

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
inéditas



TESIS DOCTORAL

Estudio sistemático de la degradación bacteriana del gas-oil

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Octavio Frieyro Rodríguez-Medel

Madrid, 2015

est



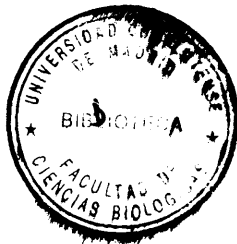
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5310045646

**"ESTUDIO SISTEMÁTICO
DE LA
DEGRADACIÓN BACTERIANA
DEL GAS-OIL"**

(Tesis Doctoral)



R. 28.233

INDICE

Página

I - Introducción

1.1. La Microbiología del Petróleo: breve revisión bibliográfica	1
1.2. Microorganismos que intervienen en estos procesos	8
1.3. Resumen de los principales mecanismos de ataque a hidrocarburos	10
1.4. Justificación del trabajo	
1.4.1. Justificación del tema	14
1.4.2. Justificación de las técnicas	16

II - Material y métodos

2.1. Métodos bacteriológicos	
2.1.1. Aislamiento	17
2.1.2. Medios de cultivos	19
2.1.3. Clasificación del material biológico	21
2.2. Otros métodos	
2.2.1. Extracción de los productos liposolubles del medio	23
2.2.2. Fraccionamiento en columna	24
2.2.3. Cromatografía de los productos del metabolismo	26
2.2.4. Separación de parafinas lineales y parafinas ramificadas y cíclicas	26
2.2.5. Espectroscopía infrarroja	27
2.3. Aparatos	
2.3.1. Columnas de cromatografía	30
2.3.2. Fermentadores	33

III - Esquema del trabajo propuesto 38

IV - Resultados

4.1. Aislamiento y clasificación del material biológico	
4.1.1. Estudio diagnóstico de las estirpes - P-1, P-2, P-3 y P-36	39
4.1.2. Estudio diagnóstico de las estirpes - P-8, G-27 y P-36	46
4.1.3. Estudio diagnóstico de las estirpes - G-28, G-41, P-42, G-43 y P-44	50
4.1.4. Estudio diagnóstico de la estirpe -- Pa-19	50

4.1.5.	Estudio diagnóstico de las estirpes - P-4, P-5, P-9, G-39 y P-40	57
4.1.6.	Estudio diagnóstico de la estirpe -- K-21	57
4.1.7.	Estudio diagnóstico de las estirpes - P-7, K-10, G-11, G-12, A-13, A-14, - K-15, G-16, Pa-17, Pa-18, K-22, Pa-23, G-26, G-31, G-33, P-34, P-35, P-37 y P-38	64
4.1.8.	Estudio diagnóstico de las estirpes - P-24 y G-25	64
4.2.	Pruebas preliminares. Medios de cultivo.	
4.2.1.	Estudio de la fuente óptima de nitró- geno	86
4.2.2.	Concentración óptima de la fuente ni- trogenada	89
4.2.3.	Proporción óptima de la fuente de car- bono	90
4.3.	Estudio espectroscópico del gas-oil	91
4.4.	Fraccionamiento del gas-oil por cromatogra- fía y formación de aductos con urea	
4.4.1.	Fraccionamiento por cromatografía	94
4.4.2.	Separación de parafinas lineales y pa- rafinas ramificadas y cíclicas	102
4.5.	Estudio espectroscópico del gas-oil y sus - fracciones	
4.5.1.	Asignación de bandas	111
4.6.	Resultado de los cultivos en las diferentes fracciones	
4.6.1.	Pruebas en pentadecano y 2,6,10,14-te- trametilpentadecano (pristano)	116
4.6.2.	Estudio comparado de los espectros IR de extractos de los cultivos	120
4.6.2.1.	Resultado de los cultivos de especies de los géneros Cory- nebacterium y Arthrobacter	120
4.6.2.2.	Resultado de los cultivos de especies del género Brevibac- terium	147
4.6.2.3.	Resultado de los cultivos de especies del género Nocardia	163
4.6.2.4.	Resultado de los cultivos de especies del género Strepto- myces	195
4.6.2.5.	Resultado de los cultivos de especies del género Micrococ- cus	201
4.6.2.6.	Resultado de los cultivos de especies del género Pseudomo- nas	223
4.6.2.7.	Resultado de los cultivos de especies de los géneros --- Achromobacter y Alcaligenes	307

Página

4.6.3. Utilización de las n-parafinas por las distintas estirpes. Variación de absorbencia de la banda a 720 cm^{-1}	317
4.6.4. Medida de la oxidación producida - en los distintos cultivos. Estudio de la intensidad de las bandas de la región 1800-1700 cm^{-1}	319
4.6.5. Estudio cinético de la variación - de la intensidad de las bandas a - 1710 y 720 cm^{-1} para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> estirpe G-34	321
4.7. Cultivos en fermentadores	325
4.7.1. Cultivos sobre gas-oil completo	325
4.7.1.1. Resultados espectroscópicos. Determinación y asignación de bandas	327
4.7.2. Cultivo sobre la fracción <u>parafínica</u>	358
V - Resumen y conclusiones	363
VI - Bibliografía	373

I - INTRODUCCION

1.1. La Microbiología del Petróleo: Breve revisión bibliográfica

El estudio de la degradación y utilización microbiana de los productos del petróleo, constituye una rama relativamente moderna de la Microbiología. Solo a partir del año 1945, podemos encontrar una bibliografía que no empieza a ser abundante hasta más allá de 1960.

Sin embargo, las revisiones bibliográficas citan referencias de trabajos que merecen el calificativo de históricos. Así A.E. Humphrey (1967) considera la fecha de 1895 como el origen de la Microbiología de los Hidrocarburos, citando la observación de M. Miyoshi, de que un hongo, Botrytis cirenea, podía atacar a las parafinas. J.C. Senez (1969) da cuenta de un trabajo realizado en 1906 por Rahn comprobando que Penicillium glaucum puede desarrollarse a partir de parafina comercial. Los trabajos de Söhngen (1906) (1913) son ya de gran interés científico, demostrándose en ellos la utilización del metano y aislándose 17 estirpes de bacterias capaces de crecer en diversas fracciones petrolíferas.

Desde estos primeros trabajos hasta la aparición en -- 1945 de la primera patente americana que proponía un sistema de prospecciones petrolíferas basadas en estas técnicas, las comunicaciones sobre el tema fueron muy infrecuentes. Fue hacia esta fecha cuando empezaron a publicarse los primeros trabajos sobre ataque a los hidrocarburos realizados ya en el laboratorio. Hay que destacar que por entonces se creía que la facultad de metabolizar hidrocarburos era una propiedad específica que presentaban muy pocos microorganismos del suelo y que a partir de este momento se empezó a considerar como un hecho ampliamente extendido entre una muy diversa gama de microorganismos cuya -- distribución no quedaba localizada en el suelo, sino prácticamente en todos los medios ecológicos imaginables.

Los primeros trabajos fueron orientados especialmente al descubrimiento de métodos microbiológicos de interés en las prospecciones petrolíferas. Sin embargo, y aunque el tema todavía recientemente ha sido objeto de estudios, pronto se llegó a la conclusión de que a pesar de que en ciertos casos el estudio de la presencia de microorganismos que utilizan hidrocarburos -

2

puede poner de manifiesto algunos datos importantes sobre la distribución de los yacimientos de petróleo, el desarrollo de métodos químicos directos para la identificación de trazas de hidrocarburos (cromatografía de gases, por ejemplo) permite de cidir con más rapidez y seguridad en la mayoría de las ocasiones. Brisbane y Ladd (1964) hacen una revisión completa del tema y llegan a esta conclusión. En cualquier caso, todavía se investiga en este campo, y en el tratado de Davis (1967) se pueden encontrar sugerencias sumamente interesantes.

Otros tipos de problemas a los que se dedicó especial atención en trabajos relativamente recientes, fueron los relacionados con la corrosión y el ataque a los combustibles, particularmente a los que utilizan los motores de aviación. Un estudio detallado sobre este tipo de investigación, se encuentra en el libro publicado por Sharpley (1964) aunque había sido considerado mucho tiempo atrás por Beerstecher (1954).

Más recientemente, los trabajos tienden a encontrar un aprovechamiento industrial de todas estas actividades microbiológicas. Podemos citar como más interesantes a este respecto, los de Raymond y Davis (1960) sobre el desparafinado microbiológico de los crudos de petróleo; las patentes de Champagnat y Col.(1963) (1966) sobre obtención de concentrados proteino-vitaminicos, utilizando como material base los crudos de la fracción gasoil; la obtención de cantidades relativamente altas de ácido salicílico y de ácido l-glutámico según los trabajos de Hosler (1963) y de Yamada y Col.(1965); la producción de ácidos nucleicos estudiada por Fukuda y Col.(1969) y, finalmente experiencias muy interesantes de Davis y Col.(1964) y otros investigadores americanos, sobre la fijación de nitrógeno atmosférico por bacterias que oxidan el metano.

Según Humphrey (1967) hasta 1967 y desde 1950 habían aparecido alrededor de 500 comunicaciones relativas a estos temas y una docena de revisiones bibliográficas generales y particulares, además de dos libros. En la actualidad se pueden considerar incrementados en un centenar, por lo menos, el número de publicaciones y existe un nuevo tratado completo.

Como señala muy acertadamente Amphlett (1966) en los últimos años ha habido un cambio radical en cuanto a la importancia concedida a los diversos temas dentro de la Microbiología del Petróleo, disminuyendo los estudios relacionados con los fenómenos de deterioro y contaminación en favor de los que tratan de las posibilidades de síntesis de diferentes productos. Para él este cambio es debido sobretodo, al mejor conocimiento adquirido de la bioquímica y de la microbiología básica de los procesos de fermentación de hidrocarburos. Comentaremos a continuación, los temas generales que, según este mismo autor, abarcaría el ámbito de la Microbiología de Petróleo:

- a) El uso de métodos bacteriológicos en la búsqueda de nuevos yacimientos naturales de petróleo y gas. Destacan en este campo las experiencias de investigadores rusos, especialmente Mogilevskii y Sokolov.

Como ya hemos indicado anteriormente, los métodos de análisis químicos han desplazado a los procedimientos microbiológicos; estos consisten en el estudio cuantitativo y cualitativo de la flora microbiana del suelo, responsable de la oxidación de metano, etano, propano, heptano y parafinas de cadena larga. Los resultados son de interés muy variable pero podemos afirmar que, en general, la especificidad de su trato de más valor práctico es la de las bacterias que emplean etano y propano, siendo por el contrario las bacterias del metano muy poco específicas y, por lo tanto, de poco interés su investigación.

b) El papel geológico de los microorganismos en el origen de los depósitos de petróleo, y los estudios experimentales sobre síntesis de hidrocarburos y productos relacionados, por microorganismos. El trabajo más completo desarrollado en este camino, lo constituye el denominado Proyecto 43 de la American Petroleum Institute (A.P.I.) dirigido por Zobell, Whitmore y Mead y realizado en tres direcciones: 1) estudio del papel real de las bacterias marinas en la conversión de la materia orgánica de petróleo 2) efectos fisicoquímicos y microbiológicos de la transformación de la materia orgánica en petróleo y 3) efecto de la radioactividad natural sobre la modificación de la materia orgánica sedimentaria.

