	0,58	394,66	1000,3	0,32	440,65	350,8	0,11
348,55	1746,8	0,56	395,58	1722,2	0,55	441,64	388,4	0,12
349,53	1892,6	0,60	396,62	1150,4	0,37	442,67	355,9	0,11
350,56	1767,3	0,56	397,61	1048,5	0,33	443,66	411,1	0,13
351,59	2234,6	0,71	398,68	618,1	0,20	444,69	362,1	0,12
352,62	1197,4	0,38	399,62	518,6	0,17	445,71	450,8	0,14
353,56	2047,9	0,65	400,62	716,4	0,23	446,64	550,0	0,18
354,57	2752,1	0,88	401,52	808,5	0,26	447,64	549,1	0,18
355,51	4843,4	1,55	402,59	687,0	0,22	448,65	477,1	0,15
356,57	1593,1	0,51	403,61	719,7	0,23	449,57	1860,3	0,59
357,53	1054,3	0,34	404,62	1310,9	0,42	450,67	926,0	0,30
358,56	682,4	0,22	405,67	741,0	0,24	451,61	1927,1	0,62
359,57	890,5	0,28	406,71	777,4	0,25	452,66	1180,8	0,38
360,59	763,1	0,24	407,66	1168,2	0,37	453,66	696,7	0,22
361,57	981,9	0,31	408,67	699,8	0,22	454,68	399,1	0,13
362,57	1140,8	0,36	409,59	1699,8	0,54	455,68	346,1	0,11
363,55	1226,6	0,39	410,64	973,3	0,31	456,68	337,1	0,11
364,59	1270,9	0,41	411,65	587,8	0,19	457,68	415,9	0,13
365,60	1888,2	0,60	412,66	374,9	0,12	458,67	1074,6	0,34
366,60	1225,8	0,39	413,63	430,3	0,14	459,68	714,5	0,23
367,53	4387,9	1,40	414,69	514,5	0,16	460,72	689,9	0,22
368,61	4267,9	1,36	415,55	671,1	0,21	461,66	597,2	0,19
369,61	2495,3	0,80	416,61	501,2	0,16	462,63	826,9	0,26
370,63	1158,8	0,37	417,63	469,9	0,15	463,60	1451,2	0,46
371,58	983,9	0,31	418,66	468,3	0,15	464,64	1043,1	0,33
372,61	593,8	0,19	419,66	457,6	0,15	465,62	1860,1	0,59
373,61	648,3	0,21	420,66	565,3	0,18	466,65	1389,6	0,44
374,64	524,8	0,17	421,59	1512,6	0,48	467,65	963,0	0,31
375,64	612,7	0,20	422,65	868,4	0,28	468,67	517,4	0,17
376,65	738,8	0,24	423,56	3113,9	0,99	469,69	362,0	0,12
377,64	825,2	0,26	424,65	1349,4	0,43	470,68	303,9	0,10
378,65	876,0	0,28	425,65	1305,0	0,42	471,69	279,2	0,09
379,64	1260,5	0,40	426,69	548,5	0,18	472,72	309,2	0,10

473,74	324,0	0,10	520,75	694,0	0,22	567,85	430,1	0,14
474,74	459,4	0,15	521,69	1800,6	0,58	568,81	265,8	0,08
475,68	538,9	0,17	522,75	1693,1	0,54	569,78	228,8	0,07
476,70	593,9	0,19	523,70	4095,6	1,31	570,78	241,4	0,08
477,65	1334,7	0,43	524,75	1492,5	0,48	571,82	216,8	0,07
478,68	969,6	0,31	525,78	481,6	0,15	572,82	312,3	0,10
479,63	2322,7	0,74	526,83	279,1	0,09	573,82	443,9	0,14
480,66	1724,8	0,55	527,80	307,4	0,10	574,76	1217,2	0,39
481,69	821,7	0,26	528,79	302,7	0,10	575,78	2607,3	0,83
482,67	420,9	0,13	529,79	262,5	0,08	576,78	6362,7	2,03
483,67	318,9	0,10	530,81	273,6	0,09	577,78	10054,4	3,21
484,73	308,9	0,10	531,78	293,9	0,09	578,83	5102,9	1,63
485,78	287,8	0,09	532,76	281,9	0,09	579,80	6558,1	2,10
486,79	388,1	0,12	533,64	1259,2	0,40	580,84	2392,4	0,76
487,77	305,9	0,10	534,77	680,1	0,22	581,84	795,6	0,25
488,80	361,1	0,12	535,71	1383,2	0,44	582,79	370,9	0,12
489,71	356,8	0,11	536,77	916,4	0,29	583,75	272,3	0,09
490,75	420,6	0,13	537,73	1148,6	0,37	584,81	251,4	0,08
491,65	896,0	0,29	538,76	493,7	0,16	585,83	192,2	0,06
492,70	655,2	0,21	539,80	248,8	0,08	586,83	195,6	0,06
493,66	1309,6	0,42	540,80	246,7	0,08	587,82	206,5	0,07
494,70	1413,8	0,45	541,84	204,9	0,07	588,88	302,6	0,10
495,66	3258,5	1,04	542,85	181,5	0,06	589,87	558,5	0,18
496,73	1329,7	0,42	543,81	186,8	0,06	590,84	882,3	0,28
497,75	470,9	0,15	544,84	226,0	0,07	591,80	1800,9	0,58
498,76	284,1	0,09	545,81	264,4	0,08	592,83	2183,4	0,70
499,76	229,7	0,07	546,77	421,9	0,13	593,80	4194,3	1,34
500,78	267,8	0,09	547,72	1076,5	0,34	594,86	1720,2	0,55
501,77	306,4	0,10	548,74	2026,1	0,65	595,83	684,4	0,22
502,78	419,6	0,13	549,73	4329,4	1,38	596,76	385,4	0,12
503,60	954,1	0,30	550,78	3709,7	1,19	597,75	244,0	0,08
504,69	694,2	0,22	551,73	8311,5	2,66	598,73	237,7	0,08
505,68	1105,2	0,35	552,79	2890,9	0,92	599,81	219,5	0,07
506,73	637,8	0,20	553,81	731,1	0,23	600,89	263,1	0,08
507,67	1322,6	0,42	554,80	305,4	0,10	601,88	347,7	0,11
508,72	911,0	0,29	555,80	251,1	0,08	602,83	588,4	0,19
509,71	699,5	0,22	556,83	224,6	0,07	603,82	968,5	0,31
510,73	337,1	0,11	557,85	204,3	0,07	604,85	1193,8	0,38
511,72	206,9	0,07	558,85	215,7	0,07	605,83	1682,8	0,54
512,71	261,0	0,08	559,81	233,9	0,07	606,89	1383,6	0,44
513,71	228,3	0,07	560,82	259,8	0,08	607,85	2438,5	0,78
514,74	231,2	0,07	561,75	585,5	0,19	608,88	983,8	0,31
515,75	253,6	0,08	562,77	580,0	0,19	609,90	381,2	0,12
516,76	279,6	0,09	563,73	1435,0	0,46	610,83	238,3	0,08
517,77	291,5	0,09	564,80	1363,5	0,44	611,83	163,1	0,05
518,77	325,6	0,10	565,76	2827,1	0,90	612,81	151,6	0,05
519,70	746,8	0,24	566,82	1080,6	0,35	613,85	132,2	0,04

614,91	142,7	0,05	661,93	1216,3	0,39
615,93	162,1	0,05	662,88	1956,5	0,63
616,94	211,8	0,07	663,86	3782,5	1,21
617,89	344,8	0,11	664,99	1371,8	0,44
618,88	589,0	0,19	666,00	383,2	0,12
619,82	1023,3	0,33	667,02	135,3	0,04
620,87	760,8	0,24	668,03	83,0	0,03
621,87	753,0	0,24	669,10	82,4	0,03
622,93	327,0	0,10	670,11	76,8	0,02
623,96	160,0	0,05	671,05	76,5	0,02
624,99	109,5	0,03	672,04	97,3	0,03
625,98	97,5	0,03	673,06	95,7	0,03
626,99	94,9	0,03	674,03	124,8	0,04
627,98	88,3	0,03	675,05	166,9	0,05
628,95	94,6	0,03	676,00	238,6	0,08
629,95	122,1	0,04	676,98	291,9	0,09
630,99	157,1	0,05	677,96	316,4	0,10
631,91	294,3	0,09	678,97	173,8	0,06
632,90	590,8	0,19	679,98	104,0	0,03
633,86	1083,7	0,35	681,01	80,9	0,03
634,90	1157,7	0,37	682,10	78,5	0,03
635,88	2367,6	0,76	683,10	83,5	0,03
636,95	923,1	0,29	684,11	97,7	0,03
637,94	301,8	0,10	684,97	110,8	0,04
638,93	135,9	0,04	685,89	132,6	0,04
639,99	113,0	0,04	686,86	173,3	0,06
641,01	82,2	0,03	687,91	365,9	0,12
642,01	94,5	0,03	688,99	617,1	0,20
643,05	96,3	0,03	690,01	748,8	0,24
644,03	85,5	0,03	691,04	454,0	0,15
645,03	113,3	0,04	692,03	328,6	0,10
645,95	182,3	0,06	693,02	162,2	0,05
646,95	125,5	0,04	694,04	101,7	0,03
647,63	3040,5	0,97	694,97	87,2	0,03
648,82	1257,1	0,40	695,50	3,9	0,00
649,86	632,4	0,20	696,02	96,3	0,03
650,88	236,5	0,08	696,88	232,8	0,07
651,93	130,8	0,04	697,48	7,4	0,00
652,94	100,4	0,03			
653,95	74,2	0,02			
654,96	85,8	0,03			
656,04	83,6	0,03			
657,10	83,9	0,03			
658,17	104,1	0,03			
659,15	150,7	0,05			
660,00	273,1	0,09			
660,93	604,5	0,19			

**Mycobacterium thermoresistible.-**

=====  
Fixed Wavelength Report  
=====  
Date 6/27/2006 Time 13:34:24 Page 1 of 1

Method file : LOWRY.M ( modified )  
Information : Default Method  
Data File : <untitled>  
Last update: Date 6/27/2006 Time 1:28:58 PM

Overlaid Spectra:  
M. thermoresistible

The figure is a line graph showing the absorbance spectrum of *M. thermoresistible*. The y-axis is labeled 'Absorbance (AU)' and ranges from -0.6 to 0.8 with major ticks every 0.2. The x-axis is labeled 'Wavelength (nm)' and ranges from 200 to 375 with major ticks every 25 nm. The plot shows a complex spectrum with multiple peaks. A prominent peak is observed at approximately 225 nm with an absorbance of about 0.6. Another significant peak is at approximately 275 nm with an absorbance of about 0.4. There are several smaller peaks and troughs between 200 and 300 nm. The absorbance remains relatively low and stable between 300 and 375 nm.

Wavelength (nm)	Absorbance (AU)
200	0.1
210	0.2
225	0.6
240	0.3
255	0.4
275	0.4
290	0.2
300	0.1
325	0.1
350	0.1
375	0.1

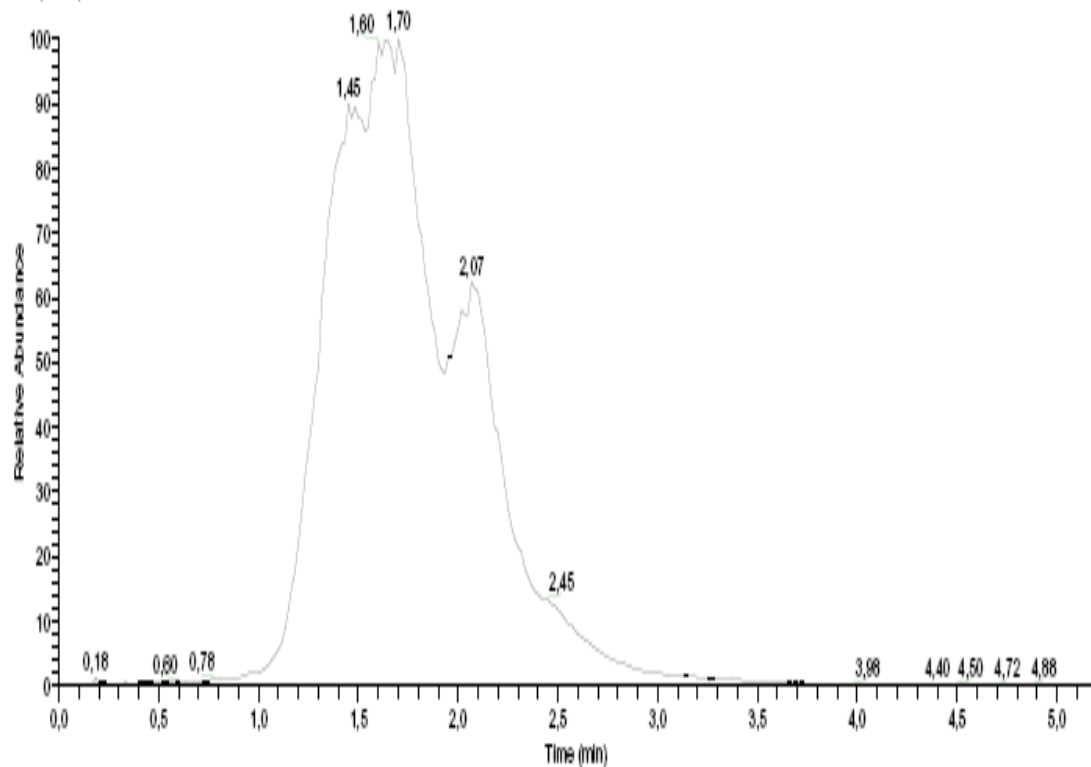
# Name  
-----  
1 M. thermoresist

Report generated by : medicina  
Signature: .....

-----  
\*\*\* End Fixed Wavelength Report \*\*\*  
-----

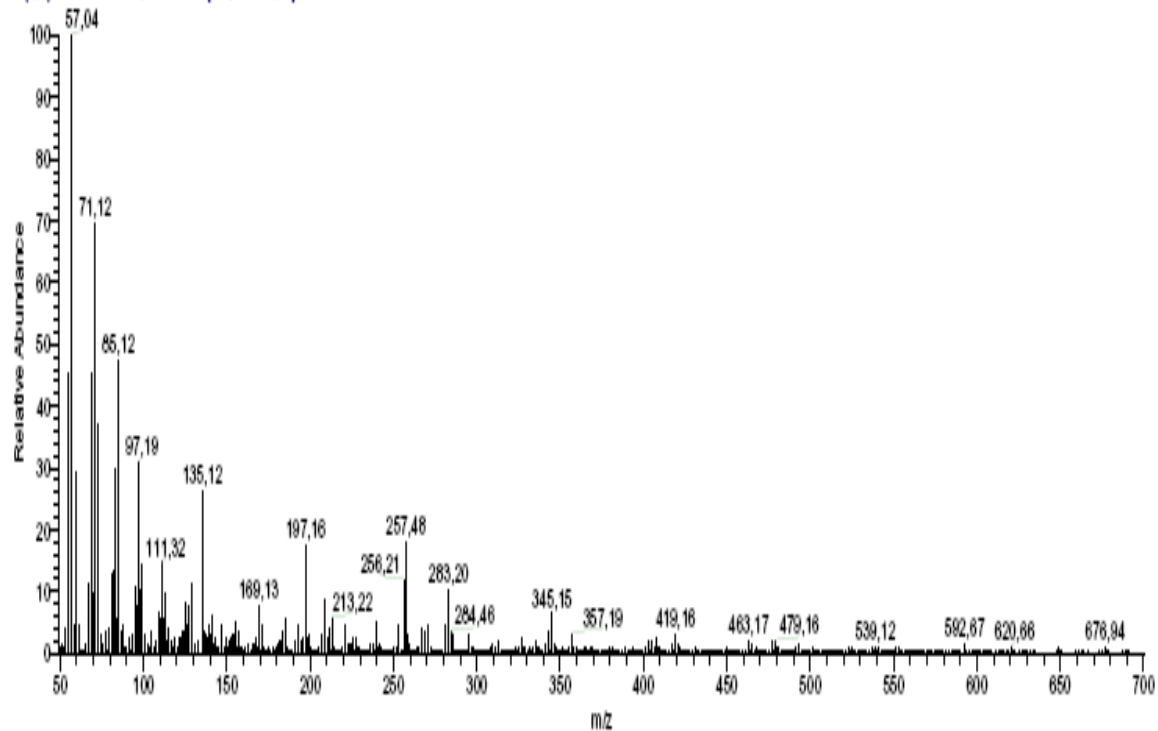


RT: 0,00 - 5,18



NL:  
1,85E7  
TIC MS  
THERMON  
ESISTIBLE

THERMONESISTIBLE 289-99 RT: 1,58-1,75 AV: 11 NL: 1,80E8  
T: (0,0) + c EI del=350,00 Full ms [ 50,00-700,00]



m/z	Intensity	Relative						
			105,05	58356,4	3,65	157,22	55495,3	3,47
			106,34	13071,3	0,82	158,40	13293,8	0,83
50,32	11297,1	0,71	107,27	31824,4	1,99	159,36	10748,4	0,67
51,23	21235,3	1,33	109,09	99786,2	6,24	160,37	5438,5	0,34
52,21	13842,2	0,87	110,33	84160,0	5,26	161,33	12066,5	0,75
53,15	59109,8	3,70	111,32	231831,3	14,50	162,35	5232,8	0,33
55,08	723898,2	45,29	112,40	89649,5	5,61	163,26	21003,6	1,31
57,04	1598510,5	100,00	113,35	150238,5	9,40	164,38	8626,4	0,54
58,42	67746,9	4,24	114,41	29262,5	1,83	165,35	19947,6	1,25
59,21	43336,7	2,71	115,29	65605,8	4,10	166,40	24582,9	1,54
60,03	468654,5	29,32	116,35	30183,3	1,89	167,39	38782,5	2,43
61,31	67736,7	4,24	117,33	16222,5	1,01	168,39	14414,5	0,90
62,40	4921,4	0,31	119,03	41166,5	2,58	169,13	118340,4	7,40
63,25	5857,1	0,37	120,33	13016,7	0,81	170,43	2922,5	0,18
64,18	1490,4	0,09	121,30	35033,5	2,19	171,17	68161,5	4,26
65,01	21941,5	1,37	122,32	35988,4	2,25	172,45	11241,8	0,70
67,06	175860,4	11,00	123,34	51656,7	3,23	173,39	8798,2	0,55
69,02	721198,5	45,12	124,36	58088,7	3,63	174,38	5448,5	0,34
70,28	153262,5	9,59	125,35	129053,1	8,07	175,34	9905,8	0,62
71,12	1113204,4	69,64	126,40	70512,0	4,41	176,37	5266,1	0,33
73,04	592872,7	37,09	127,37	117617,5	7,36	177,35	12894,9	0,81
74,38	45742,5	2,86	129,10	176610,9	11,05	178,39	8458,6	0,53
75,31	18168,4	1,14	130,43	17985,8	1,13	179,35	16356,0	1,02
77,00	50702,5	3,17	131,34	15689,5	0,98	180,41	20934,9	1,31
78,26	7177,5	0,45	132,30	2922,3	0,18	181,42	29070,2	1,82
79,08	62432,0	3,91	133,12	33270,2	2,08	182,44	29443,3	1,84
81,06	202775,3	12,69	135,12	415010,9	25,96	183,42	56370,9	3,53
82,26	210728,7	13,18	136,39	51511,3	3,22	185,19	89099,6	5,57
83,26	471493,8	29,50	137,35	47352,7	2,96	186,48	12206,2	0,76
84,30	87703,3	5,49	138,38	41464,7	2,59	187,41	8453,5	0,53
85,12	759400,7	47,51	139,36	69557,8	4,35	188,41	3626,7	0,23
86,45	51550,5	3,22	140,39	48600,7	3,04	189,36	7120,6	0,45
87,29	71018,2	4,44	141,36	91921,5	5,75	191,15	29129,1	1,82
88,37	12129,1	0,76	142,44	17826,9	1,12	193,11	71509,8	4,47
89,28	14737,8	0,92	143,33	39458,9	2,47	194,41	32368,7	2,02
91,08	36592,0	2,29	144,38	13779,3	0,86	195,40	39101,1	2,45
92,28	1861,1	0,12	145,33	16844,7	1,05	197,16	279010,9	17,45
93,05	42775,3	2,68	147,09	73892,4	4,62	198,44	41221,8	2,58
95,07	172404,4	10,79	148,35	15814,5	0,99	199,39	45835,6	2,87
96,29	119086,5	7,45	149,30	35000,4	2,19	200,48	10063,3	0,63
97,19	493707,6	30,89	150,34	16949,8	1,06	201,42	8200,1	0,51
98,36	165160,7	10,33	151,34	25623,3	1,60	202,43	3438,3	0,22
99,32	224814,5	14,06	152,38	35219,3	2,20	203,38	5890,5	0,37
100,44	28520,0	1,78	153,39	48557,1	3,04	204,38	3085,2	0,19
101,30	45266,9	2,83	154,41	43216,0	2,70	205,30	10816,4	0,68
102,34	18389,1	1,15	155,39	77194,2	4,83	207,11	45344,0	2,84
103,31	12128,0	0,76	156,44	11705,8	0,73	209,13	133357,1	8,34

210,45	39160,0	2,45	258,59	46271,6	2,89	310,63	6459,5	0,40
211,45	59405,1	3,72	259,49	18653,1	1,17	311,49	10134,0	0,63
212,48	3613,1	0,23	260,49	7194,4	0,45	312,53	1161,1	0,07
213,22	88538,2	5,54	261,49	4646,8	0,29	313,19	31073,8	1,94
214,53	11524,0	0,72	262,50	4469,7	0,28	314,54	6079,1	0,38
215,46	6736,0	0,42	263,48	5868,5	0,37	315,43	6177,5	0,39
216,44	3096,5	0,19	264,50	12765,1	0,80	316,47	5679,9	0,36
217,40	5426,5	0,34	265,51	13051,6	0,82	317,45	4289,0	0,27
218,42	4594,2	0,29	267,19	63329,5	3,96	318,53	2187,7	0,14
219,39	10553,8	0,66	269,10	55982,5	3,50	319,52	2967,1	0,19
221,18	68657,5	4,30	271,09	74177,5	4,64	320,57	4479,9	0,28
222,45	23711,6	1,48	272,44	13334,9	0,83	321,60	4879,9	0,31
223,44	21865,5	1,37	273,43	8347,4	0,52	322,61	8440,7	0,53
224,49	21778,2	1,36	274,42	7556,7	0,47	323,60	15374,5	0,96
225,48	38485,1	2,41	275,46	4693,8	0,29	324,65	5665,1	0,35
226,53	5830,9	0,36	276,51	2755,2	0,17	325,45	10264,7	0,64
227,31	34337,5	2,15	277,50	4096,1	0,26	327,10	38008,0	2,38
228,50	12848,0	0,80	278,53	7616,4	0,48	328,40	9696,9	0,61
229,47	11093,5	0,69	279,53	8969,8	0,56	329,32	14435,3	0,90
230,48	3469,7	0,22	281,19	67656,7	4,23	330,38	5666,9	0,35
231,41	7661,1	0,48	283,20	161466,2	10,10	331,34	12993,1	0,81
232,49	3101,5	0,19	284,46	52922,2	3,31	332,40	4755,5	0,30
233,44	4382,1	0,27	285,43	43552,0	2,72	333,35	14125,1	0,88
234,46	3956,5	0,25	286,51	9098,1	0,57	335,03	30755,6	1,92
235,41	6310,5	0,39	287,49	4154,5	0,26	336,59	16376,7	1,02
236,38	25019,6	1,57	288,52	2132,6	0,13	337,63	15827,6	0,99
237,49	19677,5	1,23	289,52	2756,2	0,17	338,67	5601,5	0,35
238,50	8170,9	0,51	290,54	2122,5	0,13	339,55	6513,5	0,41
239,29	79271,3	4,96	291,51	3893,9	0,24	341,13	23221,5	1,45
240,58	14116,7	0,88	292,56	6395,8	0,40	343,13	56157,1	3,51
241,48	17822,9	1,11	293,57	6512,7	0,41	344,35	1760,4	0,11
242,50	11652,0	0,73	294,53	1173,1	0,07	345,15	100368,0	6,28
243,50	8927,8	0,56	295,24	46069,8	2,88	346,43	24667,3	1,54
244,53	3020,8	0,19	296,56	10010,2	0,63	347,43	12871,3	0,81
245,45	4172,3	0,26	297,48	9473,8	0,59	348,52	6359,7	0,40
246,46	4113,5	0,26	298,53	5282,7	0,33	349,57	4386,5	0,27
247,45	8446,0	0,53	299,49	7522,9	0,47	350,62	7088,5	0,44
248,51	4359,3	0,27	300,53	2905,7	0,18	351,62	12911,6	0,81
249,41	7906,2	0,49	301,52	2660,1	0,17	352,67	5079,7	0,32
250,50	12118,2	0,76	302,52	1855,2	0,12	353,58	7158,2	0,45
251,46	15964,7	1,00	303,50	2817,3	0,18	354,56	6966,6	0,44
252,50	4190,2	0,26	304,54	1809,0	0,11	355,38	15538,9	0,97
253,20	66884,4	4,18	305,51	3711,5	0,23	357,19	49732,4	3,11
254,51	7389,5	0,46	306,56	5469,4	0,34	358,42	14077,5	0,88
255,38	7589,5	0,47	307,59	6068,3	0,38	359,42	9186,9	0,57
256,21	186410,2	11,66	308,60	12429,1	0,78	360,46	4437,8	0,28
257,48	289477,8	18,11	309,59	17686,9	1,11	361,52	3155,2	0,20