La investigación llevada a cabo con desigual éxito parece indicar un origen microbiano de los sedimentos recientes de protopetróleo. Según los esquemas propuestos, jugarían un importante papel en este proceso las bacterias reductoras de sulfatos, que producirían bisulfuros de hierro y serían la fuente del hidrógeno necesaria en la formación inicial de hidrocarburos. Otras teorías suponen la polimerización del metano formado por bacterias o más verosímilmente, una decarboxilación reductora de los ácidos grasos.

Las teorías biológicas de la formación del petróleo han sido criticadas de nuevo hace relativamente poco tiempo por algunos geólogos rusos, que pretenden renovar las antiguas teorías del origen abiótico. Oppenheimer (1965) hace una revisión general sobre estos temas.

c) Problemas microbiológicos que se plantean en la extracción de los crudos en los campos petrolíferos. Principalmente se trata de cubrir dos objetivos interesantes, cuya solución puede suponer una gran ventaja económica. Por un lado, es bien sabido que una buena proporción del petróleo que se encuentra en un yacimiento, es retenido por las rocas sedimentarias acompañantes, siendo actualmente imposible su extracción. Este petróleo no recuperable puede suponer entre un 20 y un 80% del original, por lo que se comprende el interés que tiene el facilitar su obtención. Las soluciones microbiológicas ensayadas --

comprenden: 1) La disolución de las rocas sedimentarias por ácidos orgánicos y ácido carbónico producido en el metabolismo microbiano; 2) el efecto detergente de sustancias tensoactivas producidas por bacterias y 3) arrastre del crudo por gases (hidrógeno y metano).

Aunque existen numerosas patentes americanas que pretenden resolver estos problemas, en la práctica no se utilizan, por resultar en su mayor parte inútiles. En frase de Davis "la literatura de las patentes es frecuentemente un medio gracias al cual se publican y describen procesos microbiológicos puramente especulativos". Los resultados prometedores obtenidos por Zobell con bacterias reductoras de sulfatos (particularmente Desulfovibrio) tropezaron posteriormente con inconvenientes insalvables sobre todo el efecto corrosivo del SH₂ producido sobre las herramientas.

2

En Rusia se hicieron pruebas sobre el terreno, dirigidas por Mushim y Zlotnikov (citado por Davis de Dostalek) (1967); en ellas se inyectaban cultivos de bacterias productoras de metano, manteniéndose en condiciones anaerobias durante períodos de tiempo del orden de 6 meses. Los resultados aunque positivos en algunos aspectos, no justificaron la utilización de tales procedimientos. Contrariamente a lo que se pretendía y había esperar, la viscosidad del crudo aumentó considerablemente, si bien la producción del pozo se incrementó de 37 a 40 toneladas diarias durante los 4 primeros meses de extracción. Se han ensayado otros procedimientos cuya descripción resultaría demasiado extensa en estas notas preliminares.

El otro campo de interés relacionado con la extracción de los crudos se refiere a la utilización de bactericidas y fungicidas (derivados de naftaleno sobre todo) para inhibir el crecimiento de microorganismos que taponan los poros de las "rocas almacenes"; los mismos microorganismos (bacterias reductoras de sulfatos) son causantes del deterioro del material utilizado en estas operaciones. Se utiliza también como antimicrobiano, formol en 10 ppm. Senez (1971).

d) Contaminación del petróleo y sus fracciones, con la consecuente pérdida del producto y fenómenos de corrosión del equipo. Este capítulo de la Microbiología del Petróleo, ha sido muy investigado por su importancia industrial. Los principales problemas que surgen por la actividad microbiana indeseable en tecnología del petróleo, pueden resumirse en los siguientes apartados: 1) corrosión de metales y forma de evitarlo; 2) taponamiento de las conducciones y 3) contaminación del petróleo y sus derivados con perjuicio para los motores de combustión y tanques de almacenamiento.

Las principales bacterias responsables de la corrosión pertenecen a los grupos de reductoras de sulfatos (Desulfovibrio) y ferrobacterias (Gallionella, --

Leptothrix y Crenotrix). En cuanto a la forma de evi-
tarlas se emplean sobre todo aminas alquilsustituidas
y compuestos de amonio cuaternario.

El taponamiento de las conducciones lo producen prin-
cipalmente Pseudomonas y Desulfovibrio, pero aparecen
también bacterias oxidantes del ión ferroso (Caulobac-
teriaceas y Clamidobacteriaceas) citadas en el grupo
anterior. El efecto principal es causado por la forma
ción de sulfuro de hierro en presencia de materia or-
gánica, particularmente los polisacaridos de la pared
bacteriana.

La contaminación de productos derivados del petróleo
ha sido un problema extensamente tratado por la lite-
ratura. Son muy interesantes los trabajos de Allen y
Col. (1945) sobre la contaminación de gasolina y ---
otros combustibles utilizados por los motores de avia-
ción; éstos últimos son mejor utilizados por los mi-
croorganismos por tener cadenas parafínicas más lar-
gas, hecho comprobado por nosotros. Según Davis ---
(1967) podemos citar tres mecanismos microbiológicos
en la destrucción de gasolina y combustibles de avia-
ción:

- 1) Crecimiento microbiano a cargo de los
hidrocarburos de la mezcla
- 2) Crecimiento debido a la presencia de -
aditivos orgánicos
- 3) Producción de sulfuro de hidrógeno por
bacterias reductoras de sulfatos, que
reaccionando con los componentes res-
tantes darían sulfuros orgánicos fuer-
temente corrosivos.

Para evitar estos problemas se pueden citar varios --
procedimientos:

- 1) Eliminar la presencia de agua en el --
fondo de los recipientes que van a al-
macenar o contener el producto.
- 2) Obtener combustibles que sean lo más -
refractarios posibles al ataque micro-
biano o eliminar de ellos los que sean
particularmente susceptibles. Lo mismo
se puede decir para los aditivos.
- 3) Utilización de productos antimicrobia-
nos.

Mención aparte merece la degradación microbiana de los
asfaltos, capítulo al que quizás no se ha dado la de-
bida importancia por las dificultades que entraña su
investigación. Los fenómenos de "envejecimiento" de -
estos productos, (Hidalgo, 1964) serán debidos en ---
gran parte al ataque realizado por determinadas espe-
cies de bacterias capaces de utilizarlas como única -
fuente de carbono. Son muy interesantes los trabajos
realizados por Phillips y Traxler (1963) (1965) (1969)
con asfaltos naturales y productos asfálticos de des-
tilación; estos últimos son degradados con mayor faci-

lidad por ser más alto su contenido parafínico.

Debido a la importancia de los betunes como materiales de construcción, la investigación de este problema microbiológico es de un gran interés. Por otra parte, -- hay que tener en cuenta la presencia de estos sustratos de compuestos aromáticos complejos, que son considerados como antibióticos y, en cambio, parecen ser de gradados por ciertos microorganismos.

Las enzimas implicadas son inducibles y los géneros -- más comunes son Pseudomonas, Mycrobacterium y Micrococcus.

El conjunto de este capítulo de la Microbiología del - Petróleo ha sido revisado por Sharpely (1966).

e) Transformación microbiológica y bioquímica del petróleo y sus componentes. Incluiremos en este -- apartado todo lo referente a los procesos metabólicos realizados sobre sustratos hidrocarburos. Aunque di---chos procesos se resumen más adelante, indicaremos aho- ra que la literatura es muy abundante en trabajos de - este tipo. Los más interesantes, se refieren al metabo- lismo de los distintos grupos de hidrocarburos.

En general se estudian por separado las parafinas (li- neales ramificadas y cíclicas), las olefinas y aromáti- cos. La bibliografía es muy escasa, en cambio, en lo - que se refiere a la degradación de heterociclos, tema que sería de interés por tratarse de moléculas que pue- den proporcionar una fuente de azufre y nitrógeno en - la fermentación de hidrocarburos.

En cuanto a las parafinas son mejor metabolizadas las de cadena lineal y, entre ellas, las que tienen 8 a 18 átomos de carbono, (Foster, 1962). Moléculas más peque- ñas interfieren al parecer con el crecimiento, por su efecto sobre la pared celular, (Humphrey, 1967); por - el contrario, moléculas mayores son menos accesibles - al microorganismo por ser sólidas a las temperaturas - normales de cultivo. En cualquier caso, como nosotros hemos comprobado, ambos tipos de parafinas, menores de C5 y mayores de C18 soportan el crecimiento y son uti- lizadas como fuente de carbono por algunas bacterias.

Las parafinas ramificadas o cíclicas son metabolizadas en menor grado; sin embargo, a pesar de lo que la bi- bliografía afirma Humphrey (1967), no son escasas las bacterias capaces de utilizar en su metabolismo algu- nos de estos productos. Los mecanismos bioquímicos es- tán compendiados en las revisiones de Foster (1962), - Mckenna y Kallio (1965, 1966 y 1968) y Van der Linden y Thijsse (1965).

Los anillos bencénicos son difícilmente metabolizados, siéndolo sobre todo por bacterias del género Pseudomo- monas. Se citan además, frecuentes fenómenos de co-oxi- dación es decir utilización de otro tipo de hidrocarbu- ros como fuente de carbono y oxidación simultánea de -

otras moléculas incapaces por sí mismas de soportar el crecimiento del microorganismo. Al parecer las parafinas cíclicas también sufren fenómenos de co-oxidación. Las vías metabólicas de ataque a anillos aromáticos se resumen más adelante y han sido revisados por Treccani (1965) Humphrey y Evans (citado por Amphlett 1966) entre otros.

f) El uso de procesos bacteriológicos para la obtención de productos de interés económico a partir de hidrocarburos. Siguiendo a Amphlett (1966) podemos establecer dos grupos de investigaciones: las que se dirigen a la producción de biomasa, y las que van encaminadas a la obtención de otros productos alimenticios de interés, como pueden ser vitaminas y aminoácidos.

La conversión del carbono e hidrógeno (y posiblemente azufre y nitrógeno también) de las reservas de petróleo, en alimentos para animales e incluso aprovechables en la dieta humana, puede representar una fuente nutritiva importante en el futuro. La dificultad más grande con que tropieza este tipo de trabajos, radica en conseguir un producto sanitariamente aceptable, eliminando todas las posibles impurezas como pueden ser restos del hidrocarburo sin metabolizar. Aunque los primeros trabajos no resultaran satisfactorios, en la actualidad se trabaja ya a nivel industrial en las instalaciones de la BP francesa de Lavera (Marsella). En los últimos años han sido patentados algunos métodos para conseguir la purificación del material alimenticio. Los microorganismos más comunmente utilizados son levaduras de los géneros Candida, Torula y Torulopsis.

Muy interesantes son los trabajos publicados por Champagnat (1963), Vernet (1965), Azoulay (1966) y Senez (1969).

Por otra parte, las soluciones de la BP están encaminadas no sólo a obtener unas proteínas alimenticias, sino a producir, al mismo tiempo, un desparafinado microbiológico de los crudos de gas-oil; este proceso mejora la calidad del producto final y se realizaba hasta ahora por métodos químicos. El estudio del contenido en aminoácidos y vitaminas del concentrado obtenido revela una elevada concentración de aminoácidos como, lisina y treonina, que son escasos en las proteínas de gramíneas que se emplean en alimentación, siendo en cambio pobres en otros que abundan en dichas proteínas; todo ello indica la conveniencia de asociar los dos tipos de alimentos para conseguir un producto de gran calidad.

La obtención selectiva de otros compuestos orgánicos - utilizando hidrocarburos como materia prima está actualmente siendo investigada en muchos laboratorios. Destaca particularmente la producción de ácido glutámico por ciertas estirpes de Pseudomonas y Nocardia estudiada por Shiio e Igushi (1963-71). Otros productos en estudio son ácido salicílico a partir de naftaleno, ácidos grasos, giberelinas y ácido giberélico, ácido -

benzoico (Amphlett 1967), Acidos nucleicos (Fukuda - 1969), etc.

1.2. Microorganismos que intervienen en estos procesos

Como ya hemos indicado anteriormente son muchos los -- microorganismos distintos capaces de utilizar los hidrocarburos como única fuente de carbono, en un medio que sólo posea además sales minerales.

Fuhs (citado por Foster, 1962) proporciona una lista - que comprende alrededor de 100 nombres entre bacterias, actinomicetos, levaduras y hongos. Sin embargo, como hace notar el -- propio Foster, estos microorganismos han sido aislados siguiendo las técnicas de enriquecimiento de cultivos y empleando muy diferentes hidrocarburos como fuentes de carbono únicas. Cuando para atacar diferentes sustratos, se observa que la especificidad es relativamente grande y la variedad de organismos obtenidos en un trabajo de aislamiento sobre un sustrato concreto es, en consecuencia, muy reducida.

Kester (1961) ha hecho en Austin un estudio completo - de las clases de microorganismos obtenidos del suelo, en experimentos, en los que empleó un gran número de hidrocarburos puros como única fuente de carbono. También variaba las condiciones experimentales entre los límites habituales en este tipo de trabajos. Los microorganismos más frecuentemente obtenidos pertenecían a los siguientes géneros: Streptomyces, Nocardia, Mycobacterium, Corynebacterium y Brevibacterium. Otros microorganismos obtenidos con bastante frecuencia en las experiencias de -- Kester fueron: Pseudomonas, Flavobacterium, Achromobacter y --- unas pocas especies de hongos filamentosos.

En una segunda experiencia el mismo autor comprueba, - utilizando estirpes de colección, que la facultad de utilizar - hidrocarburos está ampliamente extendida entre bacterias y hongos que, sin embargo, no aparecen en los medios de enriquecimiento utilizados comunmente para su aislamiento. Empleando n-tridecano, que en experiencias previas se había comportado como uno de los hidrocarburos más fácilmente atacados, comprobó el - crecimiento de bacterias como Alcaligenes, Bacillus, Flavobacterium y Micrococcus. Entre los hongos, encuentra los géneros --- Acremonium, Aspergillus, Cephalosporium, Colletotrichum, Fusarium y Monilia. Por supuesto, todos estos microorganismos ha--- bían demostrado ser capaces de crecer utilizando otras fuentes de carbono.

De estos trabajos se puede concluir, que la utiliza--- ción de los diversos tipos de hidrocarburos es una característi--- ca más extendida de los que cabía esperar en la naturaleza, y - que pueden ser añadidos estos productos en la lista de los utilizados rutinariamente en los trabajos de sistemática microbiana. De hecho, para casos concretos se han empleado ya, sobre to--- do los aromáticos, en la determinación de algunas especies. Ade--- más se han aconsejado medios selectivos con parafinas, como --- fuente de carbono única, para el aislamiento de las estirpes -- del género Mycobacterium. Ultimamente se ha descrito por diversos autores, algunas especies nuevas caracterizadas por su capa--- cidad de atacar hidrocarburos (Iizuka, 1964).

En cuanto a la especificidad de sustrato, los trabajos al respecto parecen indicar que por lo menos sería tan grande - como la que existe para otras fuentes carbonadas, como pueden - ser ácidos orgánicos, azúcares, etc. Hay que señalar que los -- distintos tipos de hidrocarburos no presentan la misma dificultad para ser metabolizados. Por citar algún trabajo de los realizados en este sentido, describiremos brevemente el de Lukins (1962) que nos parece bastante ilustrativo. El autor citado, -- trabajó con 21 estirpes de *Mycobacterium* pertenecientes a 9 especies diferentes y, aunque el trabajo no tiene la amplitud que sería de desear por estar restringido a un solo género, pone de manifiesto las líneas generales del comportamiento de las bacterias frente a los hidrocarburos. Utilizó en primer lugar parafinas lineales de uno a diecisiete átomos de carbono, observando que todas las estirpes crecieron en todas las parafinas superiores a C₁₂ y ninguna de ellas en metano ni etano; el 50% de las estirpes utilizaron todas las parafinas a partir de C₉. Sólo -- una estirpe, que no procedía de colección y había sido aislada sobre isobutano, creció en 3 de las 11 parafinas ramificadas en sayadas, mientras que el resto de las estirpes no utilizó ninguno de estos hidrocarburos. Finalmente, sólo una creció ocasionalmente en las 8 olefinas, 4 parafinas cíclicas, y 5 bencilalcanos probados. Como hemos indicado, este comportamiento es bastante frecuente y sería significativo de un gran número de géneros de bacterias y otros microorganismos, pero no se puede en ningún caso generalizar.

En otro experimento similar realizado con una estirpe de *Ps. aeruginosa* por Thijsse y Zwilling de Vries (1959) se estudian parafinas ramificadas derivadas de hexano, heptano y octano, encontrando que ninguna de las 4 derivadas del hexano era utilizada para el crecimiento; sólo lo fue 1 de los 8 heptanos y 3 de 17 octanos. Aunque, en nuestro entender, se debieron probar también parafinas de cadenas más largas, de este trabajo se pueden sacar conclusiones sobre el tipo de moléculas preferentemente utilizadas, siendo éstas las metilramificadas y sólo cuando las ramificaciones quedaban separadas por, al menos, 3 ó 4 átomos de carbono en línea. Aunque es realmente expuesto generalizar con tan escasos datos experimentales, y teniendo en cuenta además que se utilizaron a menudo técnicas de enriquecimiento con un hidrocarburo específico para el aislamiento, en nuestro propio trabajo se sacan conclusiones similares. Un experimento más completo en la misma línea ha sido realizado por --- Mckenna y Kallio (1964) utilizando 19 especies de los géneros - *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Nocardia* y *Mycobacterium*. En primer lugar estudian estos autores el efecto de la ramificación en relación con la posibilidad del ataque microbiano a las parafinas concluyendo que cuando aparece más de un grupo metilo sobre un átomo de carbono, particularmente si se trata del penúltimo de la cadena, el hidrocarburo es extraordinariamente resistente a la degradación. Por otra parte al crecer la cadena lateral, la dificultad aumenta y también si el sustituyente es una parafina cíclica. En otras experiencias, utilizando fenilalcanos, se demuestra igualmente que la inserción de un grupo metilo en la cadena lineal (1-fenildecano) dificulta considerablemente el ataque a la molécula; además tiene también un efecto considerable la longitud de dicha cadena lineal (fueron mucho menos utilizados 1-fenilundecano y 1-fenildodecano) y la posición del grupo fenilo (los 6 fenilalcanos fueron peor metabolizados).

Mucho más específico es el comportamiento frente a hidrocarburos gaseosos y aromáticos. Conviene sin embargo hacer hincapié aquí sobre el fenómeno ya citado de la cooxidación, Foster (1962), es decir, la oxidación de un sustrato que no se utiliza como fuente de carbono, en presencia de otro que sí puede ser utilizado. Este fenómeno parece estar muy extendido, y es importante tenerlo en cuenta cuando se estudia el metabolismo de mezclas complejas de hidrocarburos, como puede ser el gas-oil. Desde el punto de vista fisiológico, puede explicarse este hecho, teniendo en cuenta que la incapacidad para crecer sobre un determinado sustrato puede ser no sólo debida a la incapacidad de oxidarlo, sino también a la de utilizar los productos de su oxidación primaria. Se puede suponer también (apoyándose en hechos experimentales) una inhibición del crecimiento por la presencia de productos de cadena corta, derivados del metabolismo inicial. Ishikura (citado por Foster) ha demostrado la toxicidad de algunos de ellos en cultivos de bacterias, levaduras y hongos sobre medios sin hidrocarburos.

1.3. - Resumen de los principales mecanismos de ataque a hidrocarburos

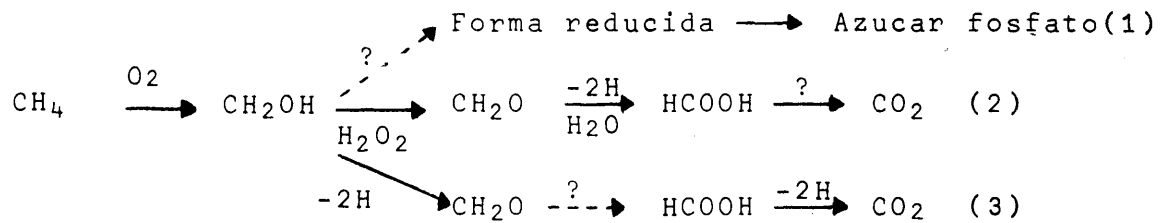
A continuación damos una idea sobre los mecanismos de mostrados o supuestos de ataque a los distintos tipos de hidrocarburos.

Teniendo en cuenta el sustrato, Humphrey (1967) separa 6 grupos bien definidos: a) metano; b) n-alcanos; c) isoalcanos; d) alquenos; e) cicloalcanos y f) aromáticos. Pasaremos revista a cada uno de ellos.

Metano

Se han sugerido 3 vías metabólicas para la oxidación bacteriana del metano Foster (1962), Kallio (1963). Todos los autores coinciden al parecer, en que la primera etapa del proceso sería la incorporación de oxígeno gaseoso para formar metanol; a partir de aquí, se admiten 3 posibilidades, aunque hay muchos puntos desconocidos.