362,59	3966,0	0,25	412,65	1525,5	0,10	463,17	29019,6	1,82
363,61	3366,6	0,21	413,60	1370,9	0,09	464,37	4791,6	0,30
364,61	10351,3	0,65	415,16	7950,8	0,50	465,32	22120,4	1,38
365,66	12853,5	0,80	417,13	24878,2	1,56	466,46	6205,5	0,39
366,69	5480,3	0,34	418,33	3155,6	0,20	467,41	11051,3	0,69
367,57	8478,2	0,53	419,16	44864,0	2,81	468,53	3572,2	0,22
368,59	15798,2	0,99	420,49	19014,2	1,19	469,46	3930,0	0,25
369,56	11710,5	0,73	421,59	15285,8	0,96	470,57	2105,2	0,13
370,58	4335,6	0,27	422,65	5203,5	0,33	471,62	1380,5	0,09
371,52	3335,8	0,21	423,59	4570,5	0,29	472,66	1129,8	0,07
372,53	1512,5	0,09	424,63	2621,5	0,16	473,64	1702,7	0,11
373,41	3223,7	0,20	425,63	2161,4	0,14	474,90	5098,5	0,32
374,55	1560,7	0,10	426,67	1100,3	0,07	475,53	1851,8	0,12
375,52	2558,8	0,16	427,61	1248,9	0,08	477,19	25551,6	1,60
376,62	2901,7	0,18	429,14	5089,8	0,32	478,40	1838,5	0,12
377,61	2833,9	0,18	429,69	426,5	0,03	479,16	28058,5	1,76
378,62	5835,2	0,37	431,19	16189,6	1,01	480,41	9900,7	0,62
379,63	10817,5	0,68	432,51	6619,5	0,41	481,38	14158,2	0,89
380,69	4146,3	0,26	433,52	4850,1	0,30	482,47	5154,2	0,32
381,52	10935,9	0,68	434,62	5803,7	0,36	483,47	2983,3	0,19
382,62	5349,0	0,33	435,68	8107,2	0,51	484,61	1895,8	0,12
383,56	4219,8	0,26	436,74	3051,0	0,19	485,70	1265,5	0,08
384,59	3132,5	0,20	437,55	5382,6	0,34	486,74	953,5	0,06
385,47	3671,7	0,23	438,66	2713,5	0,17	487,69	1624,5	0,10
386,41	324,0	0,02	439,60	3523,4	0,22	488,79	2780,1	0,17
387,11	8232,5	0,52	440,67	1452,5	0,09	489,66	2124,2	0,13
389,07	16189,1	1,01	441,65	1103,3	0,07	490,64	1160,5	0,07
390,44	7252,6	0,45	442,66	1077,5	0,07	491,33	13405,1	0,84
391,43	6004,6	0,38	443,52	1827,6	0,11	492,00	233,8	0,01
392,58	9066,2	0,57	444,54	1030,8	0,06	493,25	22562,5	1,41
393,63	11945,8	0,75	445,24	1376,6	0,09	494,55	7439,5	0,47
394,70	4265,9	0,27	446,28	8111,5	0,51	495,57	6631,4	0,41
395,58	4652,8	0,29	447,51	4573,2	0,29	496,63	2671,2	0,17
396,60	3770,2	0,24	448,65	6324,4	0,40	497,62	1490,3	0,09
397,61	3105,2	0,19	449,66	9556,9	0,60	498,13	32,7	0,00
398,63	1994,7	0,12	450,93	6047,5	0,38	498,69	1555,2	0,10
399,51	2487,8	0,16	451,61	3454,3	0,22	499,68	1084,7	0,07
401,08	14154,5	0,89	452,64	2766,8	0,17	501,12	9609,5	0,60
403,04	27336,7	1,71	453,62	2270,2	0,14	502,17	505,0	0,03
404,31	8577,4	0,54	454,67	1025,9	0,06	502,84	2456,3	0,15
405,25	26750,5	1,67	455,63	1016,2	0,06	503,71	1920,0	0,12
406,35	10457,8	0,65	456,67	1068,1	0,07	504,74	3532,2	0,22
407,38	34410,2	2,15	457,67	1063,5	0,07	505,67	5787,9	0,36
408,56	9395,9	0,59	458,56	563,4	0,04	506,81	3204,6	0,20
409,55	9219,8	0,58	459,27	2203,6	0,14	507,71	2898,7	0,18
410,62	3495,1	0,22	459,86	636,6	0,04	508,73	3142,4	0,20
411,60	2588,8	0,16	461,02	6997,5	0,44	509,68	3613,9	0,23

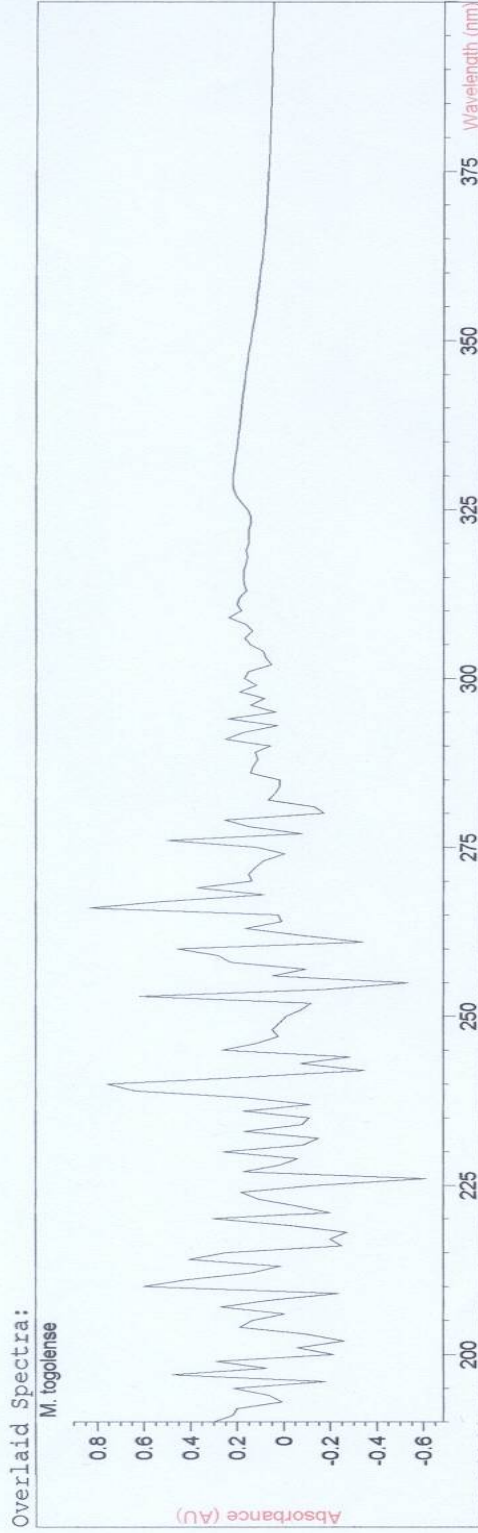
510,77	1852,3	0,12	556,53	3037,7	0,19	602,40	2268,9	0,14
511,71	1371,0	0,09	557,54	2052,5	0,13	603,43	2799,3	0,18
512,74	1764,3	0,11	558,27	483,6	0,03	604,54	1507,7	0,09
513,76	1386,3	0,09	558,78	1434,7	0,09	605,63	1611,3	0,10
514,79	894,2	0,06	559,81	1056,1	0,07	606,82	1515,6	0,09
515,72	1569,5	0,10	560,85	1302,8	0,08	607,89	962,3	0,06
516,81	1945,9	0,12	561,84	1450,0	0,09	608,97	871,8	0,05
517,80	1398,4	0,09	562,87	1389,9	0,09	609,90	547,2	0,03
518,78	2634,2	0,16	563,77	1656,0	0,10	610,91	1475,4	0,09
519,77	3722,1	0,23	564,79	3431,7	0,21	611,71	1126,5	0,07
520,83	2654,5	0,17	565,73	3437,2	0,22	613,14	4059,6	0,25
521,62	3805,8	0,24	566,75	2276,4	0,14	614,36	1528,5	0,10
523,19	11785,2	0,74	567,55	2706,2	0,17	615,29	4650,5	0,29
523,83	1752,4	0,11	568,61	2339,5	0,15	616,49	2103,5	0,13
525,06	10805,5	0,68	569,64	1705,3	0,11	617,47	2086,6	0,13
526,37	4466,7	0,28	570,63	1224,7	0,08	618,51	1071,9	0,07
527,33	4901,2	0,31	571,28	231,4	0,01	619,46	315,5	0,02
528,41	2153,0	0,13	571,79	1199,0	0,08	620,66	13370,9	0,84
529,38	1956,7	0,12	572,87	1197,0	0,07	621,96	4476,5	0,28
530,22	1160,3	0,07	573,87	870,7	0,05	623,04	1398,3	0,09
530,93	1545,8	0,10	574,82	1304,3	0,08	624,05	537,9	0,03
531,78	1269,1	0,08	575,81	1766,3	0,11	625,03	1110,5	0,07
532,81	2395,1	0,15	576,80	2029,8	0,13	625,66	831,1	0,05
533,83	2857,9	0,18	577,77	3068,8	0,19	627,18	4212,5	0,26
534,97	3033,5	0,19	578,85	2776,2	0,17	628,45	1933,4	0,12
535,71	2367,5	0,15	579,81	2255,3	0,14	629,42	2493,1	0,16
537,20	12240,5	0,77	580,92	1702,7	0,11	630,51	1444,5	0,09
537,71	1197,7	0,07	581,88	740,1	0,05	631,60	1114,2	0,07
538,43	486,2	0,03	582,81	1620,6	0,10	632,70	759,5	0,05
539,12	13926,9	0,87	583,63	1063,8	0,07	633,73	1238,1	0,08
540,33	5944,0	0,37	584,38	802,6	0,05	634,81	883,1	0,06
541,31	10402,2	0,65	585,21	2240,5	0,14	635,47	249,5	0,02
542,41	4366,3	0,27	586,27	1337,9	0,08	636,00	557,3	0,03
543,44	3971,8	0,25	587,21	2313,0	0,14	637,05	479,1	0,03
544,58	2405,2	0,15	588,32	1204,6	0,08	638,10	411,9	0,03
545,64	1564,7	0,10	589,26	1251,7	0,08	639,13	828,5	0,05
546,75	1751,2	0,11	590,17	893,8	0,06	639,99	539,1	0,03
547,81	2524,4	0,16	590,97	836,5	0,05	640,74	477,1	0,03
548,86	2039,5	0,13	592,67	22635,6	1,42	641,47	783,9	0,05
549,66	4070,9	0,25	593,92	7440,5	0,47	642,49	633,5	0,04
550,76	3806,4	0,24	595,06	2902,4	0,18	643,42	698,7	0,04
551,54	10608,1	0,66	596,02	867,7	0,05	644,50	583,2	0,04
552,54	231,5	0,01	597,04	2681,3	0,17	645,38	714,5	0,04
553,12	9528,5	0,60	598,03	1487,9	0,09	646,06	227,3	0,01
553,68	821,1	0,05	599,19	3446,2	0,22	647,53	7875,7	0,49
554,42	3711,2	0,23	600,36	1922,9	0,12	648,80	11130,6	0,70
555,39	7255,3	0,45	601,26	4183,1	0,26	650,02	3636,1	0,23

651,05	1066,6	0,07	695,55	146,4	0,01
652,05	411,7	0,03	696,51	146,1	0,01
653,01	350,4	0,02	697,22	69,5	0,00
653,95	281,3	0,02			
655,01	365,2	0,02			
655,75	213,5	0,01			
656,67	492,5	0,03			
657,41	655,5	0,04			
658,54	623,7	0,04			
659,29	1066,4	0,07			
660,26	793,5	0,05			
661,25	998,4	0,06			
662,62	4255,5	0,27			
663,94	1763,4	0,11			
665,02	551,3	0,03			
665,81	251,5	0,02			
667,03	962,6	0,06			
667,70	59,4	0,00			
668,47	316,6	0,02			
669,40	263,3	0,02			
669,93	22,8	0,00			
670,45	310,3	0,02			
671,38	610,5	0,04			
672,42	337,3	0,02			
673,31	1102,8	0,07			
674,48	752,4	0,05			
675,36	1349,7	0,08			
676,94	11262,3	0,70			
678,19	4094,6	0,26			
679,20	1272,5	0,08			
680,41	348,3	0,02			
681,26	231,9	0,01			
682,23	191,6	0,01			
683,12	228,2	0,01			
683,91	161,4	0,01			
684,80	257,0	0,02			
685,54	439,4	0,03			
686,50	282,1	0,02			
687,34	1336,7	0,08			
688,35	482,2	0,03			
689,28	2982,8	0,19			
689,88	149,5	0,01			
690,52	1548,3	0,10			
691,52	1520,9	0,10			
692,61	817,5	0,05			
693,61	407,7	0,03			
694,58	245,5	0,02			

**Mycobacterium togolense.-**

=====  
Fixed Wavelength Report  
Date 7/25/2006 Time 10:17:40 Page 1 of 1  
=====

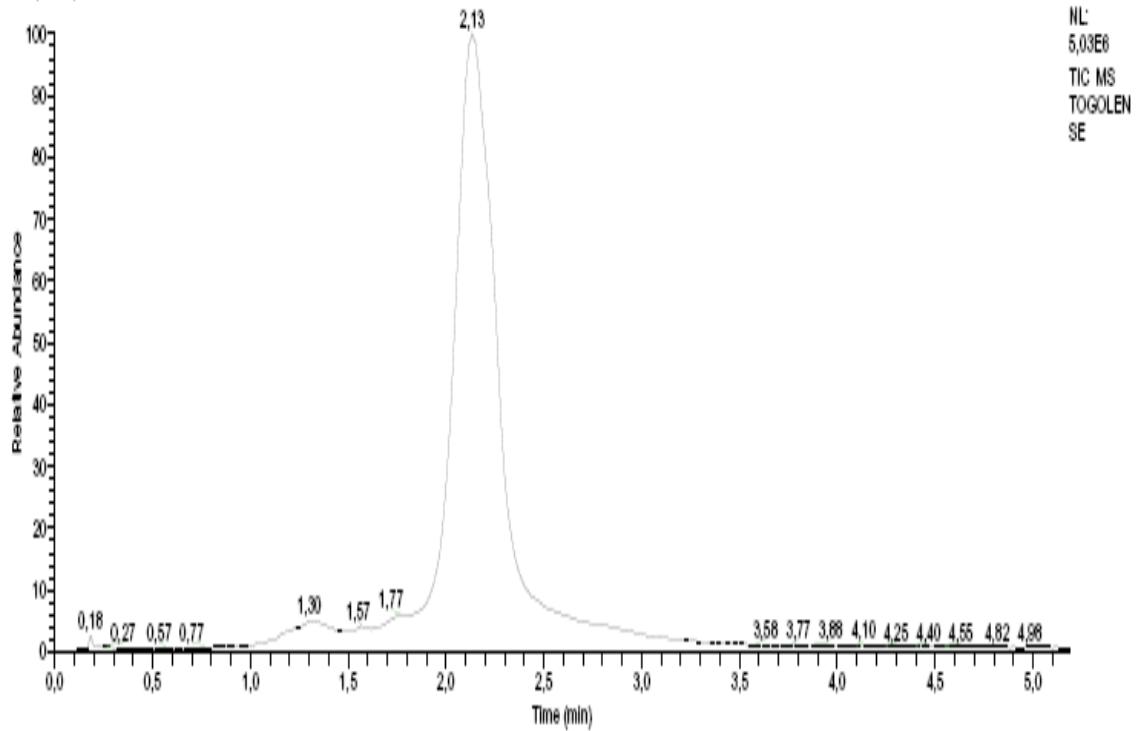
Method file : LOWRY.M ( modified )      Last update: Date 7/25/2006      Time 9:40:05 AM  
Information : Default Method  
Data File : <untitled>



# Name  
-----  
1 M. togolense

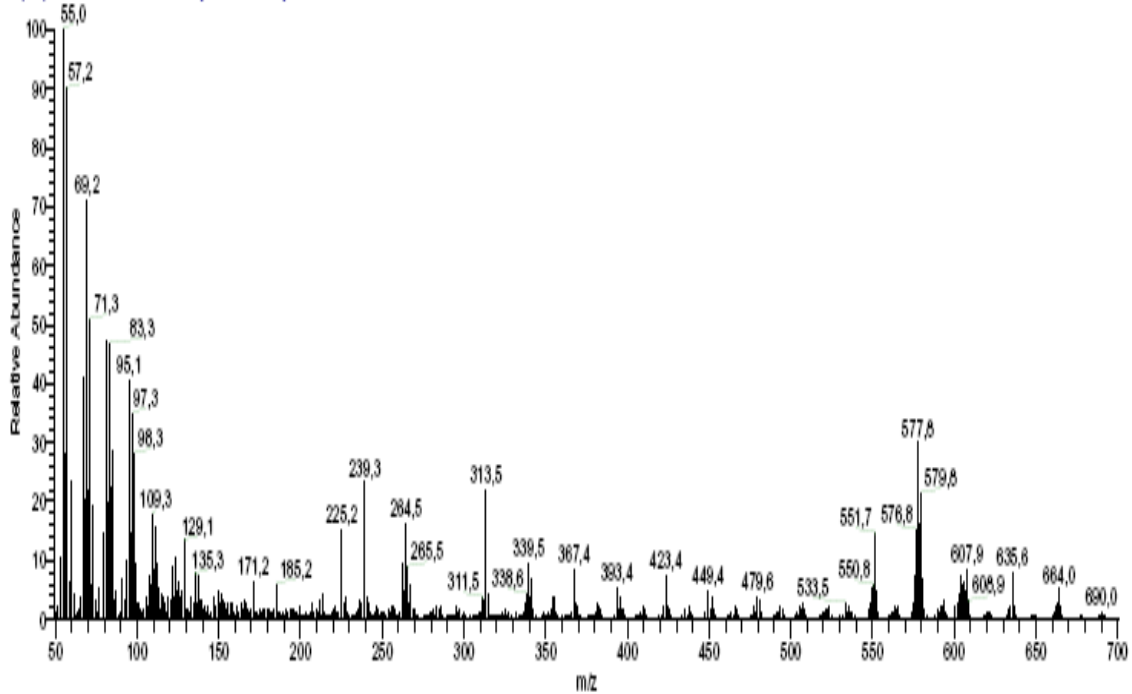
Report generated by : medicina  
Signature: .....  
-----  
\*\*\* End Fixed Wavelength Report \*\*\*  
-----

RT: 0,00 - 5,18



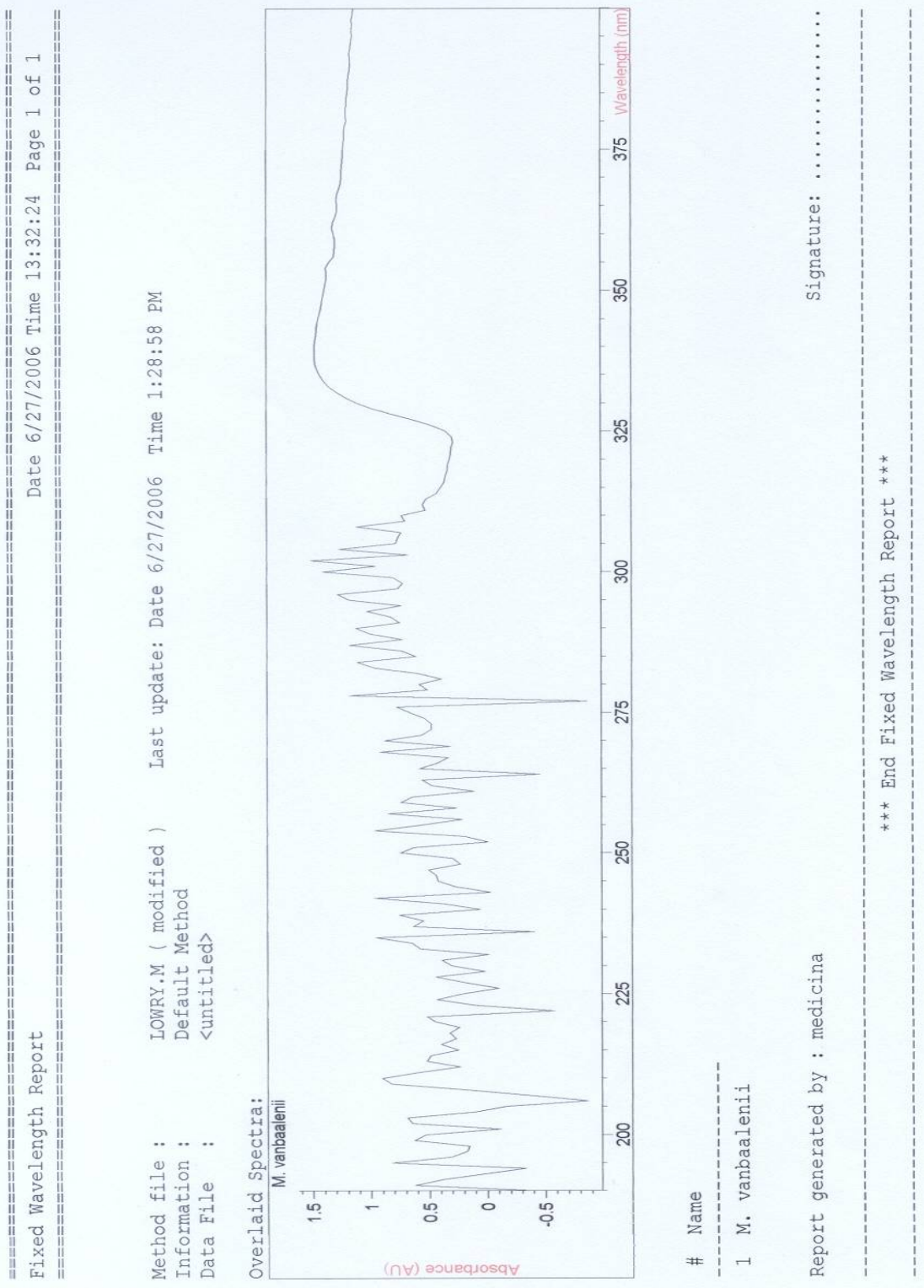
TOGOLENSE #122 RT: 2,13 AV: 1 NL: 2,73E5

T: (0:0) + c EI del=350,00 Full ms [ 50,00-700,00]