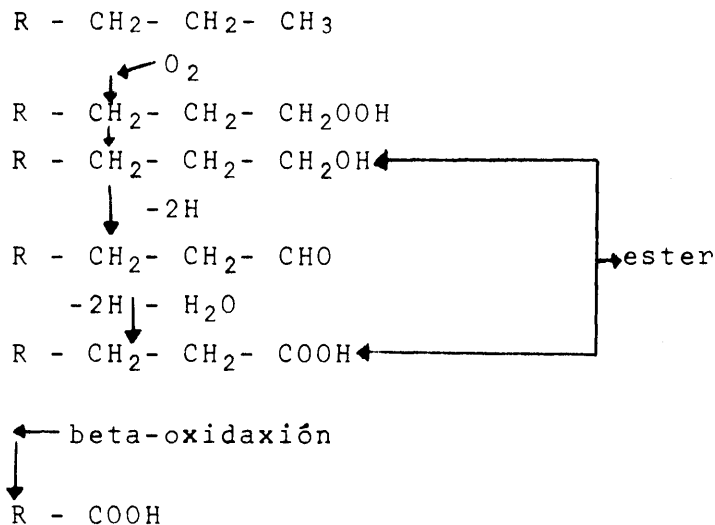
En esquema se puede resumir así:



La vía (2) supone un ataque peroxidativo del metanol - seguido de deshidrogenación del formaldehído. La (3) una deshidrogenación a formaldehído seguida de una oxidación a ácido fórmico y, finalmente, la intervención de una formicodeshidrogenasa para dar CO_2 . El otro camino (1) sería una incorporación de unidades C_1 reducidas, a un azúcar fosfato.

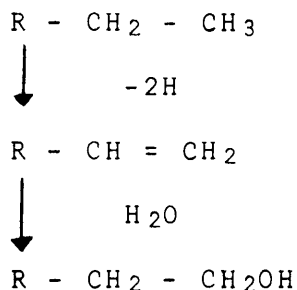
b) n-alcanos

Se han propuesto varios mecanismos para distintas especies microbianas. Stewart y Kallio (1959) observaron la incorporación de oxígeno molecular por hidroperoxidación; este producto es descompuesto para formar un alcohol primario que, finalmente, es oxidado al correspondiente ácido pasando por el aldehído:



El ácido graso sufriría el proceso de betaoxidación.

Senez y Azoulay (1961), han encontrado otro tipo de mecanismos que implica una deshidrogenación del alcano a alqueno-1 seguida de adición de agua al doble enlace para dar el alcohol primario:

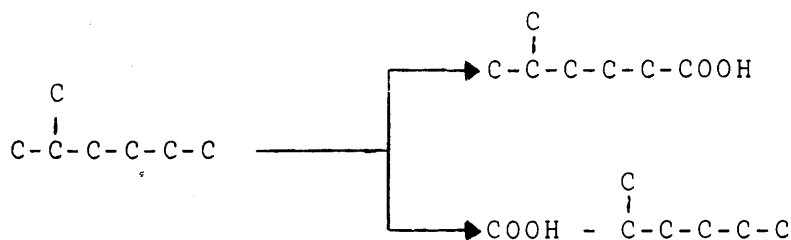


Foster y Leadbetter descubren además metilcetonas en casos de fermentación de alcanos de cadena corta ($\text{C}_3\text{-C}_5$). Para explicarlo, proponen un equilibrio de radicales libres entre los carbonos terminal y subterminal, ocurriendo la hidroperoxidación en uno de los dos átomos de carbono indiferentemente.

Finalmente, Alí Khan y Col (1963), observan una oxidación diterminal. Ocurre primero una oxidación monoterminal, -- probablemente por hidroperoxidación, seguida por una omegaoxidación; la rotura de la molécula tiene lugar por betaoxidación de cada extremo de la misma. Utilizando un inhibidor de la betaoxidación, como el acrilato, se pueden obtener en estos casos ácidos dicarboxílicos, probablemente interesantes desde el punto de vista industrial para la obtención de polimeros -- (Thijsse, 1963).

c) Isoalcanos

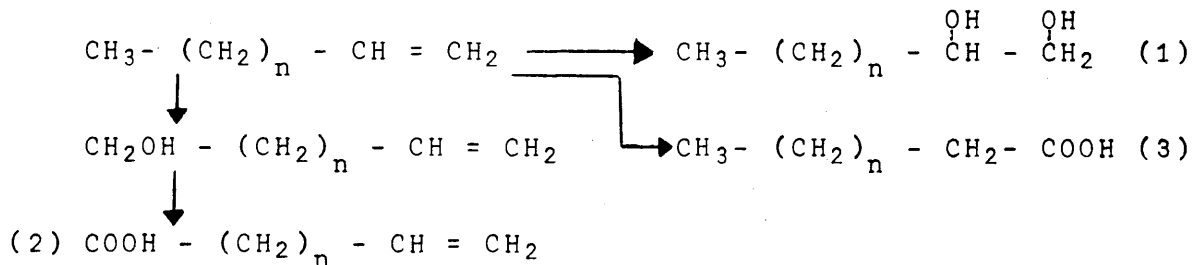
La oxidación de parafinas ramificadas está muy insuficientemente estudiada por ser, al parecer, un fenómeno menos extendido que el de las parafinas lineales. Como ya hemos indicado, la oxidación es menor cuantas menos ramificaciones haya en la molécula y también, cuanto más largas sean estas ramificaciones y más corta la cadena lineal que las soporta. Humphrey (1967) deduce de este hecho la explicación de que la gasolina de automóvil no sea metabolizada, cosa que, según nuestra experiencia, no es del todo cierta. Un trabajo interesante es el de Thijsse y Van der Linden (1961), con *Ps.aeruginosa* KSLA estirpe 473. Encuentran estos autores como resultado de la oxidación de 2-metilhexano, los ácidos 5-metilhexanoico y 2-metilhexanoico. Este trabajo parece indicar que la oxidación se realiza indistintamente por uno u otro de los extremos de la molécula:



No hemos encontrado en cambio, ningún trabajo que cite una oxidación diterminal de un isoalcano.

d) Alquenos

Las olefinas más frecuentemente investigadas fueron -alquenos-1. Para este tipo de compuestos Humphrey cita 3 posibles vías de degradación, siendo según este autor la (2) la más frecuentemente encontrada en bacterias:



El mecanismo (1) fue demostrado por Bruyn (1954, citado por Humphrey) para *Candida lipotilica*. El ataque en el extremo insaturado de la molécula (3) ha sido observado en algunos casos raros por Stewart y Col (1960).

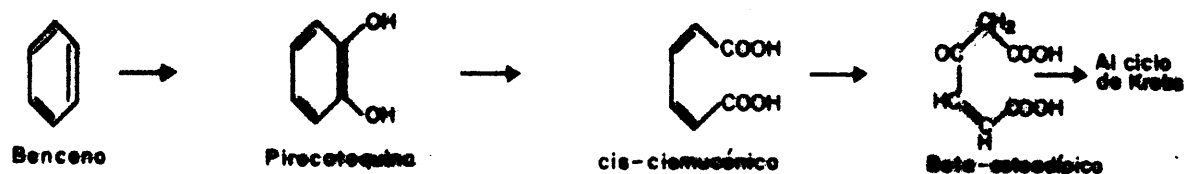
e) Cicloalcanos

Hasta hace muy poco, se consideraban productos resistentes a la oxidación bacteriana. Sin embargo, Ooyama y Foster (1965), trabajando con n-alcanos que servían para soportar el crecimiento comprobaron la oxidación simultánea (co-oxidación) de una serie de hidrocarburos cíclicos. El producto de la oxidación parece ser una cetona cíclica, pero se desconocen los mecanismos intermedios. Las monoolefinas cíclicas como ciclohexeno, son transformadas también en las cetonas correspondientes.

f) Aromáticos

Se conocen varias vías metabólicas diferentes para la oxidación de los hidrocarburos aromáticos. Distinguiremos la rotura del anillo bencénico simple y la de compuestos con más de un anillo.

1) Benceno: El método más difundido de rotura del anillo bencénico simple se esquematiza a continuación:

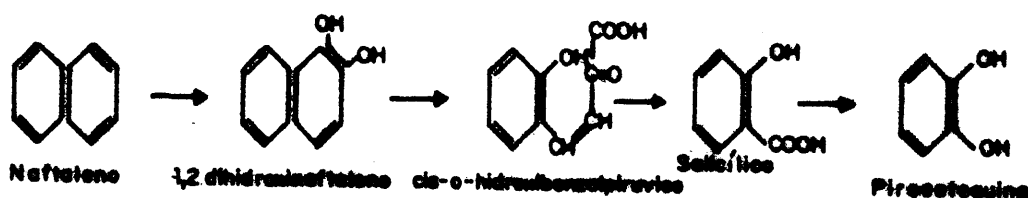


Es decir una oxidación a ortodifenol como primer paso.

Treccani (1965), cita otros mecanismos posibles que no vamos a resumir.

Los alquilbencenos con cadena lateral de más de dos -- átomos de carbono son oxidados a los correspondientes ácidos -- grasos bencilsustituídos, siendo posteriormente eliminada la cadena lateral por un proceso de beta-oxidación. Para las cade nas sustituyentes de número par de carbonos, se suele acumular en el medio ácido fenilacético (o bien o-hidroxifenilacético) mientras que para las cadenas de número impar se demuestra la producción intermedia de ácido cinnámico ó benzóico.

2) Anillos bencénicos complejos: Para los anillos complejos, las vías degradativas siguen caminos similares:



Para el naftaleno se pasa por el 1-2 dihidroxiderivado encontrándose como producto intermedio, el ácido salicílico y siguiendo a partir de la pirocatequina, por la vía común.

Rutas metabólicas similares se demuestran para otros -- compuestos como antraceno y fenantreno. La investigación de -- los metabolitos intermedios de la oxidación de anillos aromáti cos, tendrá un importante papel para la obtención microbiológi ca de algunos compuestos de interés en la industria de los po límeros.

1.4. - Justificación del trabajo

1.4.1. Justificación del tema

Después de consultada la bibliografía sobre fermenta-- ción de hidrocarburos nos decidimos a emprender un estudio sis temático de los productos extracelulares de degradación bacte riana del gas-oil, por haber notado una laguna de información en este aspecto particular que, por otra parte, es de un gran interés teórico y práctico.

En primer lugar, los estudios realizados sobre fermentación del gas-oil son escasos y sobre todo, muy concretos en cuanto al tipo de microorganismos utilizados. Por una parte, - se da preferencia en general, al cultivo de levaduras sobre el de bacterias, probablemente porque desde un punto de vista eco nómico, las primeras son más rentables para la obtención de -- masa celular, y además la separación de las fases en un cultivo de levaduras es más fácil. Por otra parte, no se han hecho trabajos de tipo sistemático empleando varios microorganismos por separado, sino que se cultivan, bien un determinado microor ganismo conocido, bien una mezcla natural de ellos sin hacer - un estudio sistemático.

En el presente trabajo, que abarca un número suficientemente elevado de géneros y especies diferentes nos propone-- mos observar, en las mismas condiciones de cultivo y con el -- mismo hidrocarburo como sustrato, los productos de oxidación - que se acumulan en la fracción extracelular liposoluble del me dio de cultivo.

Tampoco son frecuentes en la bibliografía trabajos en los que se utilicen mezclas complejas de hidrocarburos, como - puede ser un gas-oil. Ello es lógico, puesto que las dificulta des del estudio se agravan particularmente en este tipo de pro ductos. Sin embargo desde un punto de vista industrial, son és tos los sustratos más utilizables, en cuanto que son los más - económicos, y los que en la práctica se emplean ya en procesos fermentativos a es cala industrial.

Como por otro lado, se puede asegurar, que los resulta dos de la oxidación de una mezcla de hidrocarburos heterogé--- neos, no se puede deducir estudiando cada uno de ellos por se-- parado, el estudio de la oxidación del conjunto es de gran in-- terés. Podemos dar por lo menos, tres razones que confirman lo anterior: 1) en una mezcla de hidrocarburos se utilizarán pre-- ferentemente los más fácilmente asimilables por los distintos tipos de microorganismos. 2) Los productos de la oxidación pue den reaccionar con otros existentes en la mezcla y 3) los fenó menos de co-oxidación solo se producen cuando hay, al menos, - dos tipos de sustratos, uno utilizable para el crecimiento y - otro oxidable pero no utilizable como sustrato alimenticio.

Nuestro trabajo va pues encaminado, a dilucidar el ti-- po de hidrocarburo utilizado preferentemente cuando hay más de uno en el medio, posibles oxidaciones de hidrocarburos presen-- tes y no utilizables por separado, y productos de la oxidación que se acumulan en los medios de cultivo en las condiciones em pleadas por nosotros. Todo ello para un elevado número de bac-- terias de especies distintas, y lo más representativo posible de los microorganismos que utilizan hidrocarburos.

Necesariamente el trabajo profundizará más en el aspec to sistemático de la fermentación, que en el puramente bioquí-- mico, haciéndose más hincapié en las especies distintas que ac túan sobre el gas-oil y en el resultado final de los procesos, que en los distintos mecanismos de ataque. Insistiremos más en el análisis funcional de los productos de oxidación, que en --

averiguar con exactitud de qué producto se trata.

Sin embargo, dada la complejidad química del gas-oil, hemos hecho algunos fraccionamientos, con el objeto de simplificar el trabajo, aunque sin perder nunca de vista nuestra -- idea original. Estos fraccionamientos van encaminados además, a conocer la composición del producto del que partimos, facilitándonos de esta manera el análisis del mismo por espectros copia infrarroja. Muchas bandas de asignación dudosa en el espectro del gas-oil completo, pudieron ser explicadas teniendo en cuenta la fracción en que aparecían.

1.4.2. Justificación de las técnicas

En cuanto al material biológico empleado, nos pareció de más utilidad aislar estirpes naturales que emplearlas de colección, dado que se trata de un estudio sistemático. Las técnicas de enriquecimiento están para ello suficientemente justificadas por la literatura y la experiencia. Por la razón anterior, preparamos muchos medios diferentes variando la --- fuente única de carbono en cada caso, con objeto de obtener estirpes capaces de atacar una gama amplia de productos derivados del petróleo.

La cromatografía de columna, como queda demostrado a lo largo del trabajo, resulta ser de gran precisión en la separación de fracciones, siendo un método que además, permite obtener cantidades suficientemente grandes para hacer después los cultivos. Hay que tener en cuenta, que las diferentes --- fracciones no son igualmente abundantes y que, por tanto, hay que partir de una gran cantidad del producto completo, para conseguir la suficiente, de algunas de sus fracciones.

El análisis de los productos del metabolismo, se realiza utilizando la espectroscopía infrarroja. Las ventajas de este método, para la aplicación concreta que le damos, son evidentes: en primer lugar, las exigencias mínimas de muestra, cosa que es absolutamente imprescindible, porque como hemos observado en las experiencias previas, la cantidad de hidrocarburo utilizable en el cultivo debe ser necesariamente escasa para obtener buenos crecimientos; además, aún siendo relativamente grandes las concentraciones de hidrocarburo, son en cambio muy pequeñas las de los productos de oxidación que aparecen en los cultivos.

Por otra parte, estas técnicas están especialmente indicadas, para el estudio analítico de hidrocarburos siendo -- los líquidos, además, de muy fácil manejo.

El hecho de ser sustancias hidrófobas, nos permitió utilizar células de espesor fijo de ClN_a , lo que representa una gran ventaja por ser el método perfectamente cuantitativo y, comparables en todos los casos, los espectros.

II - MATERIAL Y METODOS

2.1. - Métodos bacteriológicos

2.1.1. Aislamiento

Los métodos empleados en el aislamiento del material biológico, fueron los habituales en las técnicas de enriquecimiento. Se partió primero de una muestra de tierra normal de labranza, y posteriormente utilizamos en experiencias del mismo tipo, tierra obtenida de los alrededores de una bomba de gas-oil, con la que conseguimos mejores resultados.

Con todas las muestras se procedió a hacer diluciones en medio salino (9 grs de ClNa por litro de agua destilada) es térril hasta la dilución 10^{-5} , empleándose un gramo de tierra. El medio base utilizado en la técnica de enriquecimiento es el siguiente:

	PO ₄ H (NH ₄) ₂	2 grs
<u>Medio A</u>	PO ₄ HK ₂	1 gr
	SO ₄ Mg. 7H ₂ O	0,2 grs
	ClNa	5 grs
	Petróleo bruto (crudo Hontomin)	20 mls
	Agua destilada	1000 mls

Ajustar pH = 7 y solidificar con agar al 15/oo, p/v.

Después de adicionar el agar se añade el petróleo y se homogeiniza en batidora de laboratorio durante 5 minutos. Se reparte en tubos y se esteriliza a 120°C durante 20 minutos. A

la hora de repartirlo en las placas, se mantienen éstas estériles sobre un paño húmedo y se vierte sobre ellas el agar agitando previamente los tubos. El medio se echa a 42°C y se mezcla perfectamente con el inóculo quedando casi inmediatamente solidificado con lo que se mantiene la emulsión conseguida. El agar contribuye a mantener dicha emulsión. El medio queda homogéneo y las colonias se destacan claramente sobre él.

Posteriormente, a la vista de los resultados de unas pruebas previas de crecimiento se modificó el medio anterior de la siguiente forma:

	PO ₄ HK ₂	1	gr
	SO ₄ Mg	7H ₂ O	0,2 grs
	ClNa	5	grs
<u>Medio B</u>	ClNH ₄	5	grs
	Agua destilada	1000	mls
	Agar	15	grs
	pH =	7,2		
	Sol. de oligoelementos	1	ml

La fuente de nitrógeno, resultó ser la más adecuada, hecho que ya había sido comprobado por Shiio y Otsaka (1963).

El mismo medio anterior se utilizó en todas las experiencias de aislamiento, variando solo la fuente única de carbono. Se emplearon con este objeto sucesivamente, gas-oil, parafina, queroseno, tolueno, benceno y xileno.

Finalmente se hicieron también experiencias, utilizando un medio sólido con asfalto como única fuente de carbono. El producto empleado fue Asfalto Rio Gulf de 120 pen. Se realizaron dos experiencias, una en la que se conseguía una emulsión con bentonita sódica y la otra con agar al 15/oo, siendo ésta segunda la que dió resultados positivos, al aislarse en ella dos estirpes. El medio se preparó fundiendo el asfalto en un crisol y añadiendo poco a poco el medio salino (medio B) -- con agar hasta la cantidad que pudo admitir sin romperse la emulsión. Las cantidades de las dos fases mantienen aproximadamente la proporción igual a la de otros medios.

Una vez aisladas las colonias, y por estar frecuentemente las placas invadidas de mohos, se hace en todos los casos una siembra en la placa de agar caldo común, para separar por estría posibles contaminantes. Al mismo tiempo, se estudia al microscopio la pureza de los distintos cultivos.

De la tierra de labranza se aislaron 10 estirpes. De -

la impregnada de gas-oil se separaron 24 y, finalmente, en una prueba realizada con tierra procedente de una gasolinera donde estaba sometida a la presencia de gasolina, gas-oil y aceites lubricantes se aislaron 10 nuevas estirpes. El tipo de hidrocarburo empleado como fuente de carbono en la separación de cada una de las especies, está indicado más adelante en los esquemas de clasificación.

2.1.2. - Medios de cultivo

Una vez aisladas las especies utilizadas en el trabajo se mantienen en colección en agar-caldo común, en tubos inclinados en cámara fría, resemebrándose cada dos meses y manteniéndose por duplicado. Una de estas colecciones se utiliza en los cultivos mientras la otra queda solamente para la resiembra.

Las pruebas se realizan inoculando a partir de caldo común o de medio de Koser.

Los cultivos en hidrocarburos se hicieron utilizando el medio de sales citado anteriormente (medio B).

Para las pruebas previas de selectividad de hidrocarburos, las condiciones empleadas fueron las siguientes:

- Matraces Erlenmeyers de 150 cc con 20 ml de medio
- 20 ml de hidrocarburo por litro de medio salino
- Agitación: 150 rpm
- Temperatura: 26°C
- pH: 7,2
- Tiempo de incubación: hasta 22 días

Para hidrocarburos sólidos, las cantidades utilizadas son sólo aproximadas.

En los cultivos en pentadecano y tetrametilpentadecano, las condiciones variaron en los siguientes puntos:

- Matraces Erlenmeyers de 150 cc con 30 ml de medio
- 0,2 ml de hidrocarburo por 30 ml de medio

Los cultivos en el resto de las pruebas, se hicieron en las condiciones siguientes:

- Matraces Erlenmeyers de 500 cc de capacidad con 50 ml de medio salino
- 4 ml de hidrocarburo por litro de medio salino
- Agitación 150 rpm
- Temperatura 26°C
- pH: 7,2
- Tiempo de incubación: 7 días

El inóculo fue de 4 ml de un cultivo en medio de caldo común de 48 horas, por litro de medio salino.

La cantidad de hidrocarburo utilizada en estas pruebas responde a un compromiso entre las necesidades de muestra para los espectros y el hecho, demostrado en las pruebas previas, de que valores de crecimiento son inversamente proporcionales a la cantidad de hidrocarburos presente en el medio. Esto es explicable, si se tiene en cuenta que el ataque bacteriano al hidrocarburo, no depende de la cantidad que haya en el medio, sino de la disponibilidad del mismo, y ésta aumenta con la superficie de contacto entre las dos fases, que a su vez depende de la emulsión lograda. Con esta proporción parece que los resultados son óptimos.

La velocidad de agitación, si no óptima, al menos es suficiente, siendo más práctica con el aparato utilizado en los cultivos. Se probaron también matraces con agitación magnética, pero éste método, sin producir resultados evidentemente mejores, tenía en cambio el inconveniente grande de exigir un aparato para cada cultivo.

Para obtener grandes masas de células, se empleó un aparato fermentador diseñado en laboratorio para este fin, cuya descripción se hace más adelante.

En este aparato, las condiciones de cultivo fueron las siguientes:

- Medio salino: 7 litros
- Hidrocarburo: 7 ml
- Temperatura: 26°C
- Aireación: 5 litros/minuto
- Agitación: 300 rpm
- Tiempo de incubación: entre 5 y 7 días

Como se puede observar, se disminuyó la proporción de hi

drocarburo a medio salino, con objeto de conseguir una oxidación más apreciable.