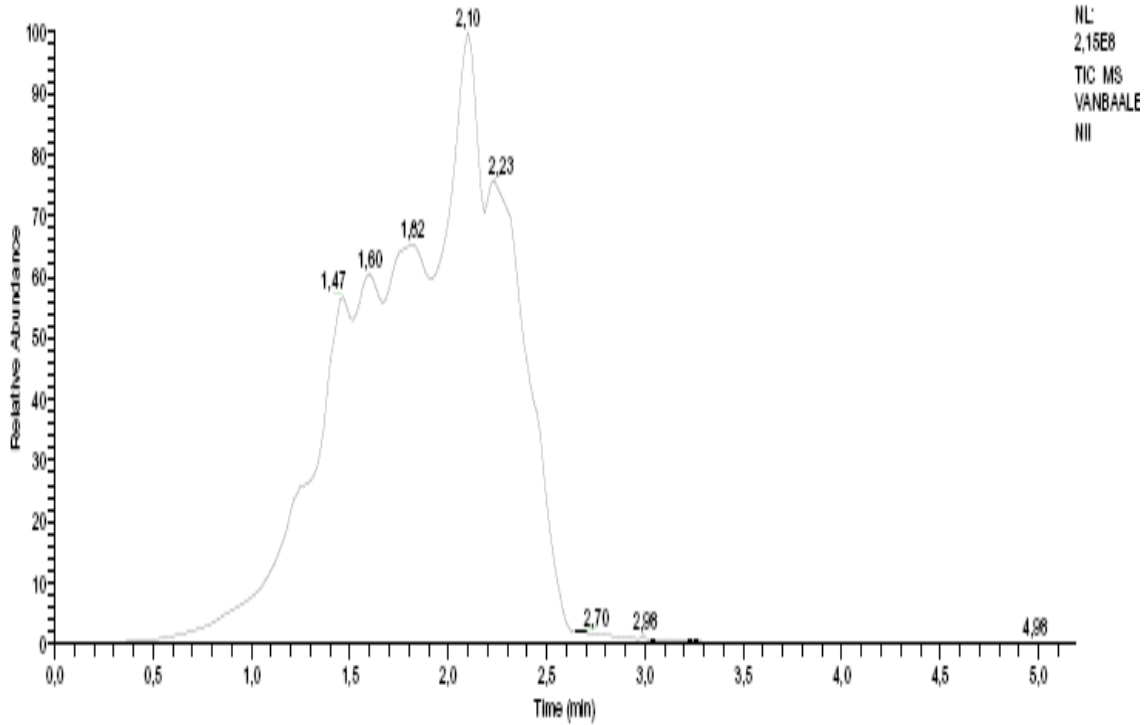




**Mycobacterium vanbaalenii.-**

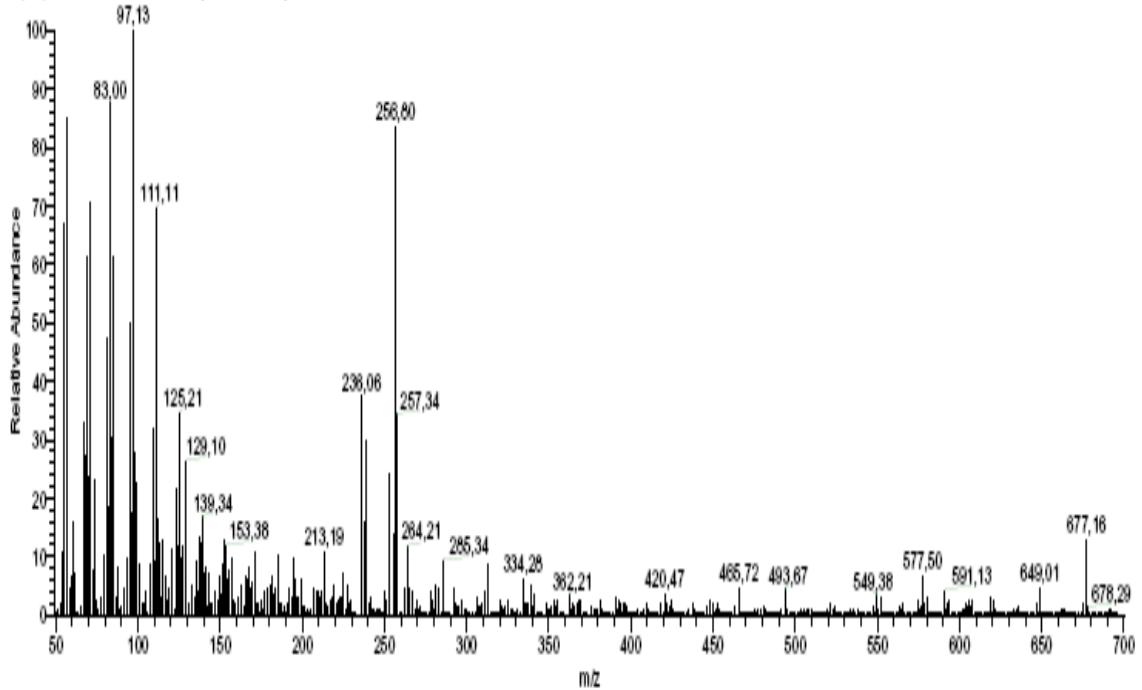


RT: 0,00 - 5,18



VANBAALENII #116-131 RT: 2,03-2,28 AV: 16 NL: 7,74E6

T: (0,0) + c EI del=350,00 Full ms [ 50,00-700,00]



m/z	Intensity	Relative						
			104,26	17221,0	0,22	157,08	746448,0	9,65
			104,95	305028,0	3,94	158,39	188244,0	2,43
50,35	26310,8	0,34	105,50	41852,0	0,54	159,35	124199,0	1,61
51,23	45781,0	0,59	107,01	659584,0	8,52	161,07	235100,0	3,04
53,00	126204,0	1,63	109,05	2455408,0	31,73	162,36	48046,0	0,62
54,00	806288,0	10,42	110,31	688496,0	8,90	163,15	385916,0	4,99
55,00	5157248,0	66,65	111,11	5379968,0	69,53	164,36	106368,0	1,37
56,35	1107712,0	14,32	112,52	1250144,0	16,16	165,19	519952,0	6,72
57,08	6569856,0	84,90	113,41	932912,0	12,06	166,37	474232,0	6,13
58,43	342516,0	4,43	114,36	227192,0	2,94	167,36	638560,0	8,25
59,31	517040,0	6,68	115,15	992096,0	12,82	168,42	325740,0	4,21
60,23	1231600,0	15,92	116,42	502224,0	6,49	169,37	409276,0	5,29
61,34	543952,0	7,03	117,38	180804,0	2,34	171,12	831200,0	10,74
62,46	5245,8	0,07	118,33	16677,0	0,22	172,46	144232,0	1,86
63,26	27189,3	0,35	119,04	347948,0	4,50	173,37	142369,0	1,84
64,95	85088,0	1,10	121,05	866880,0	11,20	174,36	20745,0	0,27
66,98	2541872,0	32,85	122,32	82188,0	1,06	175,14	174067,0	2,25
68,32	2098080,0	27,11	123,09	1679072,0	21,70	176,37	45967,0	0,59
69,22	4743616,0	61,30	124,35	914240,0	11,82	177,16	284216,0	3,67
70,35	1832000,0	23,68	125,21	2661040,0	34,39	178,38	71907,0	0,93
71,14	5462976,0	70,60	126,43	752372,0	9,72	179,19	342640,0	4,43
72,39	591888,0	7,65	127,34	912272,0	11,79	180,37	386868,0	5,00
73,24	1776096,0	22,95	129,10	2025184,0	26,17	181,39	512980,0	6,63
74,36	171028,0	2,21	130,49	155407,0	2,01	182,46	259732,0	3,36
75,31	60940,0	0,79	131,35	152275,0	1,97	183,39	324996,0	4,20
76,99	204624,0	2,64	133,04	363568,0	4,70	185,16	796816,0	10,30
79,02	781424,0	10,10	134,31	214344,0	2,77	186,49	132678,0	1,71
81,06	3643136,0	47,08	135,20	719396,0	9,30	187,38	128295,0	1,66
82,29	1404800,0	18,15	136,35	307628,0	3,98	188,39	36193,5	0,47
83,00	6760832,0	87,37	137,25	1012304,0	13,08	189,25	121708,0	1,57
84,33	2322672,0	30,02	138,35	952480,0	12,31	190,40	41251,0	0,53
85,24	4731264,0	61,14	139,34	1287200,0	16,63	191,19	127357,0	1,65
86,47	236684,0	3,06	140,40	544692,0	7,04	192,27	338588,0	4,38
87,28	605272,0	7,82	141,35	614408,0	7,94	193,41	219448,0	2,84
88,42	65290,0	0,84	142,38	103093,0	1,33	194,28	729632,0	9,43
89,26	110941,0	1,43	143,17	540864,0	6,99	195,45	482916,0	6,24
91,06	340468,0	4,40	144,39	130286,0	1,68	196,49	226036,0	2,92
93,02	759024,0	9,81	145,32	146093,0	1,89	197,44	218752,0	2,83
95,06	3863296,0	49,93	147,05	299772,0	3,87	199,14	458684,0	5,93
96,29	1341120,0	17,33	148,33	171704,0	2,22	200,47	102122,0	1,32
97,13	7737920,0	100,00	149,20	502728,0	6,50	201,41	109512,0	1,42
98,35	2152576,0	27,82	150,35	243116,0	3,14	202,46	40629,3	0,53
99,31	1732016,0	22,38	151,28	674188,0	8,71	203,39	64595,0	0,83
100,40	224768,0	2,90	152,36	995552,0	12,87	204,41	33984,5	0,44
101,23	657224,0	8,49	153,38	903280,0	11,67	205,32	83451,0	1,08
102,44	146512,0	1,89	154,41	453400,0	5,86	207,14	330476,0	4,27
103,31	144281,0	1,86	155,35	565248,0	7,30	208,44	286348,0	3,70

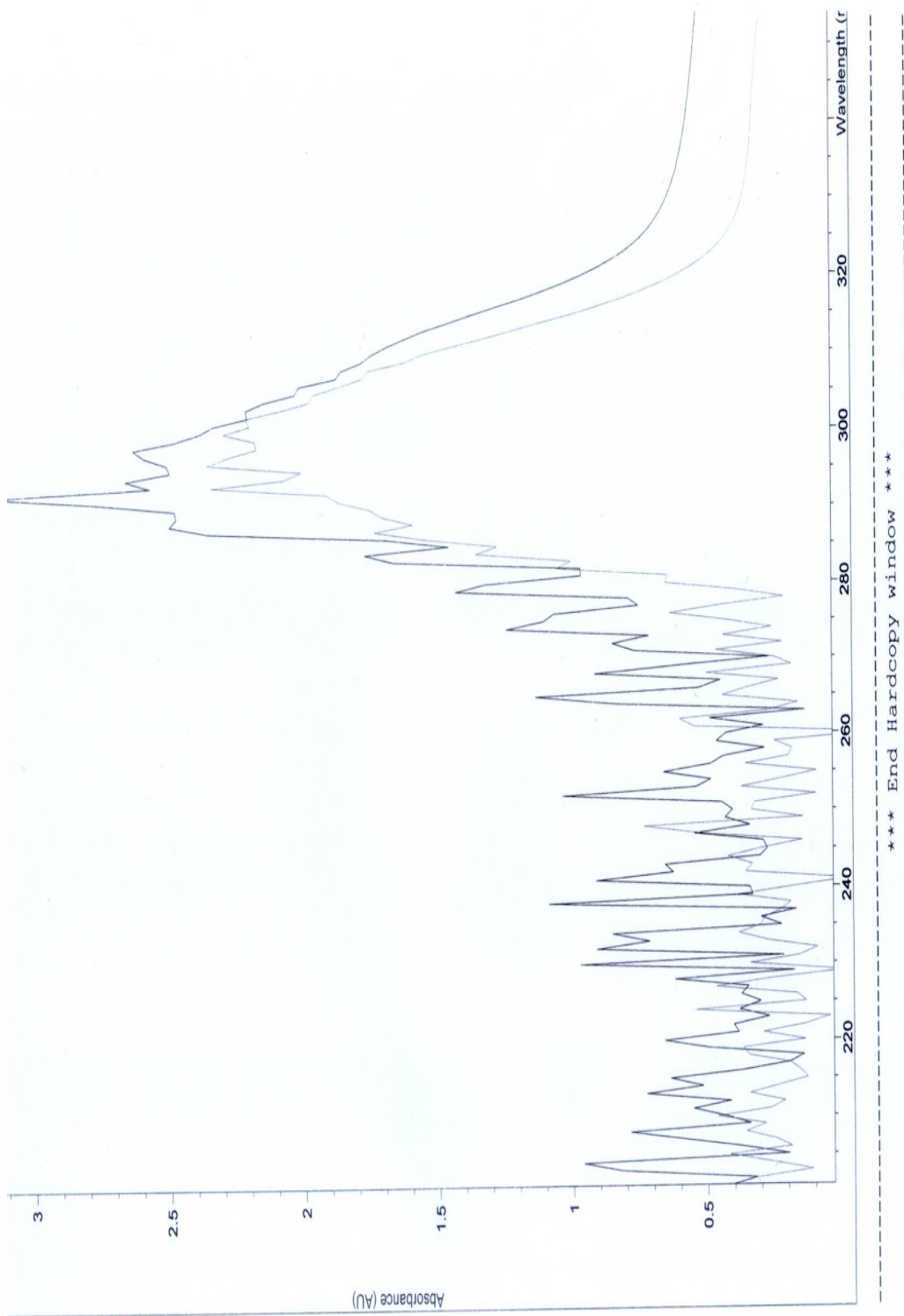
209,46	295952,0	3,82	267,34	310679,0	4,02	320,11	188878,0	2,44
210,47	211860,0	2,74	268,55	72766,0	0,94	321,60	90216,0	1,17
211,43	299264,0	3,87	269,40	164834,0	2,13	322,60	74066,0	0,96
213,19	819616,0	10,59	270,56	63981,0	0,83	323,57	87947,0	1,14
214,53	137938,0	1,78	271,39	108287,0	1,40	325,29	189860,0	2,45
215,45	100102,0	1,29	272,67	26897,8	0,35	326,61	64281,0	0,83
217,16	196828,0	2,54	273,47	36065,0	0,47	327,64	73037,0	0,94
218,41	235164,0	3,04	274,52	17517,0	0,23	328,69	12778,5	0,17
219,37	383600,0	4,96	275,36	42372,3	0,55	329,57	14612,5	0,19
220,50	136979,0	1,77	277,11	17780,0	0,23	331,22	48837,0	0,63
221,43	177354,0	2,29	278,02	313460,0	4,05	332,49	8569,3	0,11
222,45	230472,0	2,98	279,54	163984,0	2,12	334,28	458424,0	5,92
223,46	225180,0	2,91	280,49	61848,0	0,80	335,66	141913,0	1,83
224,45	50776,0	0,66	281,21	379248,0	4,90	336,62	129457,0	1,67
225,15	558808,0	7,22	283,18	324648,0	4,20	337,59	138684,0	1,79
226,44	51885,0	0,67	284,51	34173,0	0,44	339,21	383460,0	4,96
227,23	386920,0	5,00	285,34	705060,0	9,11	339,76	10140,0	0,13
228,47	158785,0	2,05	286,64	31370,0	0,41	340,57	87441,0	1,13
229,50	170075,0	2,20	287,58	13937,5	0,18	341,53	246468,0	3,19
230,56	23746,0	0,31	288,49	12208,0	0,16	342,67	22440,8	0,29
231,45	32415,5	0,42	289,35	33997,8	0,44	343,64	11028,8	0,14
232,41	23544,0	0,30	290,47	1897,5	0,02	344,53	7004,0	0,09
236,06	2880336,0	37,22	292,04	326748,0	4,22	345,39	23975,0	0,31
237,49	1217280,0	15,73	293,58	130417,0	1,69	346,50	4040,3	0,05
239,26	2280496,0	29,47	294,57	97497,0	1,26	348,12	159456,0	2,06
240,64	161504,0	2,09	295,53	117247,0	1,52	349,62	78186,0	1,01
241,52	224604,0	2,90	297,22	198428,0	2,56	350,61	71219,0	0,92
242,57	58533,0	0,76	298,58	47244,0	0,61	351,59	88902,0	1,15
243,48	51784,0	0,67	299,51	60694,0	0,78	353,27	182620,0	2,36
244,45	22049,8	0,28	300,68	16350,3	0,21	354,55	108458,0	1,40
245,37	52652,5	0,68	301,53	16116,5	0,21	355,60	184580,0	2,39
246,44	59471,0	0,77	302,43	4009,7	0,05	356,67	29080,8	0,38
247,46	75860,0	0,98	303,22	37552,0	0,49	357,63	12689,0	0,16
248,45	25479,0	0,33	303,76	718,8	0,01	358,52	5983,2	0,08
249,37	37317,0	0,48	305,17	18716,0	0,24	359,30	25866,3	0,33
250,12	302600,0	3,91	306,10	225200,0	2,91	359,82	1712,3	0,02
251,45	187436,0	2,42	307,59	107616,0	1,39	360,53	3731,5	0,05
253,14	1867616,0	24,14	308,58	99716,0	1,29	362,21	250900,0	3,24
255,22	1076064,0	13,91	309,55	124605,0	1,61	363,66	81143,0	1,05
256,80	6473216,0	83,66	311,20	291240,0	3,76	364,54	124043,0	1,60
257,34	2643456,0	34,16	313,34	671596,0	8,68	365,62	91774,0	1,19
259,68	8003,0	0,10	314,64	25600,0	0,33	367,27	146720,0	1,90
260,54	30377,3	0,39	315,58	16102,3	0,21	368,03	130248,0	1,68
262,17	341468,0	4,41	316,58	11574,3	0,15	368,55	170596,0	2,20
264,21	894480,0	11,56	317,44	25045,3	0,32	369,69	201332,0	2,60
265,55	353792,0	4,57	318,48	9344,5	0,12	370,81	34325,0	0,44
266,59	103818,0	1,34	319,44	5427,0	0,07	371,68	7089,5	0,09

372,58	2358,8	0,03	424,48	173686,0	2,24	473,31	23156,3	0,30
373,30	24983,8	0,32	425,74	81166,0	1,05	474,58	20539,3	0,27
374,54	3618,5	0,05	426,73	16313,3	0,21	475,45	52823,8	0,68
376,09	98938,0	1,28	427,70	9088,5	0,12	476,64	26956,3	0,35
377,62	56040,0	0,72	428,60	8192,4	0,11	477,44	73472,0	0,95
378,60	54732,0	0,71	429,56	11308,3	0,15	478,63	13239,0	0,17
379,57	81149,0	1,05	430,55	9144,1	0,12	479,33	71836,0	0,93
381,25	175660,0	2,27	431,50	17035,3	0,22	480,61	116574,0	1,51
382,61	60737,0	0,78	432,57	22545,5	0,29	481,79	56430,0	0,73
383,63	40445,3	0,52	433,58	27866,3	0,36	482,83	11691,8	0,15
384,67	12804,8	0,17	434,63	10258,3	0,13	483,77	6698,0	0,09
385,60	10371,2	0,13	435,33	80527,0	1,04	484,70	6658,9	0,09
386,54	7919,1	0,10	435,84	1842,8	0,02	485,63	7790,6	0,10
387,47	14727,8	0,19	437,36	152141,0	1,97	486,56	6006,2	0,08
388,51	15024,3	0,19	438,76	50443,3	0,65	487,46	16789,4	0,22
390,35	205566,0	2,66	439,69	14669,3	0,19	488,59	19118,3	0,25
391,68	48304,0	0,62	440,69	7921,0	0,10	489,59	26060,5	0,34
392,43	184785,0	2,39	441,63	7147,3	0,09	490,64	10982,8	0,14
393,55	139517,0	1,80	442,57	6733,8	0,09	491,39	72795,0	0,94
394,65	18197,0	0,24	443,54	8278,2	0,11	493,67	327280,0	4,23
395,29	127329,0	1,65	444,47	14743,2	0,19	494,73	38821,0	0,50
396,56	153432,0	1,98	446,39	93539,0	1,21	495,44	47735,3	0,62
397,66	101440,0	1,31	447,67	19867,0	0,26	496,08	2374,0	0,03
398,71	23073,8	0,30	448,47	188629,0	2,44	496,77	4739,6	0,06
399,69	11639,5	0,15	449,69	128029,0	1,65	497,72	5775,5	0,07
400,60	8041,2	0,10	450,70	37700,0	0,49	498,62	5434,9	0,07
401,54	12098,9	0,16	451,48	73528,0	0,95	499,57	8582,8	0,11
402,53	6616,9	0,09	452,55	133565,0	1,73	500,56	1942,9	0,03
403,43	13770,8	0,18	453,77	67444,0	0,87	501,32	25949,0	0,34
404,28	45846,5	0,59	454,79	14224,6	0,18	502,63	11757,8	0,15
405,61	38144,5	0,49	455,72	7409,3	0,10	503,35	48896,0	0,63
406,58	31512,0	0,41	456,64	5686,5	0,07	503,93	3434,5	0,04
407,46	80531,0	1,04	457,57	7973,2	0,10	504,66	12096,5	0,16
409,33	155664,0	2,01	458,56	5316,4	0,07	505,42	58682,0	0,76
410,64	51232,0	0,66	459,36	17294,4	0,22	506,63	19686,5	0,25
411,66	21339,5	0,28	460,57	20452,0	0,26	507,46	52104,0	0,67
412,65	10475,2	0,14	461,59	24848,8	0,32	508,57	79817,0	1,03
413,60	9831,8	0,13	462,63	7462,8	0,10	509,77	51828,0	0,67
414,60	7450,5	0,10	463,35	86454,0	1,12	510,68	15268,5	0,20
415,45	14968,4	0,19	465,72	351380,0	4,54	511,68	22839,6	0,30
416,55	13845,0	0,18	466,83	40613,0	0,52	512,74	9696,2	0,13
418,37	131998,0	1,71	467,81	11836,5	0,15	513,65	8725,6	0,11
419,67	22938,0	0,30	468,78	5227,6	0,07	514,55	5045,2	0,07
420,47	268642,0	3,47	469,71	6014,8	0,08	515,47	15994,8	0,21
421,70	127997,0	1,65	470,62	5631,8	0,07	516,61	15729,3	0,20
422,68	21243,3	0,27	471,55	8337,1	0,11	517,53	27657,0	0,36
423,34	109432,0	1,41	472,55	4381,6	0,06	518,66	8124,3	0,10

519,38	59323,0	0,77	566,70	17960,3	0,23	610,97	6928,8	0,09
520,66	7511,5	0,10	567,86	5573,1	0,07	611,86	5894,4	0,08
521,40	131710,0	1,70	568,87	5466,1	0,07	612,72	4493,4	0,06
522,68	45104,3	0,58	569,75	6194,4	0,08	613,66	9950,5	0,13
523,85	98544,8	1,27	570,64	3380,5	0,04	614,87	11740,3	0,15
524,77	6970,8	0,09	571,67	9329,5	0,12	615,69	11089,8	0,14
525,79	5629,8	0,07	572,68	8893,0	0,11	616,63	14782,0	0,19
526,70	5106,1	0,07	573,65	12549,3	0,16	617,83	11430,8	0,15
527,61	8930,6	0,12	574,69	183788,0	2,38	619,15	204802,0	2,65
528,57	2464,4	0,03	575,53	69336,0	0,90	619,75	37520,0	0,48
529,37	24732,7	0,32	576,67	121724,0	1,57	620,72	174926,0	2,26
530,65	16169,8	0,21	577,50	505495,0	6,53	621,62	83850,0	1,08
531,58	29570,3	0,38	578,07	12508,0	0,16	622,12	6663,0	0,09
532,70	8740,5	0,11	578,83	153688,0	1,99	623,06	10774,0	0,14
533,45	50836,5	0,66	579,95	241804,0	3,12	623,94	7065,8	0,09
534,70	10361,8	0,13	580,86	36116,5	0,47	624,79	7984,8	0,10
535,43	62097,5	0,80	581,88	8130,3	0,11	625,76	9433,6	0,12
536,66	37656,5	0,49	582,91	5475,5	0,07	626,76	6626,6	0,09
537,83	47504,5	0,61	583,80	6428,6	0,08	627,72	9470,1	0,12
538,71	11311,5	0,15	584,74	5315,8	0,07	628,76	11906,8	0,15
539,78	6134,3	0,08	585,65	10434,6	0,13	629,76	10857,9	0,14
540,76	5382,0	0,07	586,71	10338,8	0,13	630,70	8328,5	0,11
541,68	6272,3	0,08	587,62	10674,1	0,14	631,62	18001,3	0,23
542,53	1615,5	0,02	588,52	17719,5	0,23	633,03	83085,5	1,07
543,36	16553,5	0,21	589,67	2799,0	0,04	633,75	41195,0	0,53
543,94	233,0	0,00	590,30	32104,0	0,41	634,76	74432,0	0,96
544,61	11692,1	0,15	591,13	316468,0	4,09	635,92	117384,0	1,52
545,57	14842,5	0,19	591,73	47768,0	0,62	637,00	28285,5	0,37
547,11	112334,0	1,45	592,75	143846,0	1,86	638,03	8607,7	0,11
548,67	27106,0	0,35	593,92	194262,0	2,51	638,87	8457,5	0,11
549,38	246033,0	3,18	594,94	32083,3	0,41	639,83	6798,2	0,09
550,76	75479,0	0,98	595,96	8262,4	0,11	640,74	4725,1	0,06
551,82	212495,0	2,75	596,88	6664,5	0,09	641,65	10481,9	0,14
552,80	18337,5	0,24	597,71	8683,6	0,11	642,78	9802,2	0,13
553,86	7359,8	0,10	598,63	2016,3	0,03	643,75	7867,8	0,10
554,86	5060,6	0,07	599,41	15079,8	0,19	644,67	15965,0	0,21
555,72	5793,1	0,07	600,02	33244,0	0,43	645,74	1678,5	0,02
556,67	5058,3	0,07	600,67	21043,5	0,27	646,43	3434,0	0,04
557,63	10709,0	0,14	601,65	50143,3	0,65	647,35	125754,0	1,63
558,66	10139,0	0,13	602,60	60578,5	0,78	648,09	37884,0	0,49
559,61	16601,8	0,21	603,60	136200,0	1,76	649,01	355710,0	4,60
560,69	3666,8	0,05	604,69	88142,0	1,14	650,08	31675,0	0,41
561,36	44217,8	0,57	605,68	163378,0	2,11	651,06	14294,3	0,18
562,67	12609,5	0,16	606,75	103456,0	1,34	652,01	6412,8	0,08
563,41	98506,0	1,27	607,91	164936,0	2,13	652,99	7484,9	0,10
564,66	45216,8	0,58	609,01	39137,0	0,51	653,91	5720,6	0,07
565,79	130425,8	1,69	610,01	8702,8	0,11	654,82	4911,1	0,06

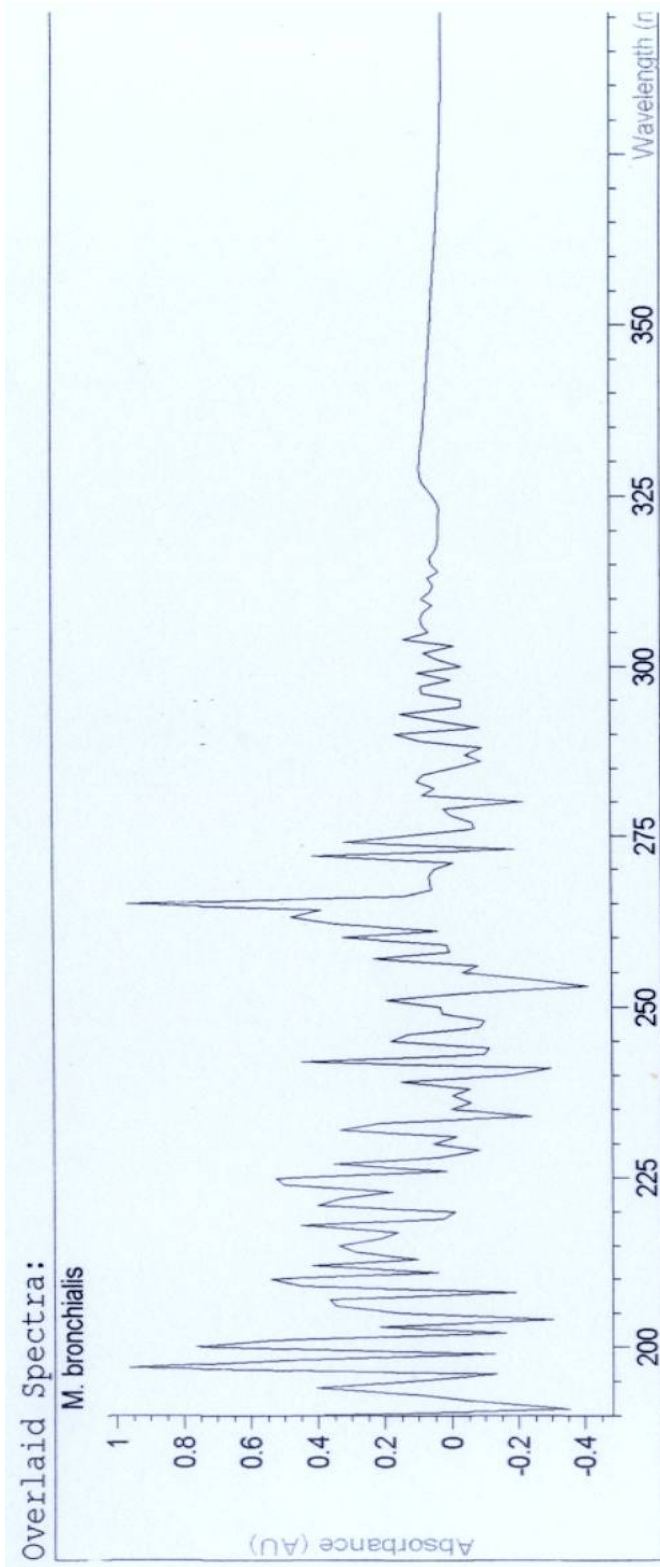
655,75	6099,7	0,08
656,77	12141,0	0,16
657,83	9290,5	0,12
658,77	10655,8	0,14
659,68	12409,6	0,16
660,64	18431,5	0,24
661,59	67239,0	0,87
662,81	60331,0	0,78
664,05	82189,0	1,06
665,10	17098,0	0,22
666,07	6481,6	0,08
666,96	7814,1	0,10
667,95	5765,4	0,07
668,88	5169,3	0,07
669,84	5765,9	0,07
670,85	7582,0	0,10
671,78	4180,8	0,05
672,65	16088,5	0,21
674,55	13973,0	0,18
675,54	129623,0	1,68
677,16	968304,0	12,51
678,29	85888,0	1,11
679,30	11439,0	0,15
680,24	3962,1	0,05
681,18	4552,8	0,06
682,08	4249,9	0,05
683,02	5018,8	0,06
683,83	3746,5	0,05
684,80	10609,8	0,14
685,88	7412,8	0,10
686,87	9816,8	0,13
687,86	9014,8	0,12
688,81	11611,1	0,15
689,84	14986,3	0,19
690,67	53749,0	0,69
692,06	65062,8	0,84
693,24	18388,0	0,24
694,18	4500,1	0,06
695,00	5743,9	0,07
696,01	4236,3	0,05
696,96	3987,8	0,05

**Nocardia farcinica**.-





Gordonia bronchialis.-



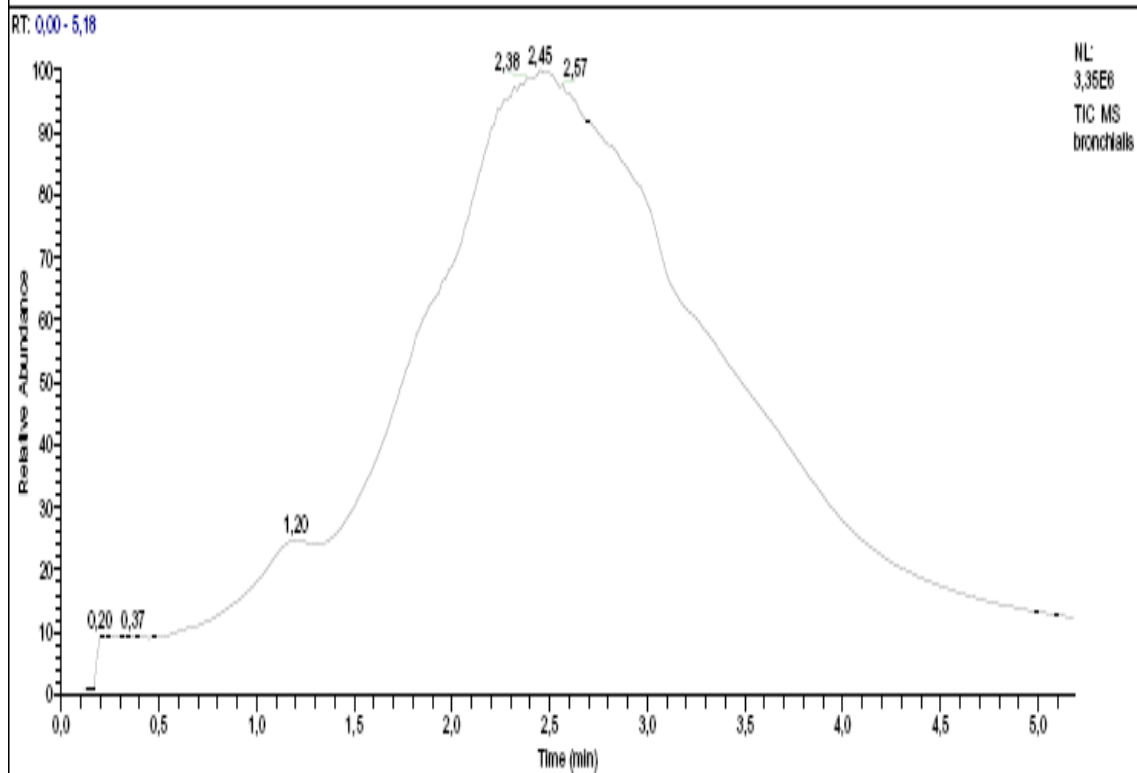
# Name

1 *M. bronchialis*

Report generated by : medicina

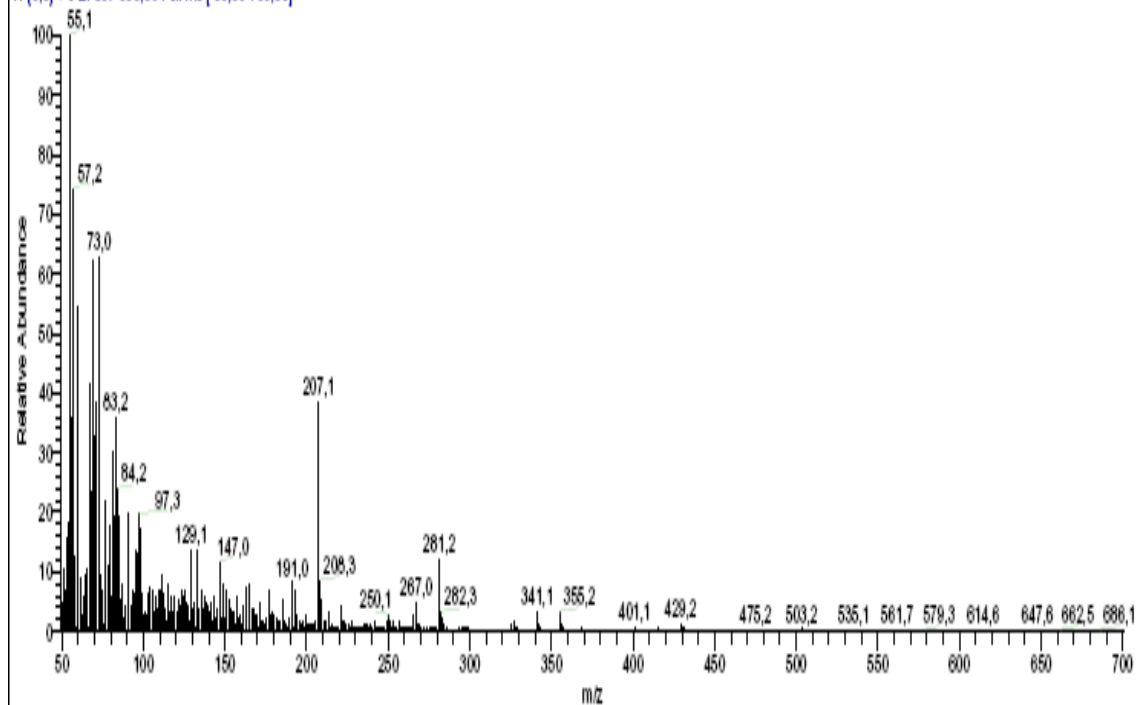
Signature: .....

\*\*\* End Fixed Wavelength Report \*\*\*



bronchialis #121-171 RT: 2,12-2,95 AV: 51 NL: 2,01E5

T: (0;0) + e EI del=350,00 Full ms [ 50,00-700,00]



Bronchialis			101,3	6615,3	3,29	156,2	1837,0	0,91
			102,3	5346,9	2,66	157,1	11340,9	5,64
			103,2	12478,9	6,21	158,3	4055,4	2,02
m/z	Intensity	Relative	104,3	14469,2	7,20	159,2	4971,9	2,47
			105,3	13835,3	6,89	160,3	2301,3	1,15
			106,3	5925,3	2,95	161,1	8000,2	3,98
			107,3	11097,7	5,52	162,1	151,8	0,08
			108,3	7333,2	3,65	163,0	14202,2	7,07
			109,3	13150,3	6,55	164,1	403,9	0,20
			110,3	13714,0	6,83	165,0	16072,5	8,00
			111,3	19310,4	9,61	166,3	7211,1	3,59
			112,3	12365,4	6,15	167,3	7148,3	3,56
			113,3	7798,2	3,88	168,3	5047,1	2,51
			114,3	3558,1	1,77	169,3	5237,3	2,61
			115,1	16237,0	8,08	170,2	1184,9	0,59
			116,3	6433,6	3,20	171,1	9837,5	4,90
			117,2	11919,8	5,93	172,3	2974,5	1,48
			118,3	5938,1	2,96	173,3	3301,5	1,64
			119,3	11025,6	5,49	174,3	2588,5	1,29
			120,3	6021,2	3,00	175,3	4309,0	2,14
			121,3	10257,9	5,11	176,0	186,3	0,09
			122,3	8767,7	4,36	176,9	13128,8	6,53
			123,3	13150,3	6,55	177,5	375,8	0,19
			124,3	11436,9	5,69	178,3	5766,2	2,87
			125,3	13120,2	6,53	179,2	6462,9	3,22
			126,3	9204,3	4,58	180,3	5808,5	2,89
			127,3	8338,8	4,15	181,3	4301,3	2,14
			128,3	3613,9	1,80	182,3	2999,4	1,49
			129,1	27348,9	13,61	183,3	3533,5	1,76
			130,3	6881,8	3,43	184,1	86,5	0,04
			131,3	9265,5	4,61	185,1	10956,0	5,45
			132,3	1090,9	0,54	185,7	94,9	0,05
			133,0	26899,4	13,39	186,4	3556,0	1,77
			134,3	7779,8	3,87	187,3	2597,8	1,29
			135,2	13819,8	6,88	188,3	1421,7	0,71
			136,3	7104,9	3,54	189,2	3979,0	1,98
			137,3	11133,4	5,54	190,0	22,8	0,01
			138,3	9293,3	4,63	191,0	16300,6	8,11
			139,3	8784,0	4,37	192,3	744,1	0,37
			140,3	6003,6	2,99	193,0	13278,7	6,61
			141,3	8916,6	4,44	194,3	4915,4	2,45
			142,2	2869,9	1,43	195,3	3678,4	1,83
			143,1	11223,7	5,59	196,4	2268,5	1,13
			144,3	4650,3	2,31	197,3	2886,1	1,44
			145,2	7444,2	3,71	198,3	927,9	0,46
			147,0	23350,9	11,62	199,2	5347,9	2,66
			148,3	4718,4	2,35	200,4	1991,0	0,99
			149,1	15330,4	7,63	201,4	1894,9	0,94
			150,2	4457,4	2,22	202,3	2247,6	1,12
			151,1	14052,9	6,99	203,3	2367,6	1,18
			152,3	10533,3	5,24	204,3	1925,3	0,96
			153,3	7827,8	3,90	205,3	3069,7	1,53
			154,3	6082,6	3,03	207,1	76991,1	38,32
			155,3	6752,2	3,36	208,3	16752,7	8,34

209,3	10270,9	5,11	261,4	855,9	0,43	316,4	387,8	0,19
210,4	2640,2	1,31	262,4	897,5	0,45	317,4	356,7	0,18
211,3	3041,9	1,51	263,3	816,9	0,41	318,4	358,5	0,18
212,3	203,7	0,10	264,4	1233,1	0,61	319,4	330,8	0,16
213,2	6642,3	3,31	265,1	5139,7	2,56	320,5	353,5	0,18
214,4	1641,9	0,82	266,1	161,9	0,08	321,4	312,0	0,16
215,4	1672,9	0,83	267,0	9182,1	4,57	322,5	389,6	0,19
216,4	1252,4	0,62	268,3	2326,5	1,16	323,4	542,6	0,27
217,4	1452,0	0,72	269,3	2129,1	1,06	324,0	85,0	0,04
218,4	1295,6	0,64	270,4	1218,6	0,61	325,1	2402,0	1,20
219,4	1606,8	0,80	271,4	857,2	0,43	326,0	302,5	0,15
220,1	35,7	0,02	272,4	580,5	0,29	327,0	3322,2	1,65
221,1	7915,2	3,94	273,4	673,9	0,34	328,3	902,2	0,45
222,4	2865,2	1,43	274,4	636,2	0,32	329,2	791,3	0,39
223,4	3033,1	1,51	275,4	741,5	0,37	330,3	388,4	0,19
224,4	2198,0	1,09	276,4	747,2	0,37	331,3	338,6	0,17
225,4	2230,5	1,11	277,4	678,4	0,34	332,4	285,9	0,14
226,3	952,6	0,47	278,4	838,0	0,42	333,4	299,3	0,15
227,3	3267,4	1,63	279,3	779,4	0,39	334,5	326,8	0,16
227,8	39,0	0,02	281,2	24235,7	12,06	335,4	339,7	0,17
228,4	1594,4	0,79	282,3	6048,5	3,01	336,5	271,7	0,14
229,4	1290,0	0,64	283,3	4429,1	2,20	337,5	286,2	0,14
230,4	1025,1	0,51	284,4	2228,3	1,11	338,6	300,5	0,15
231,4	1247,6	0,62	285,4	1465,9	0,73	339,3	500,4	0,25
232,4	1134,6	0,56	286,4	600,7	0,30	339,9	33,5	0,02
233,4	1263,5	0,63	287,4	573,1	0,29	341,1	6229,3	3,10
234,4	1202,7	0,60	288,4	460,3	0,23	342,3	1819,6	0,91
235,3	1893,9	0,94	289,4	561,9	0,28	343,3	1423,1	0,71
236,4	1876,1	0,93	290,4	495,0	0,25	344,4	505,0	0,25
237,4	1900,7	0,95	291,4	587,5	0,29	345,4	342,4	0,17
238,4	1088,5	0,54	292,4	589,9	0,29	346,4	270,5	0,13
239,3	2632,6	1,31	293,4	713,9	0,36	347,4	236,5	0,12
240,3	801,5	0,40	294,3	328,3	0,16	348,4	257,8	0,13
241,3	2654,2	1,32	295,2	1591,1	0,79	349,4	245,6	0,12
242,4	1351,1	0,67	296,4	749,8	0,37	350,5	250,0	0,12
243,4	1180,1	0,59	297,3	870,5	0,43	351,5	303,8	0,15
244,4	869,8	0,43	298,4	715,1	0,36	352,5	216,4	0,11
245,4	938,6	0,47	299,4	718,1	0,36	353,4	437,9	0,22
246,4	1065,4	0,53	300,4	586,5	0,29	354,0	47,4	0,02
247,4	1535,9	0,76	301,4	558,7	0,28	355,2	6209,6	3,09
248,3	102,9	0,05	302,4	441,2	0,22	356,3	1962,2	0,98
249,0	3728,8	1,86	303,4	475,3	0,24	357,3	1424,5	0,71
249,6	29,8	0,01	304,4	401,6	0,20	358,4	498,4	0,25
250,1	5023,9	2,50	305,4	520,8	0,26	359,4	314,3	0,16
251,2	3514,6	1,75	306,4	601,8	0,30	360,4	227,1	0,11
252,3	1136,7	0,57	307,4	442,4	0,22	361,4	197,9	0,10
253,2	3640,1	1,81	308,4	479,9	0,24	362,5	199,5	0,10
254,4	1163,3	0,58	309,4	601,6	0,30	363,5	191,7	0,10
255,3	1441,3	0,72	310,4	446,1	0,22	364,5	207,8	0,10
256,4	3148,1	1,57	311,3	635,1	0,32	365,5	202,3	0,10
257,5	1231,4	0,61	312,4	554,1	0,28	366,4	341,2	0,17
258,4	722,7	0,36	313,4	580,0	0,29	367,4	277,5	0,14
259,4	829,6	0,41	314,4	553,6	0,28	368,5	807,6	0,40
260,4	901,5	0,45	315,4	451,9	0,22	369,5	620,1	0,31

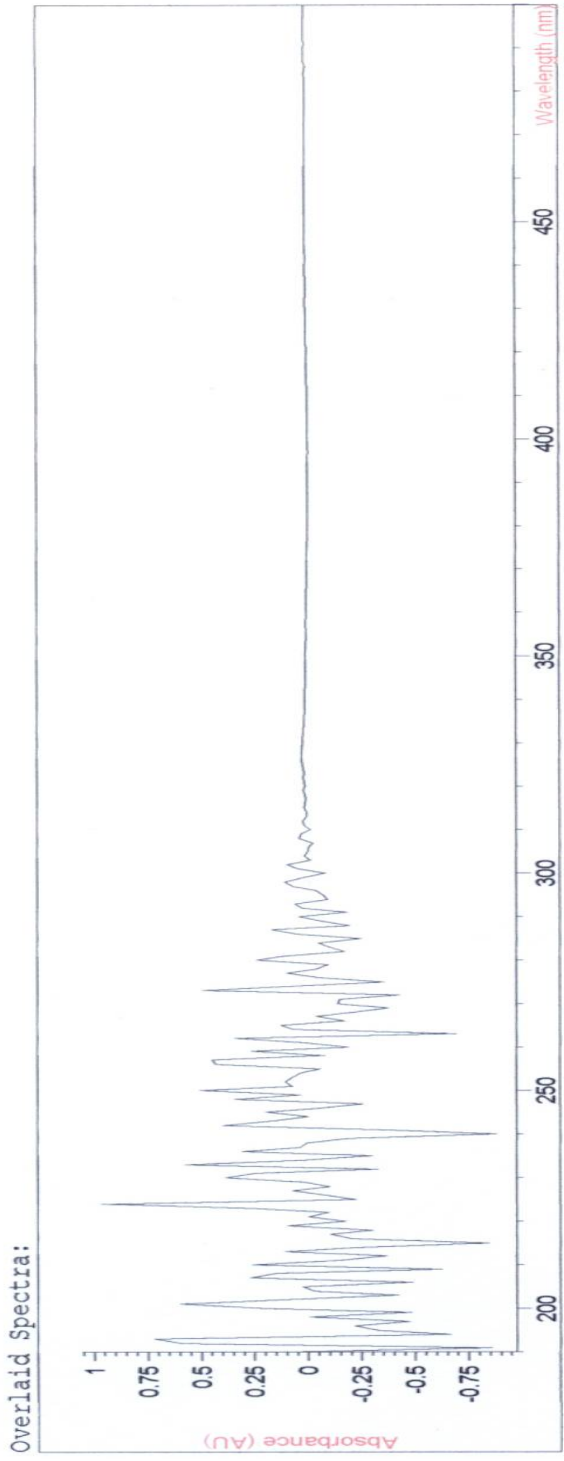
370,5	331,5	0,17	423,5	121,0	0,06	473,4	114,8	0,06
371,5	301,5	0,15	424,5	133,2	0,07	474,5	125,0	0,06
372,6	216,5	0,11	425,4	122,2	0,06	475,2	245,6	0,12
373,5	202,2	0,10	426,4	109,9	0,05	476,2	172,7	0,09
374,5	183,0	0,09	427,2	96,4	0,05	477,1	146,8	0,07
375,5	163,0	0,08	427,8	103,8	0,05	478,1	122,5	0,06
376,5	179,4	0,09	429,2	2620,9	1,30	479,2	107,8	0,05
377,5	153,2	0,08	430,3	1056,5	0,53	480,1	78,8	0,04
378,5	160,1	0,08	431,3	828,5	0,41	480,9	77,2	0,04
379,5	189,9	0,09	432,3	312,8	0,16	481,7	82,2	0,04
380,5	192,6	0,10	433,3	186,1	0,09	482,7	110,4	0,05
381,5	183,7	0,09	434,4	130,2	0,06	483,7	101,2	0,05
382,5	350,7	0,17	435,4	127,1	0,06	484,7	101,6	0,05
383,3	384,2	0,19	436,4	114,2	0,06	485,7	88,3	0,04
384,4	407,9	0,20	437,4	110,7	0,06	486,6	83,5	0,04
385,3	417,8	0,21	438,4	112,2	0,06	487,4	93,7	0,05
386,4	309,8	0,15	439,4	110,3	0,05	488,4	118,6	0,06
387,4	254,6	0,13	440,4	123,2	0,06	489,2	214,6	0,11
388,4	177,0	0,09	441,4	131,6	0,07	490,2	148,3	0,07
389,4	165,4	0,08	442,5	135,9	0,07	491,2	134,1	0,07
390,4	162,5	0,08	443,4	132,4	0,07	492,2	91,5	0,05
391,4	136,2	0,07	443,9	2,3	0,00	492,9	56,7	0,03
392,4	146,6	0,07	444,4	128,1	0,06	493,6	87,5	0,04
393,4	163,4	0,08	445,4	127,5	0,06	494,6	89,7	0,04
394,5	153,5	0,08	446,4	155,1	0,08	495,6	91,4	0,05
395,5	165,7	0,08	447,5	123,4	0,06	496,6	90,5	0,05
396,6	191,0	0,10	448,5	124,5	0,06	497,5	87,2	0,04
397,5	175,4	0,09	449,5	109,7	0,05	498,5	98,8	0,05
398,6	114,4	0,06	450,5	94,7	0,05	499,5	104,1	0,05
399,1	552,8	0,28	451,4	99,3	0,05	500,6	105,5	0,05
399,9	175,2	0,09	452,4	107,3	0,05	501,3	92,1	0,05
401,1	1503,8	0,75	453,4	99,1	0,05	502,1	60,6	0,03
402,2	537,7	0,27	454,3	79,5	0,04	503,2	662,8	0,33
403,2	436,9	0,22	454,9	67,2	0,03	504,2	338,0	0,17
404,3	226,9	0,11	455,7	96,7	0,05	505,2	270,5	0,13
405,3	161,4	0,08	456,6	125,3	0,06	506,2	147,1	0,07
406,3	147,1	0,07	457,5	129,5	0,06	507,2	107,3	0,05
407,4	162,1	0,08	458,6	147,0	0,07	508,2	95,9	0,05
408,4	130,9	0,07	459,3	165,0	0,08	509,2	79,4	0,04
409,4	140,9	0,07	460,1	80,3	0,04	510,0	73,5	0,04
410,4	146,0	0,07	460,9	236,2	0,12	510,9	86,8	0,04
411,5	139,3	0,07	461,4	138,5	0,07	511,8	75,6	0,04
412,5	151,8	0,08	462,3	153,9	0,08	512,6	74,2	0,04
413,4	191,1	0,10	463,2	147,4	0,07	513,5	80,9	0,04
414,0	60,5	0,03	464,1	105,9	0,05	514,4	77,0	0,04
415,1	1421,5	0,71	465,0	84,3	0,04	515,3	85,5	0,04
416,3	575,5	0,29	465,8	86,6	0,04	516,3	83,6	0,04
417,2	456,5	0,23	466,6	79,2	0,04	517,2	81,6	0,04
418,3	206,9	0,10	467,5	94,7	0,05	518,1	77,1	0,04
419,3	152,3	0,08	468,4	98,9	0,05	519,0	96,1	0,05
420,3	129,7	0,06	469,4	97,1	0,05	520,0	83,8	0,04
421,3	112,5	0,06	470,4	134,6	0,07	520,9	84,5	0,04
422,0	68,5	0,03	471,6	106,5	0,05	521,7	68,6	0,03
422,6	99,5	0,05	472,5	99,5	0,05	522,5	89,5	0,04