2.1.3. - Clasificación del material biológico

A las estirpes aisladas se les hicieron las pruebas morfológicas y bioquímicas siguientes:

A) Pruebas morfológicas

- Observación en vivo: se realiza entre las 24 y 48 horas

Forma

Tamaño

Movilidad

- Tinción de Gram. Se lleva a cabo a las 48 horas ó en cultivos más viejos según sea el crecimiento. Cuando se establece una comparación, se hace siempre con cultivos de la misma edad.

Forma: Pleomorfismo (variación de la forma con la edad)

Tinción propiamente dicha: G (+) ó G (-)

Tamaño

- Tinción de esporas

- Acido-alcohol resistencia. Para estirpes G (+)

B) Pruebas fisiológicas

- Medio líquido: caldo común

Crecimiento

Turbidez

Película

Sedimento

Producción de pigmentos

- 22
- Medio sólido: agar nutritivo

Crecimiento (3 a 8 días)

Forma de la colonia en placa y en tubo -
inclinado: superficie, contorno, bordes,
elevación, brillo

Pigmentación de la colonia

C) Pruebas bioquímicas

- Producción de indol (agua peptonada)
- Crecimiento en medio de Koser (citrato)
- Hidrólisis del almidón
- Reducción de nitratos a nitritos
- Producción de amoníaco
- Producción de SH₂ (agar-acetato de plomo)
- Fermentación de azúcares en medio líquido:

Xilosa

Glucosa

Lactosa

Sacarosa

Maltosa

Galactosa y

Manitol

- Oxidasa
- Catalasa
- Leche tornasol
- Utilización de hidrocarburos como fuente de carbono:

Gasolina

Gas-oil

Fuel-oil

Benceno

Xileno

Tolueno

Naftaleno

Antraceno

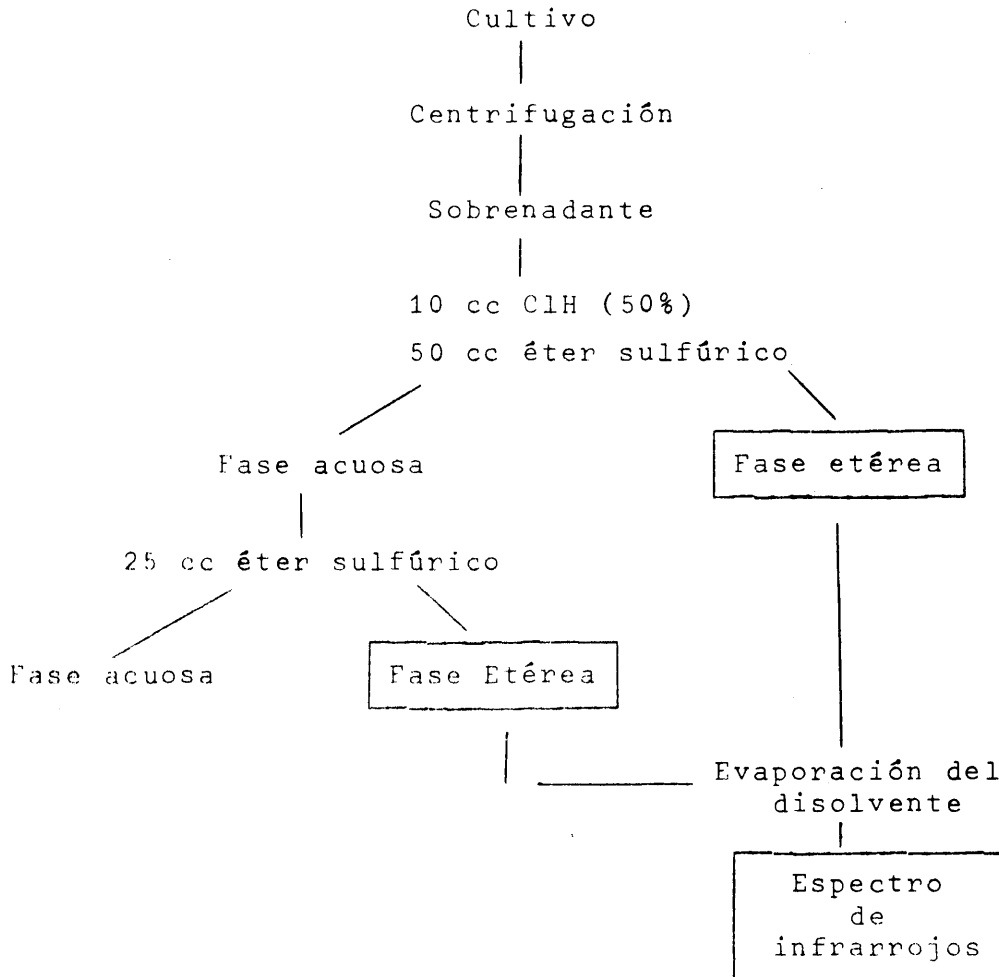
D) Medida del crecimiento

La medida del crecimiento se hizo por turbidimetría, después de haber extraído el resto del hidrocarburo no utilizado. En los controles se realiza también la extracción, siguiendo los mismos procedimientos. El resultado es sólo relativo y no tiene más que un valor comparativo, que es interesante sin embargo, en los casos en que se hace un estudio de crecimiento variando las condiciones de cultivo ó los tiempos de incubación.

2.2. - Otros métodos

2.2.1. - Extracción de los productos liposolubles del medio

Se procede al protocolo siguiente:



2.2.2. - Fraccionamiento en columna

La separación en fracciones de gas-oil original se realiza por cromatografía de adsorción en columna, utilizando un aparato de vidrio diseñado para esta función, y cuya descripción se hace más adelante.

Por este procedimiento se consiguen separar tres fracciones siguiendo el método descrito por Mair y Col (1957). Dicho método ha sido modificado y adaptado a nuestras posibilidades. La carga de la columna se hace con gel de sílice, que en el trabajo original era del tipo Davison Chemical Grade 912 de 28 a 200 mallas ASTM. En nuestra experiencia, se utilizó una mezcla de dos productos, uno de la casa Merck de 30 a 70 mallas y otro de Mallinkrodt de 100 a 200. Por desconocerse la granulometría del producto utilizado por Mair, pues no se cita en el trabajo, empleamos una proporción en la mezcla, de cuarenta partes del de Merck y 100 del de Mallinkrodt, quedando solamente sin cubrir la zona entre 70 y 100 mallas ASTM.

La carga se activa calentándola a 200°C durante 8 horas, según indican las técnicas cromatográficas. Una vez hecha esta operación, se procede al llenado de la columna de la forma siguiente: en la parte inferior se coloca un pequeño tapón de fibra de vidrio, después se llena con isooctano (2,2,4-trimetilpentano) aproximadamente hasta 2/3 del volumen total, y se va añadiendo en muy pequeñas cantidades la gel de sílice impregnada asimismo de este primer disolvente. Al mismo tiempo, la carga se va empaquetando con una varilla de vidrio con el extremo aplanado, eliminando cualquier burbuja de aire que se pueda formar. La llave inferior se conserva abierta durante la operación y el nivel del eluyente se mantiene siempre muy por encima del de la carga para evitar que ésta se deseque.

En total utilizamos 360 grs. de gel de sílice y 325 cc de isooctano. Una vez completado el relleno, se coloca de nuevo una bola de lana de vidrio, para evitar que el lecho sea removido al añadir los distintos eluyentes, y se coloca el depósito suplementario.

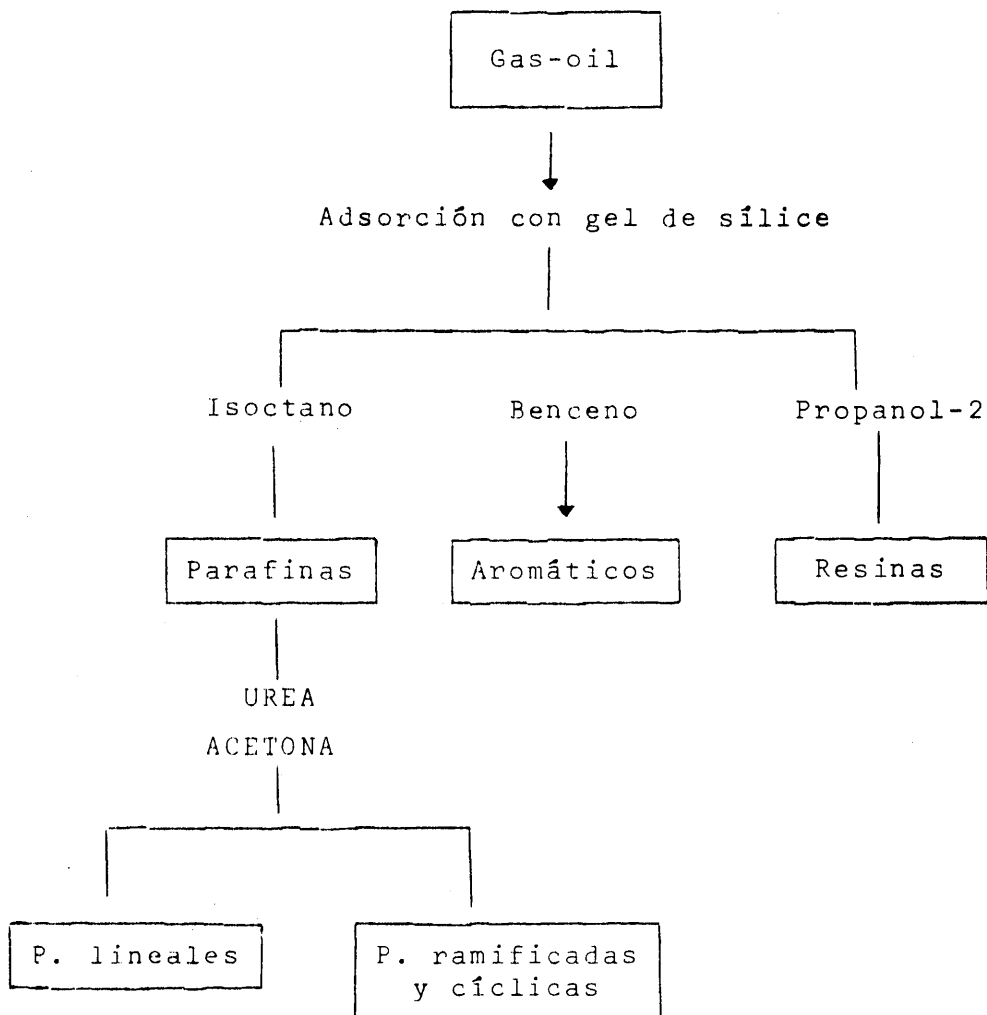
A través de esta columna se pasaron 162,5 ml del gas-oil utilizado en nuestro trabajo, en forma de mezcla equimolar con isooctano, el primer eluyente. A continuación se añadieron 1500 ml de propanol - 2, tomándose muestras a la salida cada 100 ml. Se pasaron después un total de 1100 ml de benceno y, sucesivamente, 1500 ml de propanol-2. En ambos casos se tomaron muestras de 150 en 150 ml. La velocidad de salida osciló entre 50 y 75 ml por hora.