523,5	83,7	0,04	569,6	58,9	0,03	617,7	68,6	0,03
524,5	89,9	0,04	570,3	49,5	0,02	618,6	61,1	0,03
525,5	86,9	0,04	571,1	74,1	0,04	619,5	64,9	0,03
526,5	88,9	0,04	572,1	74,7	0,04	620,5	75,8	0,04
527,6	89,6	0,04	573,1	75,4	0,04	621,0	1,9	0,00
528,6	83,0	0,04	574,1	70,1	0,03	621,6	90,6	0,05
529,5	76,1	0,04	575,0	73,7	0,04	622,7	67,4	0,03
530,4	66,0	0,03	575,9	61,7	0,03	623,7	84,5	0,04
531,1	63,3	0,03	576,8	75,0	0,04	624,7	70,4	0,04
531,9	73,5	0,04	577,5	72,4	0,04	625,7	75,9	0,04
532,9	114,2	0,06	578,4	81,8	0,04	626,7	82,0	0,04
533,7	67,4	0,03	579,3	88,4	0,04	627,8	68,4	0,03
534,4	66,2	0,03	580,4	84,4	0,04	628,7	66,0	0,03
535,1	148,8	0,07	581,4	81,5	0,04	629,6	65,9	0,03
536,0	91,0	0,05	582,4	76,3	0,04	630,6	71,4	0,04
536,7	86,0	0,04	583,3	65,4	0,03	631,6	73,1	0,04
537,4	73,5	0,04	584,2	67,2	0,03	632,6	77,4	0,04
538,3	86,8	0,04	585,1	66,9	0,03	633,7	77,3	0,04
539,3	91,8	0,05	586,0	77,5	0,04	634,8	67,5	0,03
540,3	83,3	0,04	586,6	4,0	0,00	635,7	68,1	0,03
541,2	86,7	0,04	587,1	83,0	0,04	636,7	70,0	0,03
541,8	1,4	0,00	588,2	63,8	0,03	637,7	81,0	0,04
542,4	95,2	0,05	589,0	64,4	0,03	638,7	79,8	0,04
543,4	72,5	0,04	589,9	65,9	0,03	639,7	73,5	0,04
544,4	79,3	0,04	590,8	57,4	0,03	640,7	73,0	0,04
545,3	78,5	0,04	591,5	70,0	0,03	641,7	77,8	0,04
546,4	78,1	0,04	592,5	76,9	0,04	642,2	1,4	0,00
547,4	77,8	0,04	593,4	73,7	0,04	642,8	86,1	0,04
547,9	1,3	0,00	594,3	59,3	0,03	643,9	69,1	0,03
548,4	87,6	0,04	595,0	77,9	0,04	644,9	61,4	0,03
549,3	81,9	0,04	595,8	74,0	0,04	645,8	67,8	0,03
550,1	77,8	0,04	596,7	83,6	0,04	646,7	56,2	0,03
551,0	77,2	0,04	597,7	70,5	0,04	647,6	149,2	0,07
551,9	80,0	0,04	598,6	67,6	0,03	648,7	108,9	0,05
552,7	68,6	0,03	599,5	61,1	0,03	649,7	78,9	0,04
553,6	82,5	0,04	600,3	69,5	0,03	650,8	79,4	0,04
554,6	77,5	0,04	601,3	74,4	0,04	651,8	76,2	0,04
555,5	75,9	0,04	602,2	69,8	0,03	652,8	75,9	0,04
556,4	68,4	0,03	603,2	65,3	0,03	653,8	76,4	0,04
557,3	63,5	0,03	604,0	58,2	0,03	654,8	70,4	0,04
558,0	57,4	0,03	604,9	63,4	0,03	655,6	51,4	0,03
558,9	65,2	0,03	605,7	56,4	0,03	656,5	67,8	0,03
559,8	66,9	0,03	606,4	58,4	0,03	657,5	76,7	0,04
560,6	69,8	0,03	607,3	74,0	0,04	658,5	67,0	0,03
561,7	104,3	0,05	608,3	74,9	0,04	659,5	65,6	0,03
562,5	12,6	0,01	609,2	74,5	0,04	660,5	69,0	0,03
563,0	96,4	0,05	610,1	71,9	0,04	661,4	68,6	0,03
564,0	89,2	0,04	610,9	72,6	0,04	662,5	103,2	0,05
564,7	56,4	0,03	611,8	58,1	0,03	663,6	78,0	0,04
565,5	77,9	0,04	612,6	67,0	0,03	664,4	55,9	0,03
566,3	65,5	0,03	613,5	72,3	0,04	665,1	47,0	0,02
567,1	65,9	0,03	614,6	91,3	0,05	665,9	66,7	0,03
568,0	64,4	0,03	615,7	75,0	0,04	666,9	81,1	0,04
568,8	68,3	0,03	616,7	62,9	0,03	668,0	69,2	0,03

668,9	60,6	0,03
669,7	56,5	0,03
670,4	49,2	0,02
671,1	52,1	0,03
671,8	50,5	0,03
672,7	63,1	0,03
673,6	61,9	0,03
674,4	49,6	0,02
675,1	44,7	0,02
675,9	69,5	0,03
676,9	67,6	0,03
677,5	3,0	0,00
678,0	76,1	0,04
679,0	50,2	0,02
679,8	59,3	0,03
680,6	59,4	0,03
681,5	62,6	0,03
682,4	70,9	0,04
683,4	67,2	0,03
684,3	65,3	0,03
685,2	52,8	0,03
686,1	76,1	0,04
686,7	1,5	0,00
687,2	64,8	0,03
688,2	73,3	0,04
689,2	62,0	0,03
690,1	56,9	0,03
691,0	59,7	0,03
691,8	47,6	0,02
692,6	65,1	0,03
693,6	64,3	0,03
694,5	61,7	0,03
695,4	59,3	0,03
696,3	66,5	0,03
697,2	55,0	0,03

Gordonia rubropertincta.-

Method file : LOWRY.M ( modified )      Last update: Date 4/7/2006    Time 12:49:21 PM  
Information : Default Method  
Data File : <untitled>

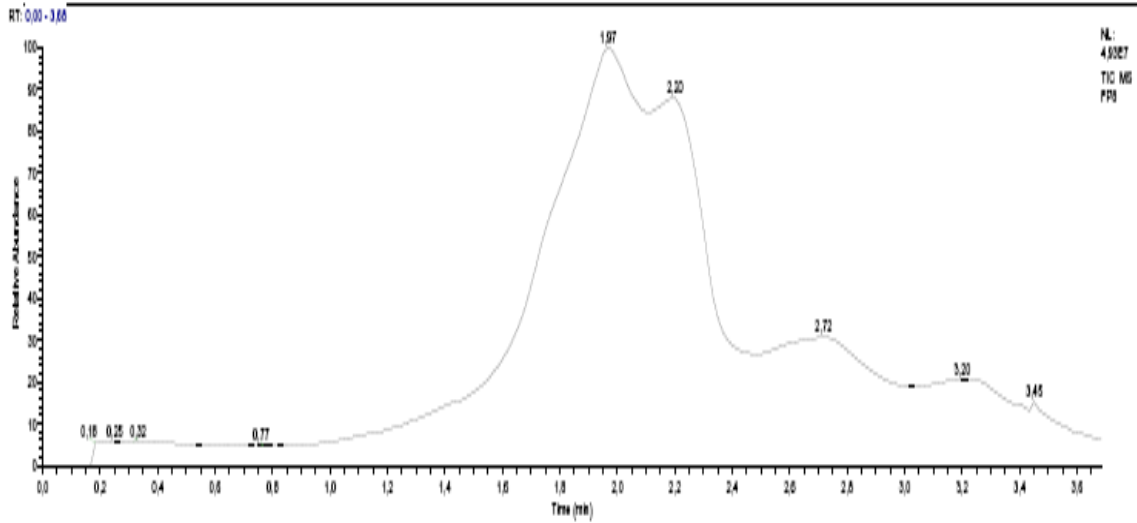


#	Name
1	<i>Gd. rubropertincta</i> Abs<750nm>

Report generated by : medicina      Signature: .....

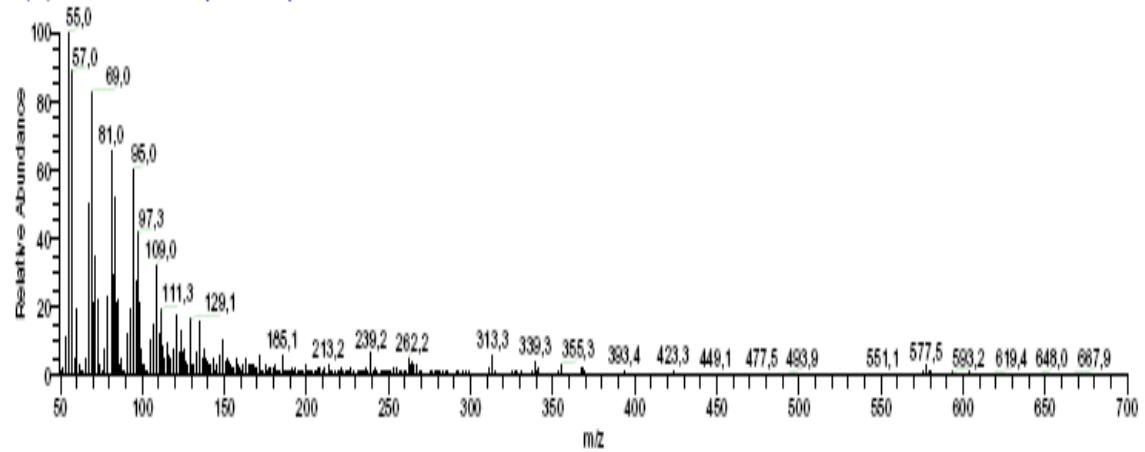
-----  
\*\*\* End Fixed Wavelength Report \*\*\*  
-----





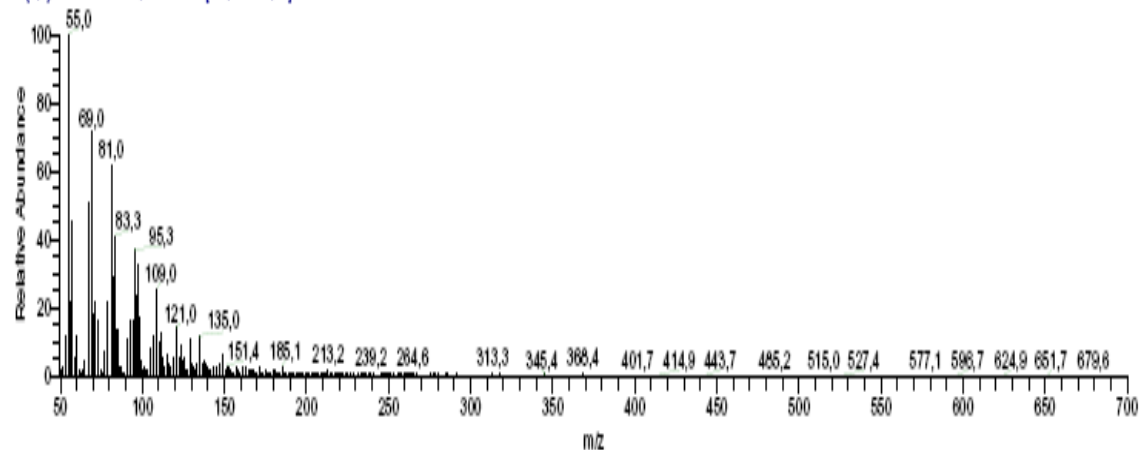
FP8 #113 RT: 1.98 AV: 1 NL: 3.46E6

T: (0;0) + c EI del=450,00 Full ms [50,00-700,00]



FP8 #127 RT: 2.22 AV: 1 NL: 4.07E6

T: (0;0) + c EI del=450,00 Full ms [50,00-700,00]



## **7. Discusión de resultados.**

La mayor parte de las cepas estudiadas en el presente trabajo experimental, no habían sido descritas en la literatura científica en relación a su composición quinónica, aquellos que citan su composición quinónica lo hacen casi en exclusividad basándose en los resultados obtenidos por espectrometría de masas con relación a MK-7 ( M=648), MK-8 (M=716) y MK-9 (M=784).

En nuestro trabajo, hemos preferido utilizar varias técnicas instrumentales que confirmasen las quinonas de rangos inferiores MK-4 (M=450) que es la fitomenaquinona (K1), de la que disponíamos de patrones así como de menaquinona (K2) (M=444) y menadiona (K3) (M=172).

Hemos comprobado a través de HPLC, que el método nº 6 de separación utilizando en régimen isocrático metanol y tetrahidrofurano en la proporción 3: 1, es el más adecuado para apreciar la existencia de quinonas superiores MK-8 y MK-9. Con la aplicación de este método cromatográfico y su aplicación a las diferentes especies de micobacterias que hemos podido procesar, comprobamos que de las cepas analizadas, *Mycobacterium bolletii*, *Mycobacterium conceptionense*, *Mycobacterium frederickbergense*, *Mycobacterium hackesackense*, *Mycobacterium hodleri*, *Mycobacterium phoceae*, *Mycobacterium poriferae*, *Mycobacterium senegalense* y *Mycobacterium vanbaalenii*, poseen quinonas de este tipo.

Comparativamente con los datos disponibles en la bibliografía revisada hasta el momento, coincidimos en el caso de *Mycobacterium hodleri* y *Mycobacterium frederickbergense*, *Mycobacterium smegmatis*, *Gordonia bronchialis* y *Gordonia rubropertincta* en la existencia de MK9 y MK8 en su constitución, hecho este puesto de manifiesto a través del análisis del cromatograma de HPLC de estas especies así como por la aparición de fragmentos a e/m de 648 y 578, correspondientes a esas menaquinonas. En el caso de *Nocardia farcinica*, no existe una total coincidencia con nuestros resultados experimentales y los encontrados en Bibliografía.

Del análisis espectral con relación a la menadiona K-3, con un ión molecular a 172, poseen este compuesto en su composición: *Mycobacterium boenickei*, *Mycobacterium brisbanense*, *Mycobacterium chlorophenicum* *Mycobacterium cosmeticum*, *Mycobacterium duvali*, *Mycobacterium fluoranthenivorans*, *Mycobacterium fortuitum acetamidilycum*, *Mycobacterium gallinarum*, *Mycobacterium hodleri*, *Mycobacterium holsaticum*, *Mycobacterium neworleaense*, *Mycobacterium phoceae*, *Mycobacterium poriferae*, *Mycobacterium pyrenovorans*, *Mycobacterium rhodesiae*, *Mycobacterium senegalense* y *Nocardia farcinica*.

El espectro de masas de la menadiona K3, se expone en la figura que sigue a este texto.

Aunque pueda pensarse que todos los microorganismos que tienen fitomenaquinona (K-1) o menaquinona (K-2) en su estructura, a la fuerza tendrían menadiona (K-3), o que en Espectrometría de Masas (EM), aparecería, por pérdida de los radicales fitilo o farnesilo, sin embargo esta

hipótesis no es cierta, ya que la ruptura nos generaría el ión molecular a m/e 225 y no necesariamente a m/e 172.

Por otro lado del análisis espectral con relación a la menaquinona K2, poseen la misma en su composición: *Mycobacterium brisbanense*, *Mycobacterium cosmeticum*, *Mycobacterium duvali*, *Mycobacterium fortuitum acetamidolitycum*, *Mycobacterium frederickbergense*, *Mycobacterium phoceae*, *Mycobacterium poriferae*, *Mycobacterium pyrenovorans*, *Mycobacterium smegmatis*, *Nocardia farcinica* y *Gordonia rubropertincta*.

Con relación a la cromatografía gaseosa realizada en columna V-5 de 30 metros de longitud, con inyector a 250° C y detector de masas, los resultados obtenidos para la separación y análisis de naftoquinonas en las muestras estudiadas, han arrojado resultados negativos.

Finalmente se realizó la técnica de Resonancia Magnética Nuclear de Protones (RMNH) a la fracción separada por HPLC preparativa de la fitomenaquinona, tras reiteradas inyecciones en el cromatógrafo, que comparada con la obtenida del patrón puro, es muy semejante, poniendo de esta manera de manifiesto la confirmación de nuestras sospechas de presencia de dicho tipo de compuestos en la composición de algunas de las Micobacterias estudiadas.

Con relación a la cromatografía gaseosa llevada a cabo con columna V-5 de 30 metros de longitud y provista de inyector a 250°C con detector de masas, los resultados obtenidos con relación a la separación de quinonas, han sido negativos.



Espectro de Masas de la menadiona K3

---

Tabulación de los picos más importantes del Espectro de Masas de la menadiona K3.

**Tabla resumen de resultados experimentales obtenidos por**

**Espectroscopia UV-Vis y Espectrometría de Masas.-**

**Quinonas**

**Ultravioleta**

	Disolvente	238(h)	242	248	254	260	263	265(h)	269	275	578	648
M. aichiense	Etanol	+	+	+	+	+		+	+	+	-	
M. augbanense	"	+			+					+	-	-
M. aurum	"		+	+	+		+	+		+		
M. austroafricanum	"	+	+	+	+	+					+	
M. boenickei	"	+		+	+	+		+			+	
M. bolletii	"			+	+				+	+	+	-
M. brisbanense	"				+	+				+		
G. bronchialis	"	+	+				+	+	+	+		
M. canariense	"	+	+	+	+		+		+	+		+
M. chlorophenolicum	"	+	+			+		+	+	+	+	
M. chubuense	"	+		+		+	+	+				
M. conceptionense	"	+	+	+				+			-	+
M. cosmeticum	"	+	+	+	+	+		+	+		-	+
M. duvali	"	+	+	+	+	+		+				
M. elephantis	"	+	+		+		+			+		
M. flavescens	"	+	+		+		+	+	+		+	+
M. fluoranthenivorans	"	+	+		+	+	+	+			+	-
M. fortuitum acetamidolitycum	"	+		+	+		+	+	+	+	+	-
M. frederickbergense	"		+	+	+	+	+		+	+		
M. gallinarum	"	+	+	+	+		+	+	+	+	+	
M. gilvum	"		+		+		+	+				+
M. hackesackense	"	+		+	+	+		+	+		-	-
M. hodleri	"	+			+	+						
M. holsaticum	"		+	+		+	+			+	+	
M. houstonense	"	+	+	+	+	+		+		+	-	-
M. neworleansense	"		+		+		+		+			
M. phlei	"	+	+	+	+		+	+	+	+		
M. phoceae	"	+	+	+		+	+			+		
M. poriferae	"	+	+		+	+		+		+	+	-



M. pyrenivorans	"	+				+	+	+	+	+		
M. rhodesiae	"	+	+		+	+	+		+	+		
M. senegalense	"	+	+			+	+	+	+		-	-
M. smegmatis	"	+	+	+	+	+	+	+				
M. thamnopheos	"	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
M. thermorresistible	"	+	+	+	+	+	+			+	-	-
M. togolense	"	+	+		+	+				+	+	+
M. vanbaalenii	"	+			+	+	+		+	+	-	-
M. wolinskyi											+	-
M. psychrotolerans												
N. farcinica	"	+	+	+	+	+		+			-	-
G. rubropertincta												
Filoquinona K1	Isooctano	+		+		+			+			
Menaquinona K2	Isooctano	+	+	+		+			+			
Demetilmenaquinona	Isooctano	+	+	+	+		+					
Clorobiunquinona	Etanol				+			+				
Ubiquinona	Etanol									+		

## Quinonas

## E. de Masas

	69	81	93	172	187	189	225	235	376	444	450
M. aichiense	53,71	22,0	3,75	0,39	0,41	1,0	4,37	1,15	0	0	0
M. augbanense	84,13	55,56	13,07	1,73	4,54	2,72	44,66	1,92	0,33	0,15	0,51
M. aurum	11,36	9,76	4,48	0,86	0,38	4,16	6,35	1,24	0	0	0
M. austroafricanum	100	96,58	43,24	10,02	10,86	7,11	89,08	8,26	0	0	6,75
M. boenickei	75,98	75,62	39,55	9,83	0	0	0	3,34	0	0	4,82
M. bolletii	91,63	62,03	12,84	1,46	2,45	2,23	40,11	1,86	0,84	0,48	3,45
M. brisbanense	80,6	68,76	24,85	10,98	0	3,30	0	4,37	0	0	5,43
G. bronchialis	62,27	29,98	7,00	1,48	1,29	1,98	1,11	0,1	0	0	0
M. canariesense	56,89	31,33	6,78	0	0	1,17	3,73	1,91	0	0	0
M. chlorophenicum	64,39	100	19,58	4,48	0	0	4,12	3,26	0	0	4,58
M. chubuense	81,54	51,70	12,52	1,68	0	2,86	1,89	1,41	0	0	0
M. conceptionense	41,61	56,21	11,59	0,55	1,27	2,77	8,65	2,97	0,69	0,82	0,45
M. cosmeticum	91,75	51,0	13,03	2,49	0,98	1,98	25,14	2,71	0,14	0,53	0,28
M. duvali	50,02	36,40	17,00	2,69	2,39	3,63	17,42	2,62	0,39	0	2,13
M. elephantis	92,19	62,58	15,12	1,04	0,88	2,17	2,11	2,71	0,36	0,18	0
M. flavescens	74,27	46,95	11,30	0,78	0	1,96	3,28	3,27	0	0	0
M. fluoranthenivorans	36,43	31,78	13,62	2,45	0,53	1,01	0,80	1,07	0,23	0,23	1,55
M. fortuitum acetamidolitycum	100	65,70	19,61	2,83	3,3	2,94	20,21	3,29	0,69	0,34	9,39
M. frederickbergense	5,70	4,81	1,84	0,30	0,33	1,72	0,20	0,27	0	0	0
M. gallinarum	79,56	78,02	32,89	8,46	2,28	3,24	5,14	7,16	0	0	5,33
M. gilvum	87,06	72,01	19,15	0	0	4,33	4	5,68	0	0	0
M. hackesackense	82,26	59,64	12,74	0,29	0,83	3,44	3,26	2,94	0,77	0,12	0
M. hodleri	70,02	52,66	15,88	3,51	0,79	1,21	0	0,88	0	0	0
M. holsaticum	77,95	79,73	36,65	2,39	2,72	3,39	0	4,26	0	0	4,15
M. houstonense	72,76	31,99	7,84	0,71	0,48	0,62	2,16	0,79	0,19	0,15	2,41
M. neworleansense	67,92	53,27	33,34	13,79	10,73	6,23	4,07	3,31	0	0	0
M. phlei	68,44	71,87	31,34	1,66	7,23	3,86	100	3,67	0,59	0,23	1,25
M. phoceae	83,98	92,11	32,21	3,35	6,33	4,65	99,25	6,70	0,91	0,36	4,34
M. poriferae	94,05	78,21	22,78	3,29	3,29	3,25	11,16	3,73	0,52	0,27	2,76
M. pyrenivorans	30,82	31,10	14,01	2,60	0	0	9,67	4,73	0	0	1,96
M. rhodesiae	75,1	71,87	28,34	7,21	2,92	3,94	0	3,15	0	0	5,07
M. senegalense	86,26	57,58	15,40	2,56	3,87	3,87	4,62	2,14	1,31	0,56	0,42