El desarrollo de la cromatografía se puede seguir en un principio, iluminando la columna con una lámpara de rayos ultravioletas, que dan una fluorescencia característica y permiten conocer la posición del frente.

Sin embargo este método, se presta a confusiones y es poco preciso por lo que se utilizó la medida del índice de refracción a 20°C (n_D^{20}) para cada muestra extraída. Los valores para los distintos experimentos, se relacionan en el capítulo de resultados.

Este, que era el procedimiento seguido en el trabajo de Mair, resultó un método no del todo correcto, por lo que en pruebas posteriores se utiliza como norma para el desarrollo de la cromatografía, el espectro infrarrojo de la muestra extraída. Se puede utilizar la banda a 1600 cm^{-1} como testigo para determinar la presencia de anillos aromáticos. La separación de las fracciones bencénica y alcohólica no presenta el mismo problema, pues se puede añadir un exceso de benceno sin arrastrar la última fracción.

En esquema el fraccionamiento que se realizó fue así:



2.2.3. - Cromatografía de los productos del metabolismo

Para las estirpes de mayor crecimiento, se hicieron unas pruebas con el objeto de separar después del cultivo, las mismas fracciones anteriores, una vez metabolizadas por el microorganismo. Para ello, los cultivos en esta fase del trabajo se hicieron en los fermentadores, utilizando una cantidad de 7 ml de hidrocarburo para 7 l de medio de cultivo.

Una vez extraído el resto de hidrocarburo, se utiliza para su fraccionamiento, una columna de cromatografía de características similares a la anterior, pero de dimensiones más reducidas (ver más adelante su descripción) en cuyo desarrollo se eligieron las siguientes constantes:

- Carga de gel de sílice (del mismo tipo que en el caso anterior) = 64,5 gr
- 5 ml de hidrocarburo en mezcla equivolúmetrica con 2,2,4 trimetilpentano.

Las cantidades de los distintos eluyentes fueron:

150 cc de isooctano
250 cc de benceno
175 cc de propanol-2

De esta forma, se separan las tres fracciones anteriores en los casos en que se empleó gas-oil ligero de vacío y solamente la primera (fracción parafínica) y la última (fracción de resinas) cuando se cultivó en la fracción parafínica. Los resultados de estos fraccionamientos se detallan en el siguiente capítulo.

Las distintas fracciones se someten a destilación en un aparato giratorio con vacío y baño de aceite termostaticado. -- Las primeras pruebas se realizaron en el mismo aparato con atmósfera de nitrógeno, prescindiéndose posteriormente de esta circunstancia al comprobarse que era innecesario. Las últimas trazas de disolvente se eliminaron manteniendo la muestra en estufa a 120° C durante 4 horas, comprobándose previamente que no se producía ninguna alteración en ellas.

2.2.4. - Separación de parafinas lineales y parafinas ramificadas y cíclicas

La fracción parafínica obtenida de la columna de cromatografía, se somete a un segundo fraccionamiento por formación de

aductos con urea según la técnica utilizada por Mair y Beveridge (1957) con objeto de separar parafinas lineales de parafinas ramificadas y cíclicas. El método seguido es el siguiente:

- Se añaden lentamente 45 grs de urea a una mezcla de - 200 cc de acetona y 50 cc de la mezcla de parafinas.
- Se agitan fuertemente durante una hora en un agitador magnético.
- Se centrifuga 20 minutos a 3000 rpm
- Se añaden al centrifugado 200 cc de acetona saturada con urea y se agita de nuevo durante 15 minutos.
- Se vuelve a centrifugar en las condiciones anteriores.
- El centrifugado se lava con agua hirviendo varias veces y se separan en embudo de decantación las n-parafinas.
- De los sobrenadantes, se extraen las parafinas ramificadas y cíclicas por sucesivos lavados con agua fría y posterior decantación.

El proceso se repite varias veces, consiguiéndose con ello una separación casi completa (ver capítulo de resultados). En los distintos pasos se comprueba por espectroscopía I R el desarrollo de la operación. En esquema es como sigue:

n - parafinas + parafinas ramificadas y cíclicas

Urea
Acetona

Agitar

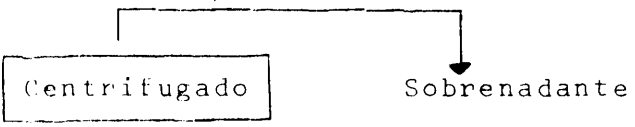
Centrifugar



Urea
Acetona

Agitar brevemente

Centrifugar



Agua caliente

Decantación

n - parafinas

Fase acuosa

REPETIR

(2) n - parafinas

Agua fría

Decantación

fase acuosa

Parafinas
Ramificadas
y cíclicas

REPETIR

Parafinas
ramificadas
y cíclicas

2.2.5. - Espectroscopía infrarroja

Para realizar los espectros se utiliza en la mayor parte de los casos, una célula de espesor fijo de cristales de cloruro sódico de 0,1 mm. Cuando la muestra es demasiado pastosa, se calienta previamente bajo una lámpara para facilitar el llenado. Para su limpieza se emplea tetracloruro de carbono, evaporándose después con una bomba de vacío.

Para ciertas bandas, en que la absorbancia es total, se emplea una célula desmontable, colocándose una gota de la muestra entre cristales.

En ocasiones en que interesaba utilizar el producto disuelto en tetracloruro de carbono, se emplearon dos células de espesor fijo de 1 mm, una de ellas con el disolvente en el haz de compensación.

Finalmente, se han empleado dos células de cuarzo de 1 cm de espesor.

La zona espectral barrida fue, en todos los casos, desde 4000 hasta 625 cm^{-1} , siendo impuesto éste último límite por la propia célula de ClNa .

2.3. - Aparatos

- Estufa de cultivo en agitación "Psychrotherm", New Brunswick Scientific Co.
- Incubador Orbital Gallenkamps
- Estufa de desecación de 20 a 250° C
- Agitador magnético de 500 a 1000 rpm
- Equipo Millipore de filtración con membranas de 0,8 0,45 y 1,2 micras de tipo AA.
- Espectrocolorímetro de la casa V.E.B. Karl Zeiss de Jena

- Centrífuga MSE Super Minor Sartorius
- Balanzas monoplato Sartorius modelo 2442 y 2250
- pH-metro de la casa L.Pusl. de Munich
- Aparato de destilación "Rotavapor" Afora, con cazo - de aceite termostatzado de 50 a 200° C.
- Homogeneizadora de laboratorio modelo Atomix
- Espectrógrafo de infrarrojos modelo "Infracord" 457 Perkin-Elmer.
- Refractómetro de Abbé de la casa Zeiss termostatzado a 20° C.
- Columnas de cromatografía.
- Fermentadores

Describiremos con detalle estos dos últimos aparatos, - por haber sido diseñados especialmente para este trabajo.

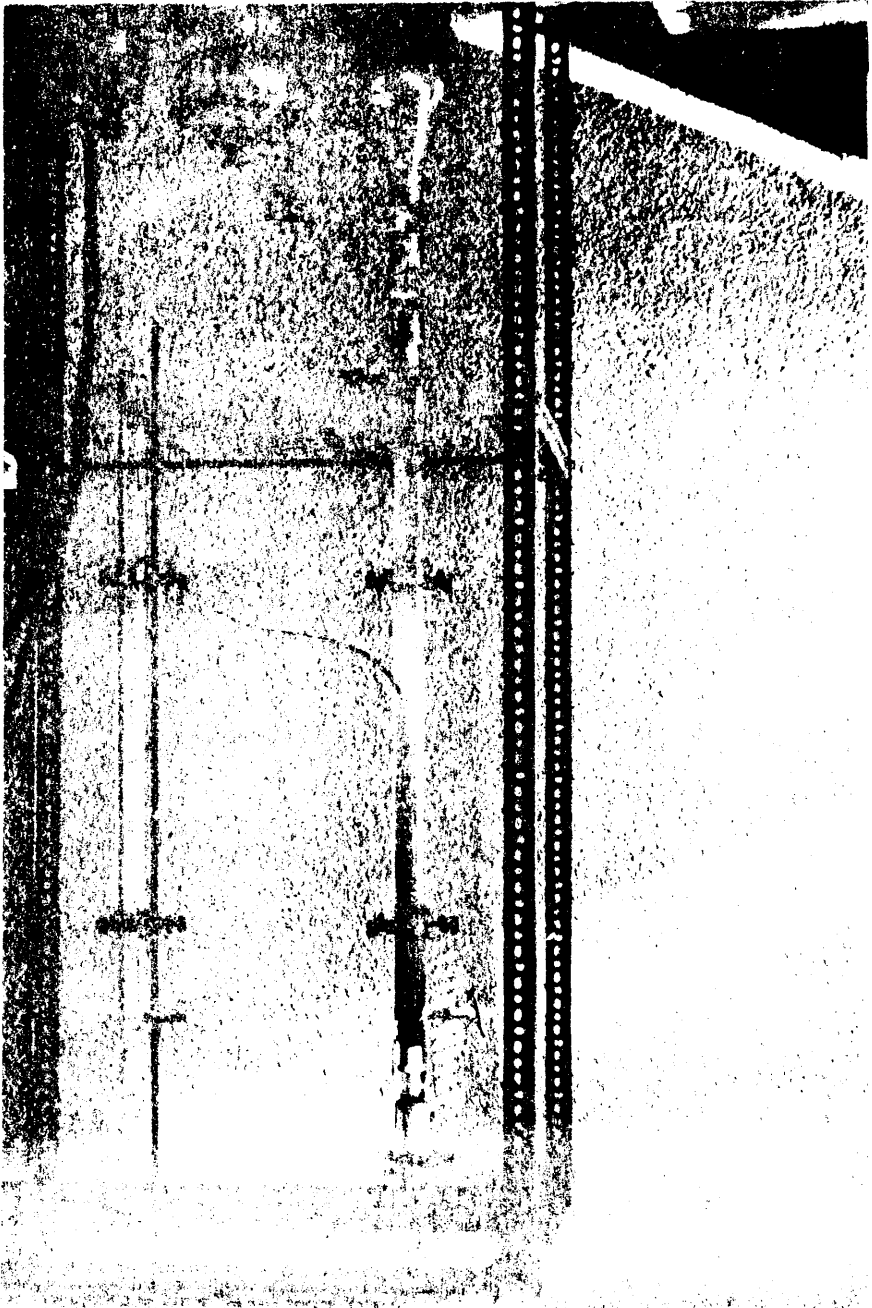
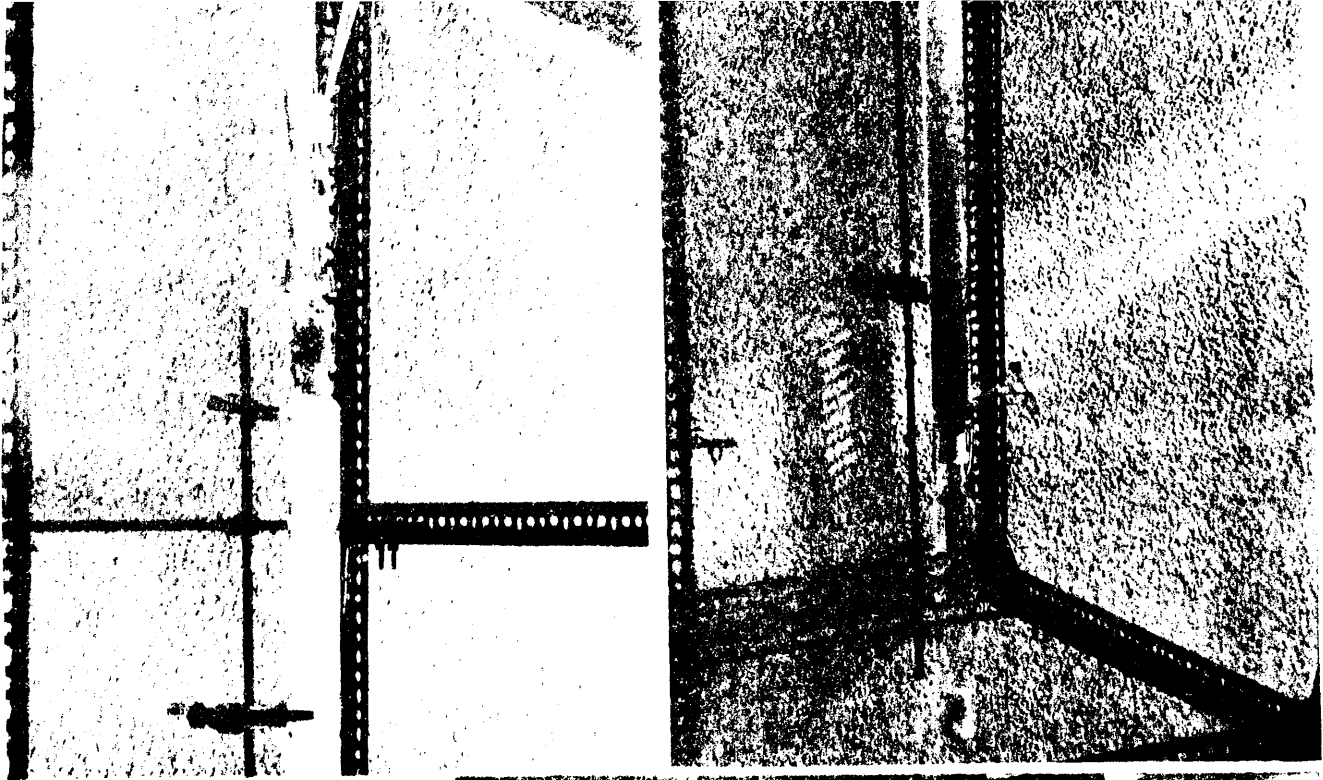
2.3.1. - Columnas de cromatografía