<b>M. smegmatis</b>	65,84	30,77	7,97	1,79	1,66	3,32	1,40	1,11	0	0	0
<b>M. thamnopheos</b>	45,4	18,82	4,94	0,96	0,95	1,12	1,75	1,14	0,24	0,12	0,59
<b>M. thermoresistible</b>	45,12	12,69	2,68	0,70	0,53	0,45	2,41	0,39	0,18	0	0,38
<b>M. togolense</b>	71,14	47,21	10,04	1,13	1,29	1,20	15,02	1,50	0,39	0,15	1,70
<b>M. vanbaalenii</b>	61,3	47,08	9,81	1,86	1,66	1,57	7,22	37,22	1,28	0,19	0,49
<b>M. wolinskyi</b>	56,69	59,26	20,02	1,74	4,48	2,21	100	3,25	0,51	0,29	1,68
<b>M. psychrotolerans</b>	100	71,76	16,68	0,71	3,98	5,05	42,94	4,14	0,52	0,68	0
<b>N. farcinica</b>	86,26	57,58	15,40	2,56	3,15	3,87	4,62	2,14	1,31	0,56	0,42
<b>G. rubropertincta</b>	82,52	65,23	19,13	1,07	1,21	1,21	0	1,07	0	0	0
<b>Menaquinona K 2</b>	100	55,17	42,42	10,53	72,14	15,17	99,76	2,55	7,60	49,93	0
<b>Fitomenadiona K 1</b>	50,24	16,98	8,84	3,56	98,30	1,78	100	4,34	0	0	91,07

## 8.- Espectrometría de Masas.-

	Patrones Especies	Absorción			450 + 225	444 + 225
		225	444	450	Fitomenaquinona	Menaquinona
1	Fitomenadiona K 1	100	0	91,07	+	0
2	<i>G. bronchialis</i> CIP 100847T	1,11	0	0	0	0
3	<i>G. rubropertincta</i> CIP 100848T	0	0	0	0	0
4	<i>M. aichiense</i> ATCC 27280	4,37	0	0	0	0
5	<i>M. aubagnense</i> CCUG 50186T	44,66	0,15	0,51	+	+
6	<i>M. aurum</i> ATCC 23366	6,35	0	0	0	0
7	<i>M. austroafricanum</i> ATCC 33464	89,08	0	6,75	+	0
8	<i>M. boenickei</i> DSM 44677T	0	0	4,82	0	0
9	<i>M. bolletii</i> CCUG 50184T	40,11	0,48	3,45	+	+
10	<i>M. brisbanense</i> DSM 44680T	0	0	5,43	0	0
11	<i>M. canariense</i> CIP107998T	3,73	0	0	0	0
12	<i>M. chlorophenicum</i> CECT 4065	4,12	0	4,58	+	0
13	<i>M. chubuense</i> ATCC 27278	1,89	0	0	0	0
14	<i>M. conceptionense</i> CCUG 50187T	8,65	0,82	0,45	+	+
15	<i>M. cosmeticum</i> CIP 108170	25,14	0,53	0,28	+	+
16	<i>M. duvali</i> ATCC 43910	17,42	0	2,13	+	0
17	<i>M. elephantis</i> DSM 44368T	2,11	0,18	0	0	+
18	<i>M. flavescens</i> ATCC 14474	3,28	0	0	0	0
19	<i>M. fluoranthenorans</i> CIP 108203	0,8	0,23	1,55	+	+
20	<i>M. fort. acetamidolyticum</i> DSM4420T	20,21	0,34	9,39	+	+
21	<i>M. frederickbergense</i> DSM 44346	0,2	0	0	0	0
22	<i>M. gallinarum</i> ATCC 19710T	5,14	0	5,33	+	0
23	<i>M. gilvum</i> ATCC 43909	4	0	0	0	0
24	<i>M. hackensackense</i> DSM 44833T	3,26	0,12	0	0	+
25	<i>M. hodleri</i> DSM 44183T	0	0	0	0	0
26	<i>M. holsaticum</i> DSM 44478T	0	0	4,15	0	0
27	<i>M. houstonense</i> CIP 105353T	2,16	0,15	2,41	+	+
28	<i>M. neworleansense</i> CIP 105354T	4,07	0	0	0	0
29	<i>M. phlei</i> ATCC 11758	100	0,23	1,25	+	+
30	<i>M. phoceae</i> CCUG 50185T	99,25	0,36	4,34	+	+
31	<i>M. poriferae</i> ATCC 35087	11,16	0,27	2,76	+	+
32	<i>M. psychrotolerans</i> DSM 44697T	42,94	0,68	0	0	+
33	<i>M. pyrenivorans</i> DSM 44605T	9,67	0	1,96	+	0
34	<i>M. rhodesiae</i> DSM 44223T	0	0	5,07	0	0
35	<i>M. senegalense</i> CCM 319/87T	4,62	0,56	0,42	+	+
36	<i>M. smegmatis</i> NCTC 8159T	1,4	0	0	0	0

37	<i>M. thamnopheos</i> ATCC 4445	1,75	0,12	0,59	+	+
38	<i>M. thermorresistible</i> ATCC 195270	2,41	0	0,38	+	0
39	<i>M. togolense</i> CCUG 48898	15,02	0,15	1,7	+	+
40	<i>M. vanbaalenii</i> DSM 7251T	7,22	0,19	0,49	+	+
41	<i>M. wolinskyi</i> ATCC 700010T	15,02	0,15	1,7	+	+
42	Menaquinona K 2	99,76	49,93	0	0	+
43	<i>Nocardia farcinica</i> CECT 3053	4,62	0,56	0,42	+	+

Distribución		T. strains	%
FM +	MK +	16	37,2
FM +	MK -	7	16,2
FM -	MK +	4	9,3
FM -	MK -	16	37,2
		43	100

**DISTRIBUCIÓN DE K1,K2 Y K3 EN  
LAS ESPECIES ESTUDIADAS**

	MND/k3	FM/K1	MK/K2
<i>G. bronchialis</i>	-	-	-
<i>G. rubropertincta</i>	-	-	-
<i>M. aichiense</i>	-	-	-
<i>M. augbanense</i>	-	+	+
<i>M. aurum</i>	-	-	-
<i>M. austroafricanum</i>	+	+	-
<i>M. boenickei</i>	+	-	-
<i>M. bolletii</i>	-	+	+
<i>M. brisbanense</i>	+	-	-
<i>M. canariasense</i>	-	-	-
<i>M. chlorophenolicum</i>	+	+	-
<i>M. chubuense</i>	-	-	-
<i>M. conceptionense</i>	-	+	+
<i>M. cosmeticum</i>	+	+	+
<i>M. duvali</i>	+	+	-
<i>M. elephantis</i>	-	-	+
<i>M. flavescens</i>	-	-	-
<i>M. fluoranthenvivorans</i>	+	+	+
<i>M. fort. acetamidolyticum</i>	+	+	+
<i>M. frederickbergense</i>	-	-	-
<i>M. gallinarum</i>	+	+	-
<i>M. gilvum</i>	-	-	-
<i>M. hackesackense</i>	-	-	+
<i>M. hodleri</i>	+	-	-
<i>M. holsaticum</i>	+	-	-
<i>M. houstonense</i>	-	+	+
<i>M. neworleansense</i>	+	-	-
<i>M. phlei</i>	-	+	+
<i>M. phoceae</i>	+	+	+
<i>M. poriferae</i>	+	+	+
<i>M. psychrotolerans</i>	-	-	+
<i>M. pyrenivorans</i>	+	+	-
<i>M. rhodesiae</i>	+	-	-
<i>M. senegalense</i>	+	+	+
<i>M. smegmatis</i>	-	-	-
<i>M. thamnopheos</i>	-	+	+

<i>M. thermorresistible</i>	-	+	-
<i>M. togolense</i>	-	+	+
<i>M. vanbaalenii</i>	-	+	+
<i>M. wolinskyi</i>	-	+	+
<i>Nocardia farcinica</i>	+	+	+
<i>Patrón K1</i>	-	+	-
<i>Patrón K2</i>	-	-	+
<i>Patrón K3</i>	+	-	-

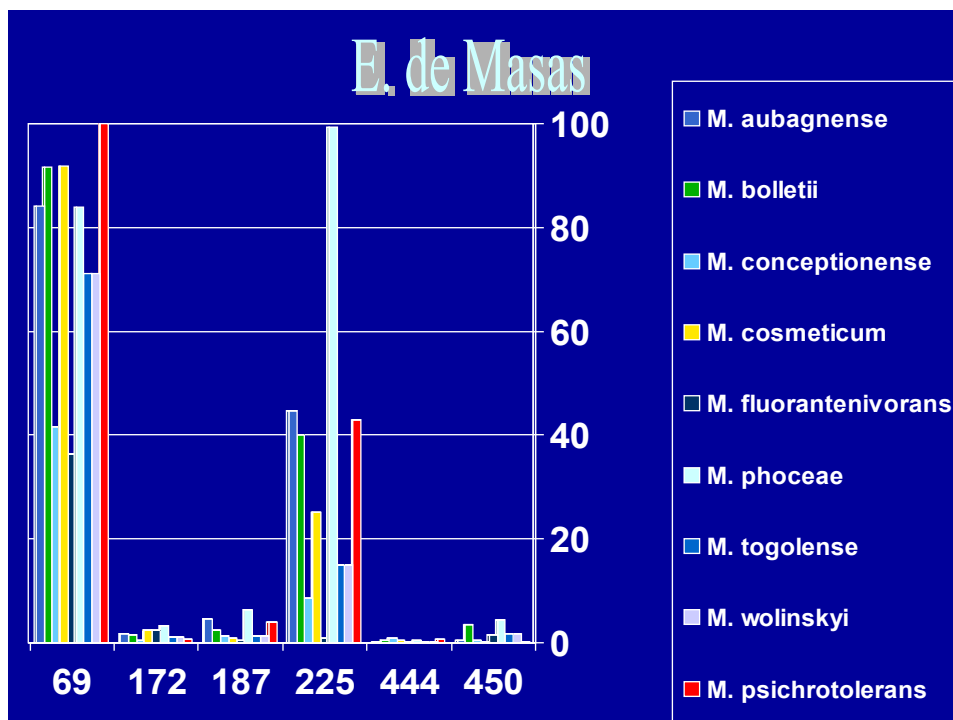
**AGRUPAMIENTO DE LAS ESPECIES POR LA PRESENCIA DE K1, K2 y K3**

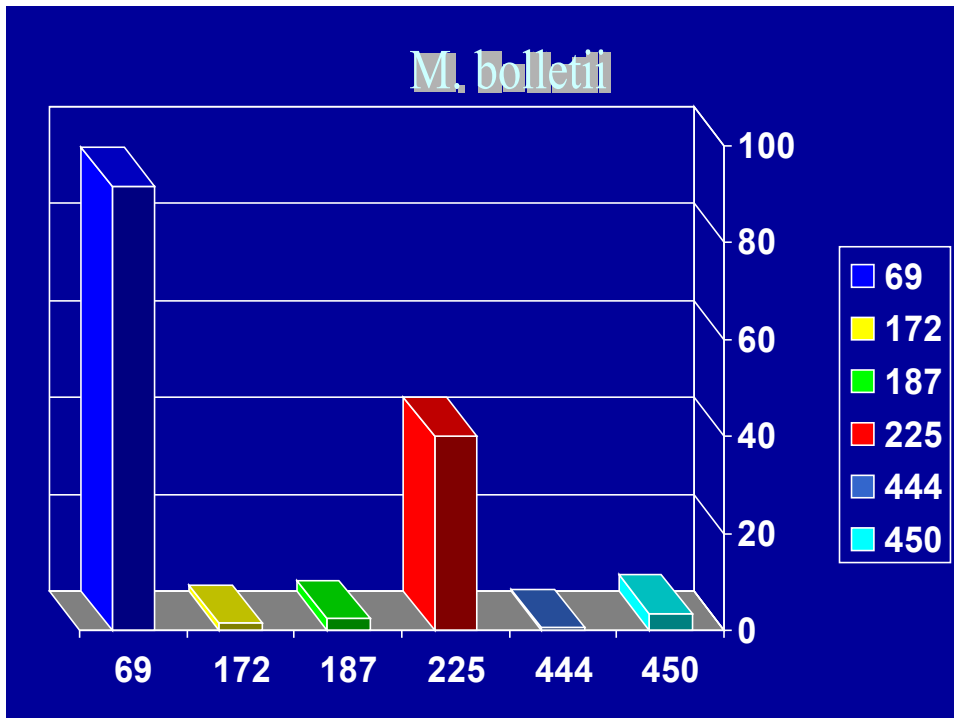
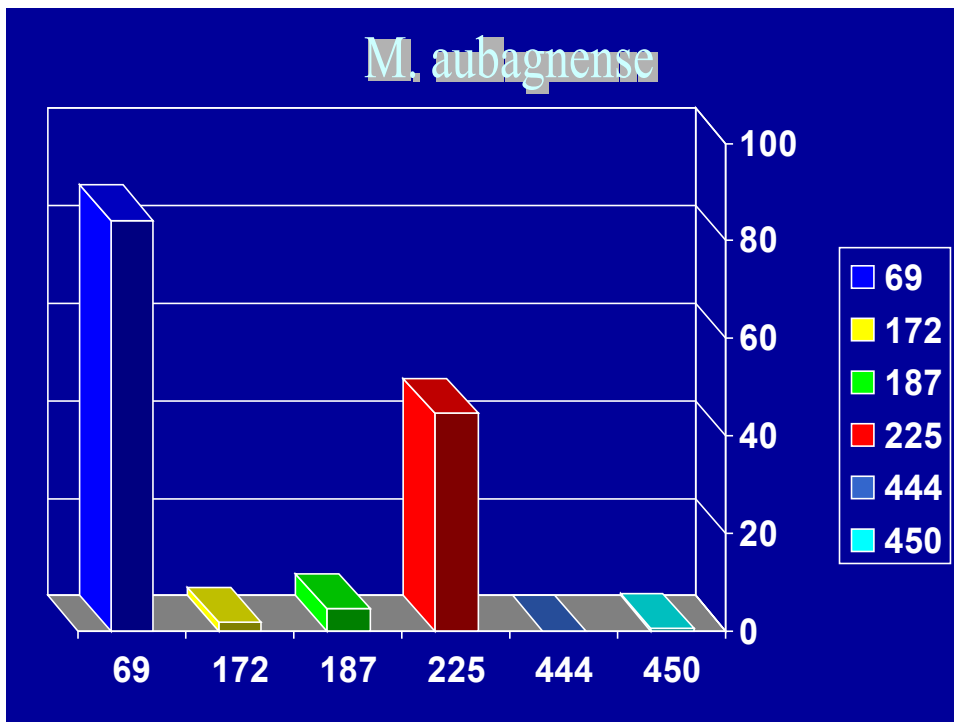
	MND/k3	FM/K1	MK/K2	
<i>G. bronchialis</i>	-	-	-	Grupo I
<i>G. rubropertincta</i>	-	-	-	
<i>M. aichiense</i>	-	-	-	
<i>M. aurum</i>	-	-	-	
<i>M. canariense</i>	-	-	-	
<i>M. chubuense</i>	-	-	-	
<i>M. flavescens</i>	-	-	-	
<i>M. frederickbergense</i>	-	-	-	
<i>M. gilvum</i>	-	-	-	
<i>M. smegmatis</i>	-	-	-	
<i>M. augbanense</i>	-	+	+	Grupo II
<i>M. bolletii</i>	-	+	+	
<i>M. conceptionense</i>	-	+	+	
<i>M. houstonense</i>	-	+	+	
<i>M. phlei</i>	-	+	+	
<i>M. thamnopheos</i>	-	+	+	
<i>M. togolense</i>	-	+	+	
<i>M. vanbaalenii</i>	-	+	+	
<i>M. wolinskyi</i>	-	+	+	
<i>M. austroafricanum</i>	+	+	-	Grupo III
<i>M. chlorophenolicum</i>	+	+	-	
<i>M. duvali</i>	+	+	-	
<i>M. gallinarum</i>	+	+	-	
<i>M. pyrenivorans</i>	+	+	-	
<i>M. boenickei</i>	+	-	-	Grupo IV
<i>M. brisbanense</i>	+	-	-	
<i>M. hodleri</i>	+	-	-	
<i>M. holsaticum</i>	+	-	-	
<i>M. neworleansense</i>	+	-	-	
<i>M. rhodesiae</i>	+	-	-	
<i>M. cosmeticum</i>	+	+	+	Grupo V
<i>M. fluoranthenvivorans</i>	+	+	+	
<i>M. fort. acetamidolyticum</i>	+	+	+	
<i>M. phoceae</i>	+	+	+	
<i>M. poriferae</i>	+	+	+	
<i>M. senegalense</i>	+	+	+	
<i>Nocardia farcinica</i>	+	+	+	
<i>M. thermorresistible</i>	-	+	-	

*M. elephantis*  
*M. hackesackense*  
*M. psychrotolerans*

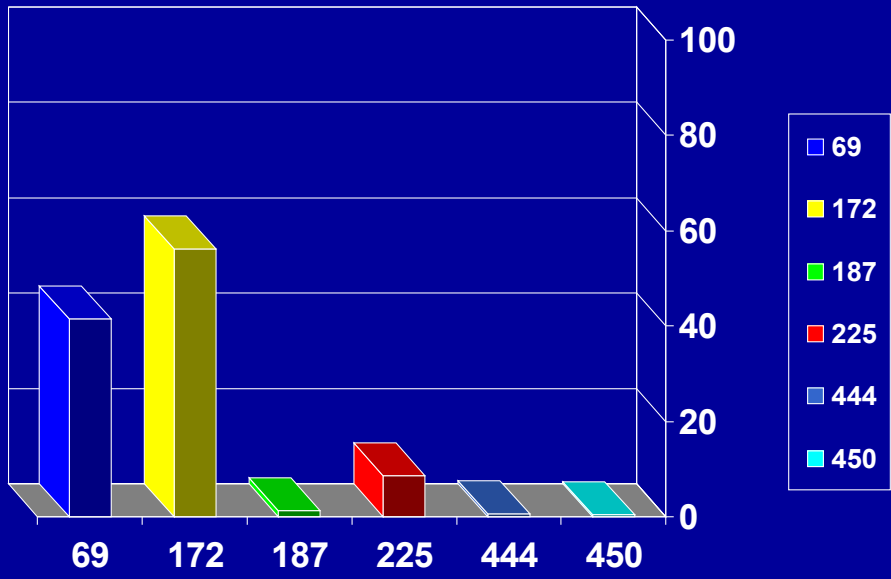
-	-	+	Grupo VII
-	-	+	
-	-	+	

9. Diagramas de Espectros de Masas.-

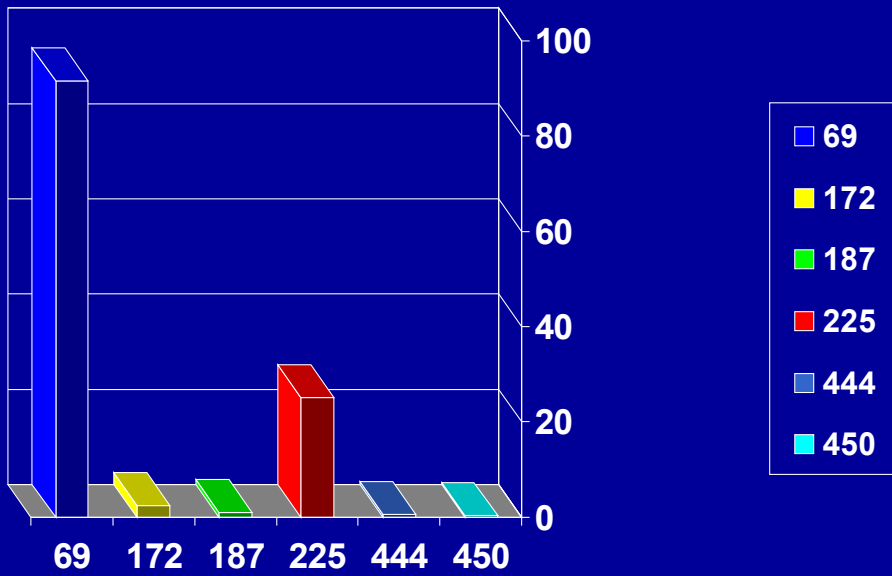




### M. conceptionense

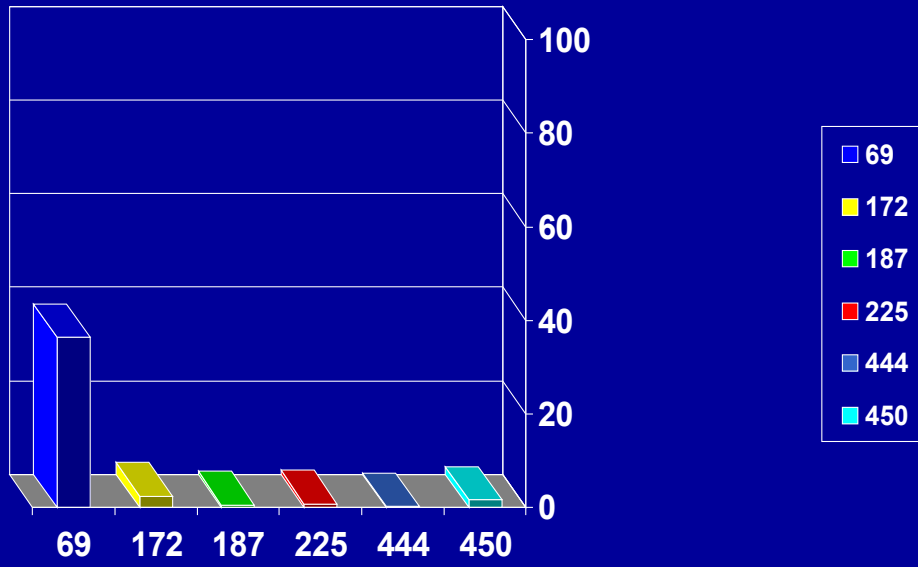


### M. cosmeticum

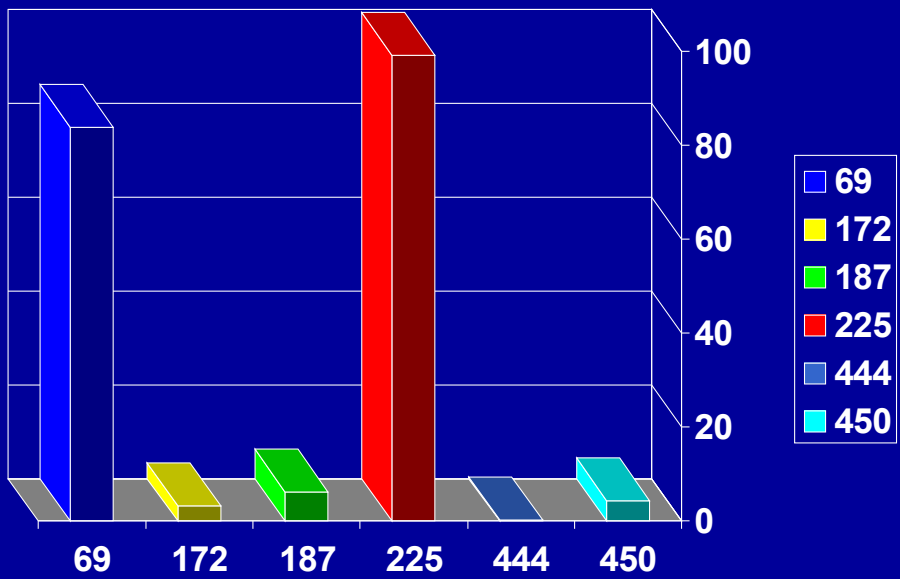




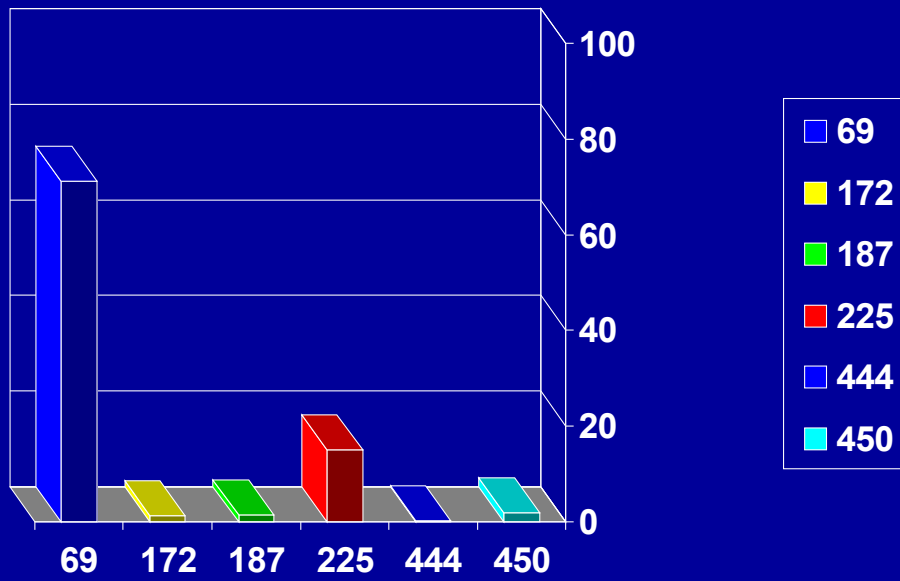
### M. fluoranthene/ivorans



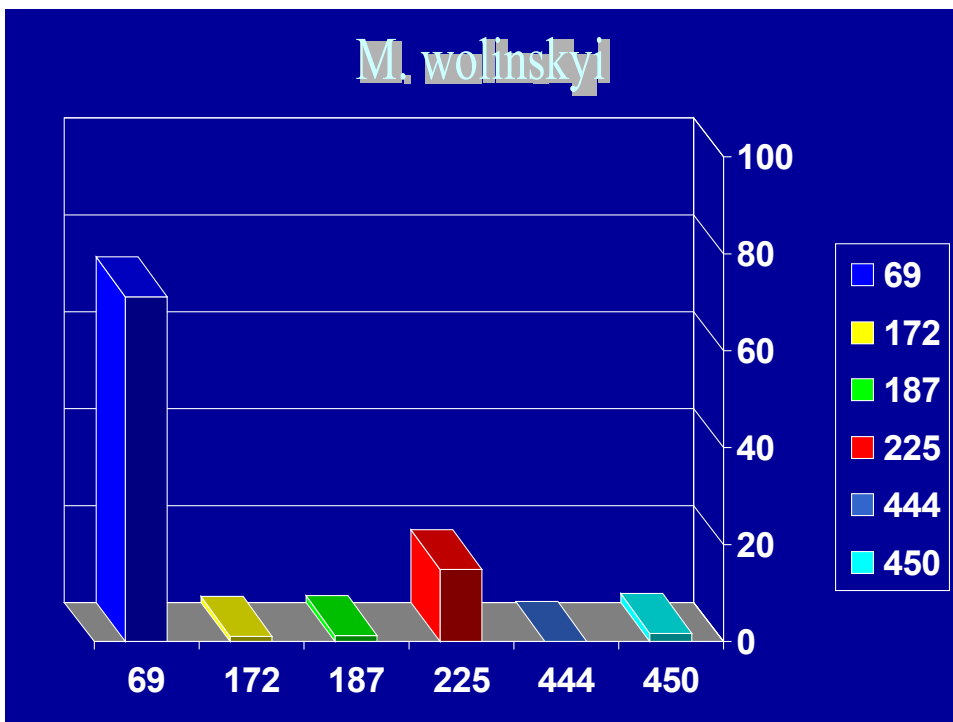
### M. phoceae

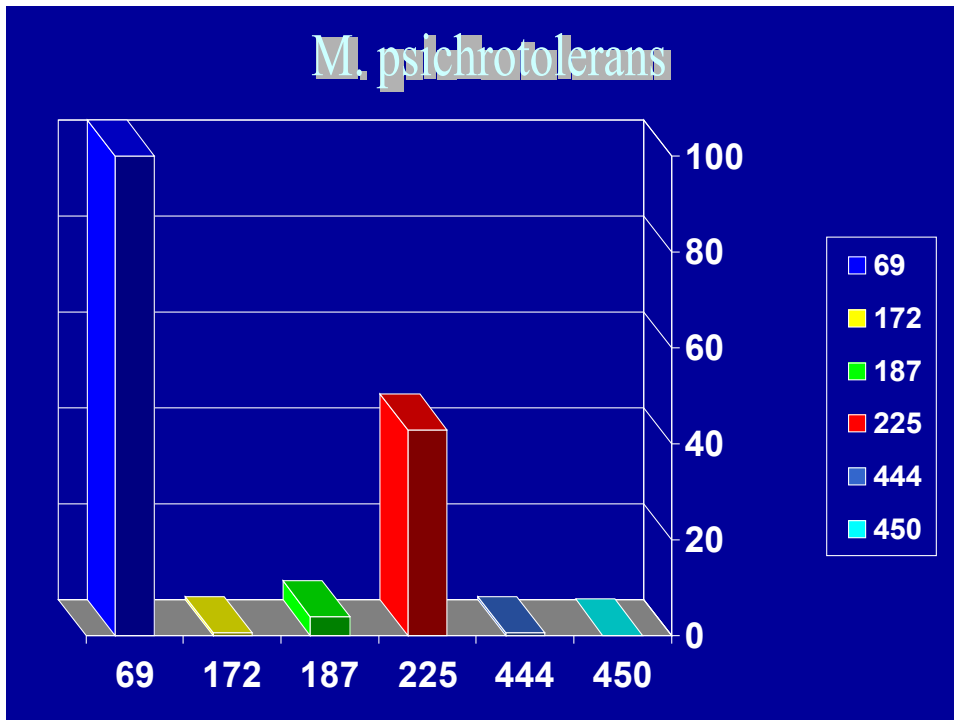


### M. massiliense (M. togolense)

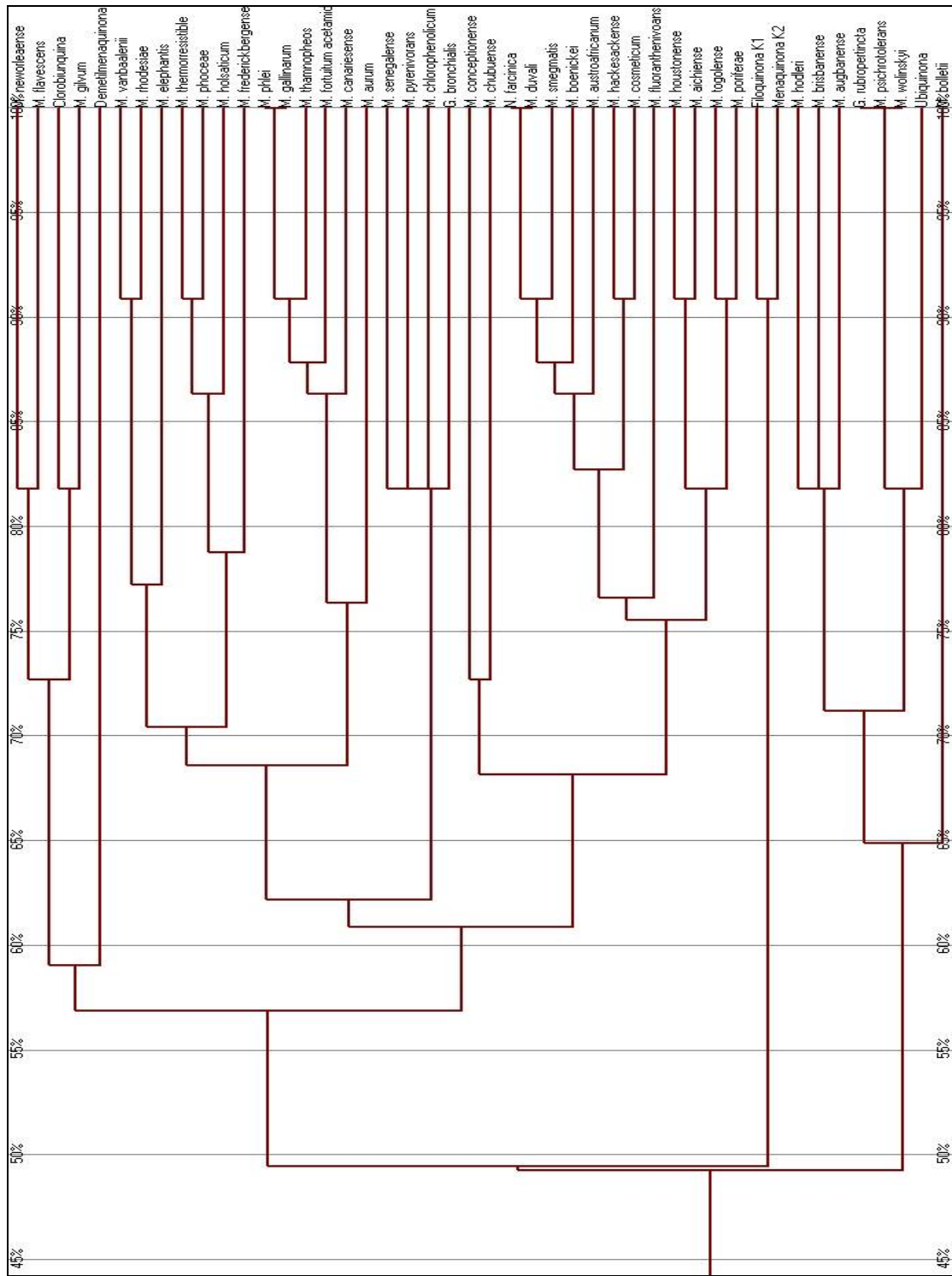


### M. wolinskyi





#### 10. Taxonomía Numérica.-





En lo referente a la taxonomía numérica, realizados los dendrogramas en base a la positividad o negatividad de la absorción en UV-Vis a determinadas longitudes de onda de las diferentes especies bacterianas estudiadas, se aprecia un mismo patrón de absorción en el caso de *Mycobacterium phlei* y *Mycobacterium gallinarum* por un lado, por otro entre *Nocardia farcinica* y *Mycobacterium duvali* y finalmente entre *Gordonia rubropertincta*, *Mycobacterium psicrotolerans* y *Mycobacterium wolinskyi*.

## **11. Conclusiones.**

1.- El procedimiento de extracción utilizado para aislar las quinonas, se ha demostrado que es eficaz en todos los casos con las 38 cepas analizadas así como con *Nocardia farcinica* *Gordonia bronchialis* y *Gordonia rubropertincta*, utilizadas como elementos comparativos de otros géneros. La reproducibilidad del mismo, puesta de manifiesto a través de reiteradas extracciones y posterior sometimiento a técnicas cromatográficas, con resultados similares. así lo confirman.

2.- Para el análisis de los componentes menaquinónicos de las 41 especies estudiadas, se han puesto a punto técnicas de cromatografía en capa fina, cromatografía líquida de alta presión (HPLC), Ultravioleta-Visible (UV-V), Espectrometría de Masas (EM) y Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de protones y de carbono 13, que han resultado complementarias para nuestra investigación.

3.- En HPLC se han probado hasta seis métodos de separación, en régimen tanto isocrático como en gradiente, para el adecuado estudio de las quinonas estructurales.

4.- El análisis de la distribución de las naftoquinonas K1, K2 y K3 distribuye, según su contenido, las 41 especies tipo estudiadas en siete grupos; 10 de ellas carecen de K1, K2 y K3; 9 poseen K1 y K2; 5 tienen en su composición K1 y K3; sólo 6 K3; 7 de ellas K1, K2 y K3; tres K2 y únicamente una es K1 positivo.

5.- El criterio que nos induce a afirmar que estas naftoquinonas están presentes en las especies reseñadas, se basa en la coincidencia de los tiempos de retención con el de los patrones, a diferentes condiciones de

elución en sistemas isocráticos o de gradiente, los máximos de absorción detectados en espectroscopía UV-V, la existencia de señales a m/e de 450, 444, 225 y 172 en Espectrometría de Masas, así como en Resonancia Magnética Nuclear la presencia de protones a diferentes y específicas ppm. para la K1.

6.- El estudio clásico de quinonas en micobacterias, se ha centrado en la presencia de quinonas superiores MK-7, MK-8 y MK-9 fundamentalmente y sus derivados hidrogenados, basándose exclusivamente en la Espectrometría de Masas y en algunos casos Espectroscopía UV-V. En el presente trabajo experimental, nos hemos centrado en quinonas de rango inferior a MK-4, la fitomenaquinona (K1), Menaquinona (K2) y menadiona (K3), al disponer de patrones de las mismas y poder así comparar los tiempos de retención en HPLC y TLC de las diferentes micobacterias con los de los patrones, aparte de evidenciar por Espectrometría de Masas los iones moleculares.

7.- El espectro UV-V procesado mediante taxonomía numérica, permite diferenciar todas las especies probadas con la excepción de *Mycobacterium phlei* y *Mycobacterium gallinarum* por un lado, *Nocardia farcinica* y *Mycobacterium duvali*, así como *Gordonia rubropertincta*, *Mycobacterium psichrotolerans* y *Mycobacterium wolinskyi* por otro, que están en el mismo fenon y que pueden diferenciarse gracias a la Espectrometría de Masas.

8.- Con relación a la existencia de MK9 y MK8 en las cepas analizadas, comparando nuestros resultados con los descritos en la bibliografía, existe coincidencia en atribuir estos compuestos a *Mycobacterium frederickbergense*, *Mycobacterium hodleri*, *Mycobacterium smegmatis*, *Gordonia bronchialis* y



*Gordonia rubropertincta*. No se cumplen estos criterios en el caso de *Nocardia farcinica*.

Apuntan la posibilidad de la existencia en su composición de MK9 y de MK8, en razón a los picos a e/m de tales quinonas, *Mycobacterium austroafricanum*, *Mycobacterium boenickei*, *Mycobacterium bolletii*, *Mycobacterium canariasense*, *Mycobacterium chlorophenolicum*, *Mycobacterium conceptionense*, *Mycobacterium cosmeticum*, *Mycobacterium flavescens*, *Mycobacterium fluoranthenvivorans*, *Mycobacterium fortuitum acetamidolitycum*, *Mycobacterium gallinarum*, *Mycobacterium gilvum*, *Mycobacterium holsaticum*, *Mycobacterium poriferae*, *Mycobacterium togolense* y *Mycobacterium wolinsky*. No poseen estas menaquinonas, o no las detectamos por los métodos analíticos utilizados en el caso de *Mycobacterium aichiense*, *Mycobacterium aubagnense*, *Mycobacterium aurum*, *Mycobacterium hackensackense*, *Mycobacterium houstonense*, *Mycobacterium senegalense*, *Mycobacterium thamnopheos*, *Mycobacterium thermorresistibile* y *Mycobacterium vanbaalenii*.

## 12.- BIBLIOGRAFÍA.

- 1.- Collins, M.D., M. Goodfellow, y D.E. Minnikin. (1979). Isoprenoid quinones in the classification of coryneform and related bacteria. J. Gen. Microbiol. 110:127-136.
- 2.- Collins, M.D., I.D. Jones. (1979). The distribution of isoprenoid quinones in streptococci of serological groups. D. and N. J.Gen. Microbiol.114:27-33.
- 3.- Collins, M.D., T. Piroux, M. Goodfellow, y D.E. Minnikin. (1977). Distribution of menaquinones in actinomycetes and corynebacteria. J.Gen. Microbiol. 100:221-230.
- 4.- Minnikin, D.E., M. Goodfellow, y M.D. Collins. (1978). Lipid composition in the classification and identification of coryneform and related taxa, p.85-160. In I.J. Bousfield and A.G. Calley (ed.), Coryneform bacteria. Academic Press, Inc., London.
- 5.- Minnikin, D.E., M.D. Collins, and M. Goodfellow. (1979). Fatty acid and polar lipid composition in the classification of *Cellulomonas*, *Oerskovia* and related taxa. J. Appl. Bacteriol. 47:87-95.
- 6.- Pennock, J.F. (1966). Occurrence of vitamin K and related quinones. Vitamin. Horm. (N.Y.) 24: 307-329.
- 7.- MacCorquodale, D.W., L.C. Cheney, S.B. Binkley, W.F. Holcomb, R.W. McKee, S.A. Thayer and E.A. Doisy. (1939). The constitution and synthesis of vitamin K<sub>1</sub>. J. Biol. Chem. 131:357-370.
- 8.- McKee, R.W., S.V. Binkley, D.W. MacCorquodale, S.A. Thayer, and E.A. Doisy. (1939). Constitution and synthesis of vitamin K<sub>1</sub>. J. Am. Chem. Soc. 61:129.
- 9.- Tishler, M., and W.L. Sampson. (1948). Isolation of vitamin K<sub>2</sub> from cultures of a sporeforming soil bacillus. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 68:136-137.
- 10.- Francis, J.J., J. Madinaveitia, H.M. MacTurc, and G.A. Snow. (1949). Isolation from acid-fast bacteria of a growth factor from *Mycobacterium johnii* and a precursor of phthiocol. Nature (London) 163:365-366.
- 11.- Noll, H., A. Ruegg, G. Gloor, G. Ryser, and O. Isler. (1960). Die Struktur einer Vitamin-K<sub>2</sub>-verbindung aus Tuberkelbazillen und die Synthese hoerer isoprenologe der Vitamin-K<sub>2</sub>-reihe. Helv. Chim. Acta 43:433-438.
- 12.- Gale, P.H., B.H. Arison, N.R. Trenner, A.C. Page, and K. Folkers. (1963). Characterization of vitamin K<sub>9</sub> (H) from *Mycobacterium phlei*. Biochemistry 2:200-203.

- 13.- Frydman, B., and H. Rapaport. (1963). Nonchlorophyllous pigments of *Chlorella thiosulfatophilum* in chlorobium-quinone. J. Am. Chem. Soc. 85:823-825.
- 14.- Moore, H.W., and K. Folkers. (1966). Structure of rhodoquinone. J. Am. Chem. Soc. 88:567-570.
- 15.- Kofler, M., A. Langemann, R. Ruegg, L.H. Chopard-dit-Jean, A. Rayroud, and O. Isler. (1959). Die Struktur eines pflanzlichen Chinons mit isoprenoider Seitenkette. Helv. Chim. Acta 42 :1283-1292.
- 16.- Kofler, M., A. Langemann, R. Ruegg, U. Gloor, U. Schweiter, J. Wursch, O. Wiss, and O. Isler. (1959). Struktur und Partialsynthese des pflanzlichen Chinons mit isoprenoider Seitenkette. Helv. Chim. Acta 42:2252-2254.
- 17.- Glover, J., and D. R. Threlfall. (1962). A new quinone (rhodoquinone) related to ubiquinone in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. Biochem. J. 85:14P-15P
- 18.- De Rosa, M., A. Gambacorta, G. Millonig, and J.D. Bu'lock. (1974). Convergent characters of extremely thermophilic acidophilic bacteria. Experientia 30:866-868.
- 19.- Links, J. (1960) The conversion of ubiquinone to ubichromenol. Biochim. Biophys. Acta 38:193-194.
- 20.- Booth, V.H. (1959). The extraction of pigments from plant material. Analyst (London) 84:464-465
- 21.- Sommer, P., and M. Kofler. (1966). Physicochemical properties and methods of analysis of phylloquinones, menaquinones, ubiquinones, plastoquinones, menadione and related compounds. Vitam. Horm. (N.Y.) 24:349-399.
- 22.- Dunphy, P.J., and A.F. Brodie. (1971). The structure and function of quinones in respiratory metabolism. Methods Enzymol. 18:407-461.
- 23.- Powls, R., E.R. Redfearn, and S. Trippett. (1968). The structure of chlorobiumquinone. Biochem. Biophys. 113: 548-553.
- 24.- De Rosa, M., S. De Rosa, A. Gambacorta, L. Minale , R.H. Thomson, and R.D. Worthington. (1977). Caldariellaquinone, a unique benzo-b-thiopen-4,7-quinone from *Caldariella acidophila*, an extremely thermophilic and acidophila bacterium. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1: 653-657.
- 25.- Collins M.D. Y Langworthy T.A. 1983. Respiratory quinone composition of some acido acidophilic bacteria. Systematic and Applied Microbiology 4, 95-104.

- 26.- Yamada, Y., K. Aida, and T. Uemura. (1968). Distribution of ubiquinone-10 and -9 in acetic acid bacteria and its relation to the classification of genera *Gluconobacter* and *Acetobacter*, especially the so-called intermediate strains. *Agric. Biol. Chem.* 32:786-788.
- 27.- Sommer N., Kofler A. (1974). Isolation of a novel menaquinone with a partially hydrogenated side chain from *Propionibacterium arabinosum*. *J. Biochem. (Tokyo)* 76:133-136
- 28.- Batrakov, S.G., and L.D. Bergelson. (1978). Lipids of the streptomycetes. Structural investigation and biological interrelation. *Chem. Phys. Lipids* 21:1-29
- 29.- Kroppenstedt, R.M. (1982). Separation of bacterial menaquinones by hplc using reverse-phase (RP18) and a silver loaded ion exchanger as stationary phases. *Journal of Liquid Chromatography* 5: 2539-2569.
- 30.- Saddler, G.S., Goodfellow, M., Minnikin, D.E. & O'Donnell, A.G. (1986). Influence of the growth cycle on the fatty acid and menaquinone composition of *Streptomyces cyaneus* NCIB 9616. *Journal of Applied Bacteriology* 60: 51-56.
- 31.- Tamaoka, J., Ha, D.-M. & Komagata, K. (1987). Reclassification of *Pseudomonas acidovorans* den Dooren de Jong 1926 and *Pseudomonas testosteroni* Marcus and Talalay 1956 as *Comamonas acidovorans* comb. nov. and *Comamonas testosteroni* comb. nov., with an amended description of the genus *Comamonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 37: 52-59.
- 32.- Yassin, A.F., Schaal, K.P., Brzezinka, H., Goodfellow, M. & Pulverer, G. (1991). Menaquinone patterns of *Amycolatopsis* species. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene, Series A274*: 465-470.
- 33.-Whistance G.R., Dillon J.F y Rhrelfall D.R. 1969. The nature, intergeneric distribution and biosynthesis of isoprenoid quinines and phenols in Gram-negative bacteria. *Biochem. J.* 111:461-472.
- 34.- Polglase, W.J., Pun, W.T. & Withaar, J. (1966). Lipoquinones of *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta* 118: 425-426.
- 35.-Hiraishi a. y Kogamata K. 1969. Effects of the growth médium compositium on menaquinone homolog formation in *Micrococcus luteus*. *Journal of General and Applied Microbiology* 35, 311-318.
- 36.- Hiraishi A., Sugiyama J y Komagata K. 1991. Simultaneous formation of menaquinones and demethylmenaquinones by *Micrococcus varians* IAM 12146 depending on cell growth media. *Current Microbiology* 22, 53-58.
- 37.-Grund E. y Kroppenstedt R.M. 1990. Chemotaxonomic and numeric taxonomy of the genus nocardia. *International Journal of Systematic Bacteriology* 40, 5-11.

- 38.- Collins, M.D. & Jones, D. 1981a. Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implications. *Microbiological Reviews* 45: 316-354.
- 39.- Collins, M.D. & Jones, D. 1981b. A note on the separation of natural mixtures of bacterial ubiquinones using reverse-phase partition thin-layer chromatography and high performance liquid chromatography. *Journal of Applied Bacteriology* 51: 129-134.
- 40.- Yamada, Y., Aoki, K. & Tahara, Y. (1982a). The structure of the hexahydrogenated isoprenoid side-chain menaquinone with nine isoprene units isolated from *Actinomadura madurae*. *Journal of General and Applied Microbiology* 28: 321-329
- 41.- Yamada, Y., Hou, C.F., Sasaki, J., Tahara, Y. & Yoshioka, H. (1982b). The structure of the octahydrogenated isoprenoid side-chain menaquinone with nine isoprene units isolated from *Streptomyces albus*. *Journal of General and Applied Microbiology* 28: 519-529.
- 42.- Tamaoka, J., Katayama-Fujimura, Y. & Kuraishi, H. (1983). Analysis of bacterial menaquinone mixtures by high performance liquid chromatography. *Journal of Applied Bacteriology* 54: 31-36.
- 43.- Patrick, J. Dunphy, Phillips G. Phillips, and Arnold F. Brodie. (1971). Separation and identification of menaquinones from microorganisms. *Journal of Lipid Research* 12: 442.
- 44.- Wagner, H., L. Hörhammer, and B. Dengler. 1962. Thin layer chromatography of ubiquinones. *J. Chromatogr.* 7: 211-215.
- 45.- Bolliger, H.R., and König. (1969). *Thin Layer Chromatography*. 2<sup>nd</sup>. ed. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, and New York. 253-302.
- 46.- Beau, S., R. Azerad, and E. Lederer. (1966). Isolation and characterization of dihydromenaquinones from myco and corynebacteria. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 48: 569-581.
- 47.- Morris, L.J. (1964). Specific separations by chromatography. In *New Biochemical Separations*. A.T. James and L.J. Morris, editors. D. Van Nostrand Co. Ltd., London. 295-314.
- 48.- Nyström, E., and J. Sjövall. (1966). Separation of vitamins K<sub>2</sub> on capillary columns of methylated Sephadex. *J. Chromatogr.* 24: 212-214.
- 49.- Campbell, I. M., and R. Bentley. (1968). Inhomogeneity of vitamin K<sub>2</sub> in *Mycobacterium phlei*. *Biochemistry.* 7:3323-3327.
- 50.- Polglase, W.J., W.T. Pun, and J. Withaar. (1966). Lipoquinones of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 118: 425-426.

- 51.- Whistance, G.R., and D.R. Threlfall. (1968). Effect of anaerobiosis on the concentration of demethylmenaquinone, menaquinone and ubiquinone in *Escherichia freundii*, *Proteus mirabilis* and *Aeromonas punctata*. *Biochem. J.* 108:505-507.
- 52.- Makula R.A., P.J. Lockwood y W.R. Finnerty. 1975. Comparative analysis of the lipids of *Acinetobacter* species grown on hexadecane. *J. Bacteriol.* 121:250-258.
- 53.- Marcus L y T. Kaneshiro. 1972. Lipid composition of *Azaotobacter vinelandii* in which the internal membrane network is induced or repressed. *Biochim. Biophys. Acta* 288:296-303.
- 54.- Mannheim, W., W. Stieler, G. Wolf, and R. Zabel. (1978). Taxonomic significance of respiratory quinones and fumarate respiration in *Actinobacillus* and *Pasteurella*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 28: 7-13
- 55.- Thomson, R. H. (1971). Naturally occurring quinones. Academic Press, Inc., London.
- 56.- Threlfall, D. R., and G. R. Whistance. (1971). Biosynthesis of ubiquinone—a search for polyprenol phenol and quinone precursors. *Phytochemistry* 9: 355-359.
- 57.- Threlfall, D.R., and G. R. Whistance. (1971). Biosynthesis of isoprenoid quinones and chromanols, p. 357-404. In T. W. Goodwin (ed.), *Aspects of terpenoid chemistry and biochemistry*. Academic Press, Inc., London.
- 58.- Yamada, Y., K. Aida, and T. Uemura. (1968). Coenzyme Q10 in the respiratory chain linked to fructose dehydrogenase of *Gluconobacter cerinus*. *Agric. Biol. Chem.*, 32, 532-534.
- 59.- Yamada, Y., E. Nakazawa, A. Nosaki, and K. Kondo. 1976. Characterization of *Acetobacter xylinum* by ubiquinone system. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 22, 285-292.
- 60.- Yamada, Y., Y. Okada, and K. Kondo. 1976. Isolation and characterization of polarly flagellated intermediate strains in acetic acid bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 22, 237-245.
- 61.- Azerad, R., and M. O. Cyrot-Pelletier. 1973. Structure and configuration of the polyisoprenoid side chain of dihydromenaquinones from myco- and corynebacteria. *Biochimie* 55, 591-603.
- 62.- Beau, P. S., R. Azerad, and E. Lederer. 1966. Isolement et caractérisation des dihydro-menaquinones des myco- et corynébactéries. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 48, 569-581.

- 63.- Dunphy, P. J., P. G. Phillips, and A. F. Brodie. 1971. Separation and identification of menaquinones from microorganisms. *J. Lipid Res.* 12, 442-449.
- 64.- Yamada, Y., G. Inouye, Y. Tahara, and K. Kondo. 1976. The menaquinone system in the classification of coryneform and nocardioform bacteria and related organisms. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 22, 203-214.
- 65.- Yamada, Y., T. Ishikawa, Y. Tahara, and K. Kondo. 1977. The menaquinone system in the classification of the genus *Nocardia*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 23, 207-216.
- 66.-Truglio J.J., Theis K., Feng Y., Gajda R., Muchutta C., Tonge P.J., Kisker C. Crystal structure of Mycobacterium tuberculosis Men B, a key enzyme in vitamin K 2 biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 2003. 278. 42352-60.
- 67.- Dumphy P.j., Phillips P.G., Brodie A.F. Separation and identification of menaquinones from microorganisms. *J. Lipids Res.* 1971. 12. 442-9.
- 68.- Fieser m. *J. Biol. Chem.* 1940. Vol 133, 391-395.
- 69.- Monitor R, Robinson K. *Proc.Soc. Exp. Bio. Med* 1940. Vol 43, 725.
- 70.- Taggart W.V., Matschiner J.T.. *Biochemistry.* 1969. 8. 1141.
- 71.- Tsukamura M. New species of rapidly growing, scotochromogenic mycobacteria, *Mucobacterium chubuense* (Tsukamura), *Mycobacterium aichiense* (Tsukamura), and *Mycobacterium tokaiense* (Tsukamura). *Ed. Biol. (Tokyo)* 1973, 86, 13-17.
- 72.-Ichiyama S, Shimokata K, Tsukamura M. *Microbiol. Inmunol.* 1988; 32 (5): 473-9.
- 73.- Tsukamura M y Tsukamura S.M. *Mycobacterium aurum*, a new specie. *Med. Biol.* 1966, 72, 270-273.
- 74.- Baees I. Doxyribonucleic acid relateness among species of rapidly growing mycobacteria. *Acta Pathol. Microbio. Scand.* 1982, b 90, 371-375.
- 75.-Tsukamura M, Van der Meulen H.J. and Graboww W.O.K. Numerical taxonomy of rapidly growing, scotocrhomogenic mycobacteria of the *Mycobacterium parafortuitum* complex: *Mucobacterium africanum*. *Nov. Rev. j. Syst. Bacteriol.* 1983, 33, 460-469.
- 76.-Wermo A.M., Anderson T.P., Chambers S.T., Laird H.M., Murdoch D.R. Recurrent bread abscess caused by *Gordonia broncialis* in a immunocompetent patient. *J. Clin. Microb.* 2005 43(6), 3009-10.
- 77.- Garton N.J., Sutcliffe I.C. Identification of a lipoarabinomannan-like lipoglican in the actinomycete *Gordonia bronchialis*. *Arc. Microbiol.* 2006 Feb. 84 (6), 425-7.

- 78.- Tsukamura M. New species of rapidly growing, scotochromogenic mycobacteria, *Mycobacterium chubuense* (Tsukamura), *Mycobacterium aichiense* (Tsukamura), and *Mycobacterium kaiense* (Tsukamura). *Med. Biol. (Tokyo)*. 1973, 86, 13-17.
- 79.- Stanford J.L. and Gunthorpe W.J.. A study of some fast-growing scotochromogenic mycobacteria including species description of *Mycobacterium gilvum* (new species) and *Mycobacterium duvalii* (new species). *Br. J. Exp. Pathol.* 1971, 52, 627-637.
- 80.- Bojalil L.F., Cerbon J and Trujillo A. Adansonian classification of mycobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 1962, 28, 333-346.
- 81.- Tsukamura M. Classification of scotochromogenic mycobacteria. *Jpn. J. Microbiol.* 1968, 12, 63-65.
- 82.- Lechevalier M.P., Horan A.C. and Lechevalier H. Lipid composition in the classification of Nocardiae and Mycobacteria. *J. Bacteriol.* 1971, 105, 313-318.
- 83.- Tsukamura M and Mizuno S.A. A further study on the method of identification of mycobacteria by thin-layer chromatography after incubation with s-methionine. *Kekkaku*. 1979, 54, 15-27.
- 84.- Tsukamura M., Mizuno S and Tsukamura S. Numerical analysis of rapidly growing, scotochromogenic mycobacteria, including *Mycobacterium obuense* sp. Nov., nom. Rev. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1981, 31, 3, 263-275.
- 85.- Casimir M.T., Fainstein V., Papadopoulos N, Cavitory lug infection caused by *Mycobacterium flavescens*. *South Med. J.* 1982, 75, 253-254.
- 86.- Bergey D. H., Harrison F.C., Breed R.S., Hammer B.W., Huntoon F.M. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. The Williams and Wilkins Co., Baltimore. 1986, vol. II. Section 16, 1435-1457.
- 87.- Lehmann K.B. and Newman R.. *Lehman's Medizin, Handatanten X. Atlas und Gundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der Speciellen Bakteriologischen Diagnostik*. Aulf. J.F. Lehmann's, München. 1899.
- 88.- Moeller A. Mikroorganismen, die den tuberkel bacillen verwandt sind und bei thieren eine miliare tuberkelkrankheit verursachen. *Deut. Med. Wochschr.* 1998, 24, 376-379.
- 89.- Chester F.D. *A manual of determinative bacteriology*. Mc Millan Co.. New York. 1901.
- 90.- McIntosh K. S. and Moshier S.E. Carotenogenesis in a marine sponge, *Halichondria bowerbanki*. *Proc. Nebr. Acad. Sci.* 1979, p.15.



- 91.- Moshier S.E. Isolation, purification and identification of the aromatic carotenoid isorenieratene in the marine demosponge *Halichondria bowerbanki*. *Preoc. Nebr. Acad. Sci.* 1983, p. 15.
- 92.- Padgett P.J. and Moshier S.E. *Mycobacterium poriferae* sp. Nov., a scotochromogenic, rapidly growing species isolated from a marine sponge. *International Journal of Systematic Bacteriology.* 1987, 37, 186-191.
- 93.- Tsukamura M., Mizuno S., Gane N.F.F., Mills A. and King L. *Mycobacterium rhodesiae* sp. nov. A new species of rapidly growing scotochromogenic mycobacteria. *Jpn. J.* 1971, 15, 407-416.
- 94.- Chamoiseau G. *Mycobacterium farcinogenes* agent causal du farcin dub oeuf en Afrique. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)* 1973, 124 A, 214-222.
- 95.- Chamoiseau G. Etiology of farcy in Africa bovines: nomenclature of the causal organism *Mycobacterium farcinogenes* (Chamoiseau) and *Mycobacterium senegalense* (Chamoiseau) comb. Nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1979, 29, 407-410.
- 96.- Trevisan V. I generi e la especie dell batteriaceae. Zanaboni e Gabuzzi. Milano 1989.
- 97.- Lehman K.B. and Newman R. Lehman's Medizin, Handatlan X. Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der Speziellen Bakteriologischen Diagnostik. 2 Aulf. J.F. Lehmann', München .1989.
- 98.- Jones R.J. and Jenkins D.E. *Mycobacterium* isolated from soil. *Canad. J. Microbiol.* 1965, 11, 127.
- 99.- Skerman V.B.D., Mc Gowan V. and Sneath P.H.A. Approved list of bacterial names. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1980, 30, 225-420.
- 100.- Tsukamura M., Mizuno S. and Tsukamura S. Numerical analysis of rapidly growing, scotochromogenic mycobacteria, including *Nucobacterium obuense* sp. nov., nom. *Rev International Journal of Systematic Bacteriology.* 1981, 31, 3, 263-275.
- 101.- Runyon E.H., Wayne L.G. and Kubica G.P. Genus *Mycobacterium*. In Buchanan and Gibbons (Editors). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8<sup>a</sup> ed. The Williams and Wilkins Co. Baltimore. 1974, p. 682-701.
- 102.- Lechevalier M.P., Horan A.C. and Lechevalier H. Lipid composition in the clasificatio of *Nocardia* and *Mycobacteria*. *J. Bacteriol.* 1971, 105, 313-318.
- 103.- Daffé M., Laneelle M.A., Promé D. et Assellinau C. Etude des lipides de *Mycobacterium gordonae* comparativement a ceux de *Mycobacterium leprae* et de quelques mycobacteries scotochromogenes. *Ann. Microbiol. Paris* 1981, 132, 3-12.

- 104.- Casal M. Microbiología clínica de las enfermedades por micobacterias. Ed. Universidad de Córdoba. 1990.
- 105.- Adékambi T., Berger P., Raoult D. and Drancourt M.: *rpoB* gene sequence-based characterization of emerging non-tuberculous mycobacteria with descriptions of *Mycobacterium bolletii* sp. nov., *Mycobacterium phocaicum* sp. nov. and *Mycobacterium aubagnense* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2006, **56**, 133-143.
- 106.- Schinsky M.F., Morey R.E., Steigerwalt A.G., Douglas M.P., Wilson R.W., Floyd M.M., Butler W.R., Daneshvar M.I., Brown-Elliott B.A., Wallace Jr. R.J., McNeil M.M., Brenner D.J. and Brown J.M.: Taxonomic variation in the *Mycobacterium fortuitum* third biovariant complex: description of *Mycobacterium boenickei* sp. nov., *Mycobacterium houstonense* sp. nov., *Mycobacterium neworleansense* sp. nov. and *Mycobacterium brisbanense* sp. nov. and recognition of *Mycobacterium porcinum* from human clinical isolates. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2004, **54**, 1653-1667.
- 107.- Adékambi T., Berger P., Raoult D. and Drancourt M.: *rpoB* gene sequence-based characterization of emerging non-tuberculous mycobacteria with descriptions of *Mycobacterium bolletii* sp. nov., *Mycobacterium phocaicum* sp. nov. and *Mycobacterium aubagnense* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2006, **56**, 133-143.
- 108.- Schinsky M.F., Morey R.E., Steigerwalt A.G., Douglas M.P., Wilson R.W., Floyd M.M., Butler W.R., Daneshvar M.I., Brown-Elliott B.A., Wallace Jr. R.J., McNeil M.M., Brenner D.J. and Brown J.M.: Taxonomic variation in the *Mycobacterium fortuitum* third biovariant complex: description of *Mycobacterium boenickei* sp. nov., *Mycobacterium houstonense* sp. nov., *Mycobacterium neworleansense* sp. nov. and *Mycobacterium brisbanense* sp. nov. and recognition of *Mycobacterium porcinum* from human clinical isolates. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2004, **54**, 1653-1667.
- 109.- Jiménez M.S., Campos-Herrero M.I., García D., Luquin M., Herrera L. and García M.J.: *Mycobacterium canariasense* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2004, **54**, 1729-1734.
- 110.- Häggblom M.M., Nohynek L.J., Palleroni N.J., Kronqvist K., Nurmiaho-Lassila E.L., Salkinoja-Salonen M.S., Klatté S. and Kroppenstedt R.M.: Transfer of polychlorophenol-degrading *Rhodococcus chlorophenolicus* (Apajalahti *et al.* 1986) to the genus *Mycobacterium* as *Mycobacterium chlorophenolicum* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1994, **44**, 485-493.
- 111.- Validation list n° 111. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2006, **56**, 2025-2027. Adékambi T., Stein A., Carvajal J., Raoult D. and Drancourt M.: Description of *Mycobacterium conceptionense* sp. nov., a *Mycobacterium fortuitum* group organism isolated from a posttraumatic osteitis inflammation. *J. Clin. Microbiol.*, 2006, **44**, 1268-1273.]

112.- Cooksey R.C., De Waard J.H., Yakrus M.A., Rivera I., Chopite M., Toney S.R., Morlock G.P. and Butler W.R.: *Mycobacterium cosmeticum* sp. nov., a novel rapidly growing species isolated from a cosmetic infection and from a nail salon. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2004, **54**, 2385-2391.

113.- Shojaei H., Magee J.G., Freeman R., Yates M., Horadagoda N.U. and Goodfellow M.: *Mycobacterium elephantis* sp. nov., a rapidly growing non-chromogenic *Mycobacterium* isolated from an elephant. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2000, **50**, 1817-1819.

114.- Validation list n° 110. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2006, **56**, 1459-1460. Hormisch D., Brost I., Kohring G.W., Giffhorn F., Kroppenstedt R.M., Stackebrandt E., Färber P. and Holzapfel W.H.: *Mycobacterium fluoranthenivorans* sp. nov., a fluoranthene and aflatoxin B<sub>1</sub> degrading bacterium from contaminated soil of a former coal gas plant. *Syst. Appl. Microbiol.*, 2004, **27**, 653-660.]

115.- Validation list n° 21. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1986, **36**, 489. Tsukamura M., Yano I. and Imaeda T.: *Mycobacterium fortuitum* subsp. *acetamidolyticum*, a new subspecies of *Mycobacterium fortuitum*. *Microbiol. Immunol.*, 1986, **30**, 97-110.]

116.- Willumsen P., Karlson U., Stackebrandt E. and Kroppenstedt R.M.: *Mycobacterium frederiksbergense* sp. nov., a novel polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading *Mycobacterium* species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2001, **51**, 1715-1722.

117.- Kleespies M., Kroppenstedt R.M., Rainey F.A., Webb L.E. and Stackebrandt E.: *Mycobacterium hodleri* sp. nov., a new member of the fast-growing mycobacteria capable of degrading polycyclic aromatic hydrocarbons. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1996, **46**, 683-687.

118.- Richter E., Niemann S., Gloeckner F.O., Pfyffer G.E. and Rüscher-Gerdes S.: *Mycobacterium holsaticum* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2002, **52**, 1991-1996.

119.- Schinsky M.F., Morey R.E., Steigerwalt A.G., Douglas M.P., Wilson R.W., Floyd M.M., Butler W.R., Daneshvar M.I., Brown-Elliott B.A., Wallace Jr. R.J., McNeil M.M., Brenner D.J. and Brown J.M.: Taxonomic variation in the *Mycobacterium fortuitum* third biovariant complex: description of *Mycobacterium boenickei* sp. nov., *Mycobacterium houstonense* sp. nov., *Mycobacterium neworleansense* sp. nov. and *Mycobacterium brisbanense* sp. nov. and recognition of *Mycobacterium porcinum* from human clinical isolates. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2004, **54**, 1653-1667.

120.- Schinsky M.F., Morey R.E., Steigerwalt A.G., Douglas M.P., Wilson R.W., Floyd M.M., Butler W.R., Daneshvar M.I., Brown-Elliott B.A., Wallace Jr. R.J., McNeil M.M., Brenner D.J. and Brown J.M.: Taxonomic variation in the *Mycobacterium fortuitum* third biovariant complex: description of *Mycobacterium boenickei* sp. nov., *Mycobacterium houstonense* sp. nov.,

*Mycobacterium neworleansense* sp. nov. and *Mycobacterium brisbanense* sp. nov. and recognition of *Mycobacterium porcinum* from human clinical isolates. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2004, **54**, 1653-1667.

121.- Adékambi T., Berger P., Raoult D. and Drancourt M.: *rpoB* gene sequence-based characterization of emerging non-tuberculous mycobacteria with descriptions of *Mycobacterium bolletii* sp. nov., *Mycobacterium phocaicum* sp. nov. and *Mycobacterium aubagnense* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2006, **56**, 133-143.

122.- Derz K., Klinner U., Schuphan I., Stackebrandt E. and Kroppenstedt R.M.: *Mycobacterium pyrenivorans* sp. nov., a novel polycyclic-aromatic-hydrocarbon-degrading species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2004, **54**, 2313-2317.

123.- Trujillo M.E., Velázquez E., Kroppenstedt R.M., Schumann P., Rivas R., Mateos P.F. and Martínez-Molina E.: *Mycobacterium psychrotolerans* sp. nov., isolated from pond water near a uranium mine. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2004, **54**, 1459-1463.

124.- Skerman V.B.D., McGowan V. and Sneath P.H.A. (editors): Approved Lists of Bacterial Names. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1980, **30**, 225-420. [Tsukamura M.] Adansonian classification of mycobacteria. *Journal of General Microbiology*, 1966, **45**, 253-273.]

125.- Khan A.A., Kim S.J., Paine D.D. and Cerniglia C.E.: Classification of a polycyclic aromatic hydrocarbon-metabolizing bacterium, *Mycobacterium* sp. strain PYR-1, as *Mycobacterium vanbaalenii* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2002, **52**, 1997-2002.

126.- Brown B.A., Springer B., Steingrube V.A., Wilson R.W., Pfyffer G.E., Garcia M.J., Menendez M.C., Rodriguez-Salgado B., Jost Jr. K.C., Chiu S.H., Onyi G.O., Böttger E.C. and Wallace Jr.R.J.: *Mycobacterium wolinskyi* sp. nov. and *Mycobacterium goodii* sp. nov., two new rapidly growing species related to *Mycobacterium smegmatis* and associated with human wound infections: a cooperative study from the International Working Group on Mycobacterial Taxonomy. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1999, **49**, 1493-1511.

127.- Shin N., Sugawara Y., Tsukada K., Tamura S., Akamatsu N., Okogawa S., Koike K., Kikuchi K., Makuuchi M. Successful treatment of disseminated *Nocardia farcinica* infection in a living-donor liver transplantation recipient. *Transpl Infect Dis.* 2006 Dec;8(4):222-5.

128.- Dodds EM, Echandi LV, Puente SI, Kaufman S. Subretinal abscess due to *Nocardia farcinica* resistant to trimethoprim-sulfamethoxazole in a patient with systemic lupus erythematosus. *Ocul Immunol Inflamm.* 2006 Aug;14(4):249-51.

129.- Flaherty C, Sutcliffe IC, Identification of a lipoarabinomannan-like lipoglycan in *Gordonia rubropertincta*. *Syst Appl Microbiol.* 1999 Dec;22(4):530-3.

- 130.- Suvarna K., Stevenson D., Meganathan R. y Hudspeth M.E.S. Menaquinone (Vitamin k) Biosynthesis: Localization and Characterization of the menA Gene from *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. May 1998. Vol 180. 2782-2787.
- 131.- Hong, T., Butler, W. R., Hollis, F., Floyd, M. M., Toney, S. R., Tang, Y. W., Steele, C. and Leggiadro, R. J. Characterization of a novel rapidly growing *Mycobacterium* species associated with sepsis. *J. Clin. Microbiol.*, 2003, 41, 12: 5650-5653.
- 132.- Collins M.D., Piroux M. Goodfellow and Minnikin. Distribution of menaquinones in actinomycetes and corynebacteria. *J. Gen Microbiol.* 100:221-230. (1977).
- 133.- James K, Attipou KK, James YE, Blakime M, Tignokpa N, Abete B. *Sante*. 2003. Jan Mar, 13 (1) 43-7.
- 134.- Nackers T, Johnson RC, Glyn JR, Zinson C, Tonglet R, Portaels T. Environmental and Health-Related Risk Factors for Mycobacterium ulcerans Disease (Buruli Ulcera in Benin). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2007 Nov 77 (5) 834-836.
- 135.- Brandao PF, Maldonado LA, Wad AC, Bull AT, Goodfellow M. *Syst Appli. Microbiol.* 2001. Dec.24 (4) 510-5
- 136.- Schinsky MF, Morey RE, Steigewalt AG, Douglas MP, Wilson RW, Floyd MM, Butler WR, Daneshvar MI, Brown-Elliot BA, Wallace RJ Jr, McNeil MM, Brenner D J, Brown JM. Taxonomic variation in the Mycobacterium fortuitum third variant complex: description of Mycobacterium boenickei sp.nov., Mycobacterium houstonense sp. Nov., Mycobacterium neworleaense sp.nov. and Mycobacterium brisbanense sp. Nov. and recognition of Mycobacterium porcinum from human clinical isolates. *Int J Syst. Evol. Microbiol.* 2004 Sep; 54(Pt 5):1653-67.
- 137.- Willumsen P, Karlson U, Stackebrandt E, Kroppennstedt RM. Mycobacterium frederiksbergense sp.nov., a novel polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading Mycobacterium species. *Int J Syst Microbio.* 2001 Sep; 51 (Pt 5):1715-22.
- 138.- Louis Fieser & Mary Fieser. *Química Orgánica Superior* p.1477. *Tratados y Manuales Grijalbo*, traducido por Francisco Giral, Presidente de la 2ª República española en su destierro mexicano en 1966.
- 139.- Henrik Dam, n.1895 en Copenhague (Dinamarca); Prof. Esc. Politéc. Copenhague. Premio Nobel en 1943.
- 140.- Edward A. Doisy, n. 1893, Hume, III (EEUU); Dr. Harvard; Prof. Esc. Medc. Univ. St. Louis, Missouri (EEUU). Premio Nobel en 1943.
- 141.- McKee et al. *J. Biol. Chem.* 131, 327 (1949).
- 142.- *Catálogo de Plantas Medicinales. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos.* 2008.