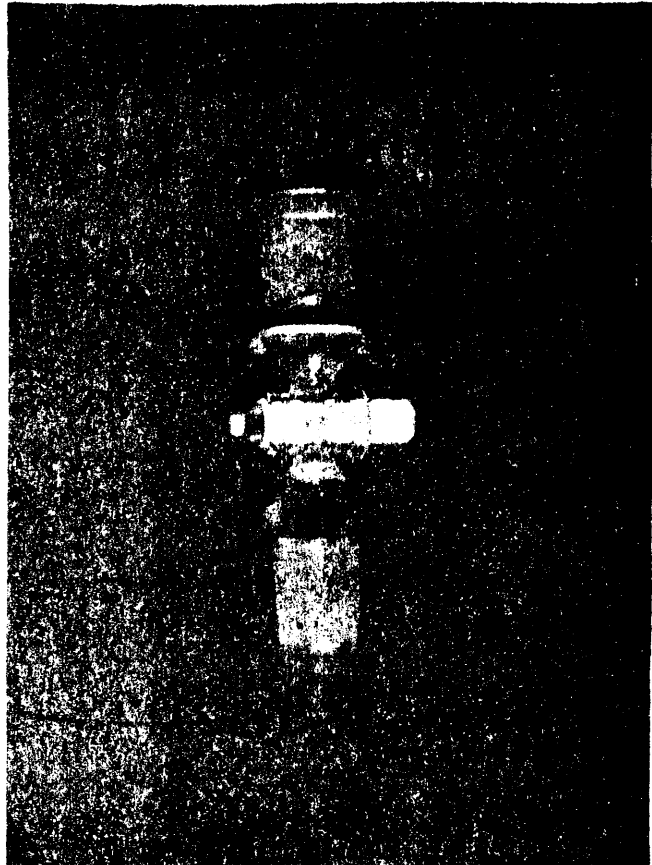
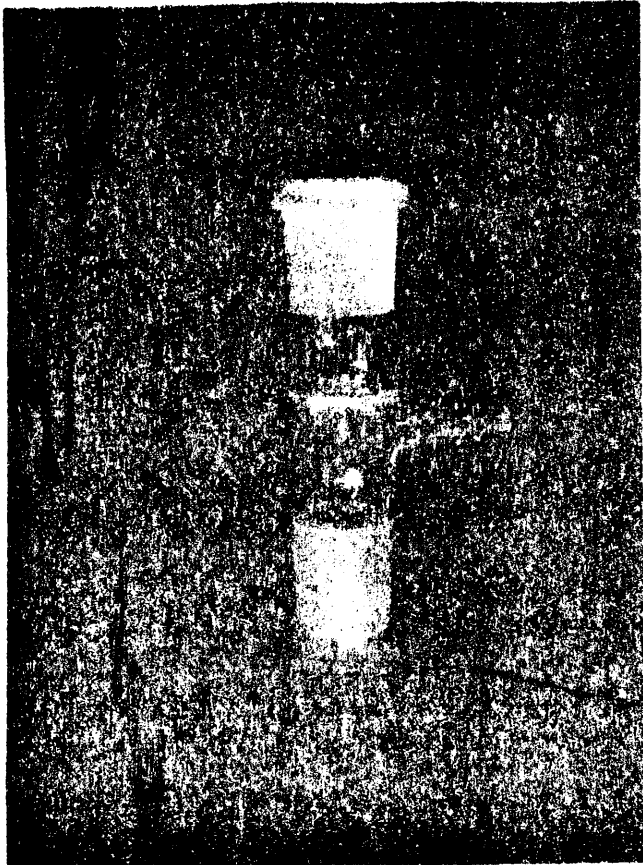
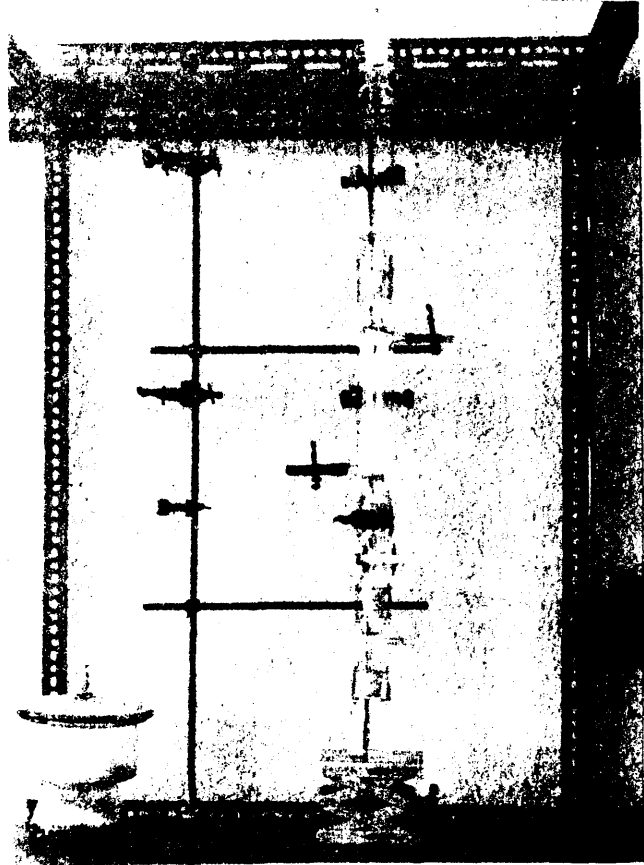
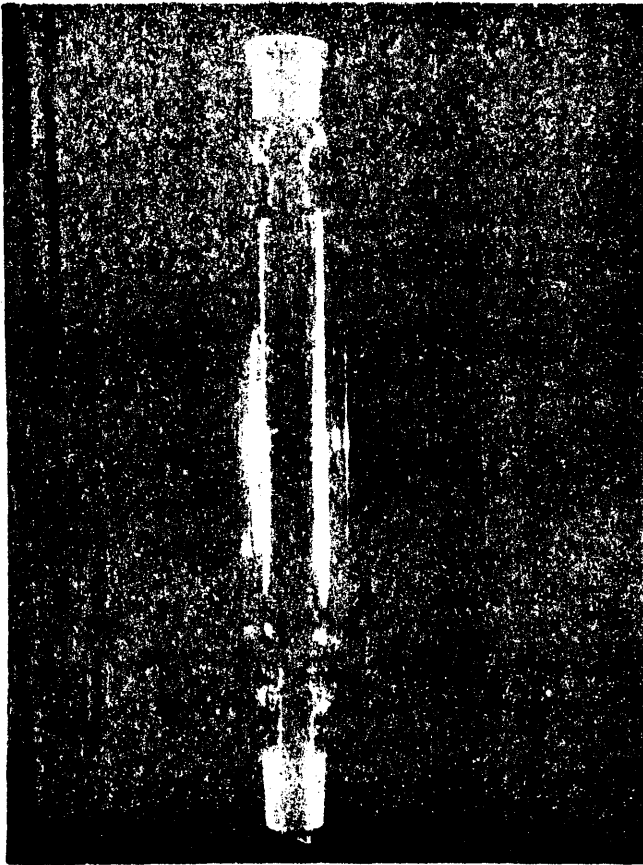
Se utilizaron dos tipos de columnas de cromatografía. - Las características son:

(1) Cuerpo principal:

Longitud total	90	cm
Diámetro interior	2	cms
Diámetro total	5	cms

- Suplemento para dar carga de 20 cms de longitud y - 5 cms de diámetro interior.
- Pieza de salida con llave de teflón, dos bocas esmeriladas y un filtro incorporado de vidrio fritado de porosidad número 3 máxima que permite utilizar el lecho.





- Pieza con salida lateral con bocas esmeriladas
- Matraz graduado boca esmerilada para recoger fracciones

(2) Las mismas piezas del anterior salvo el cuerpo principal, cuyas dimensiones son:

Longitud total	20 cms
Diámetro interior	2 cms
Diámetro total	5 cms

2.3.2. - Fermentadores

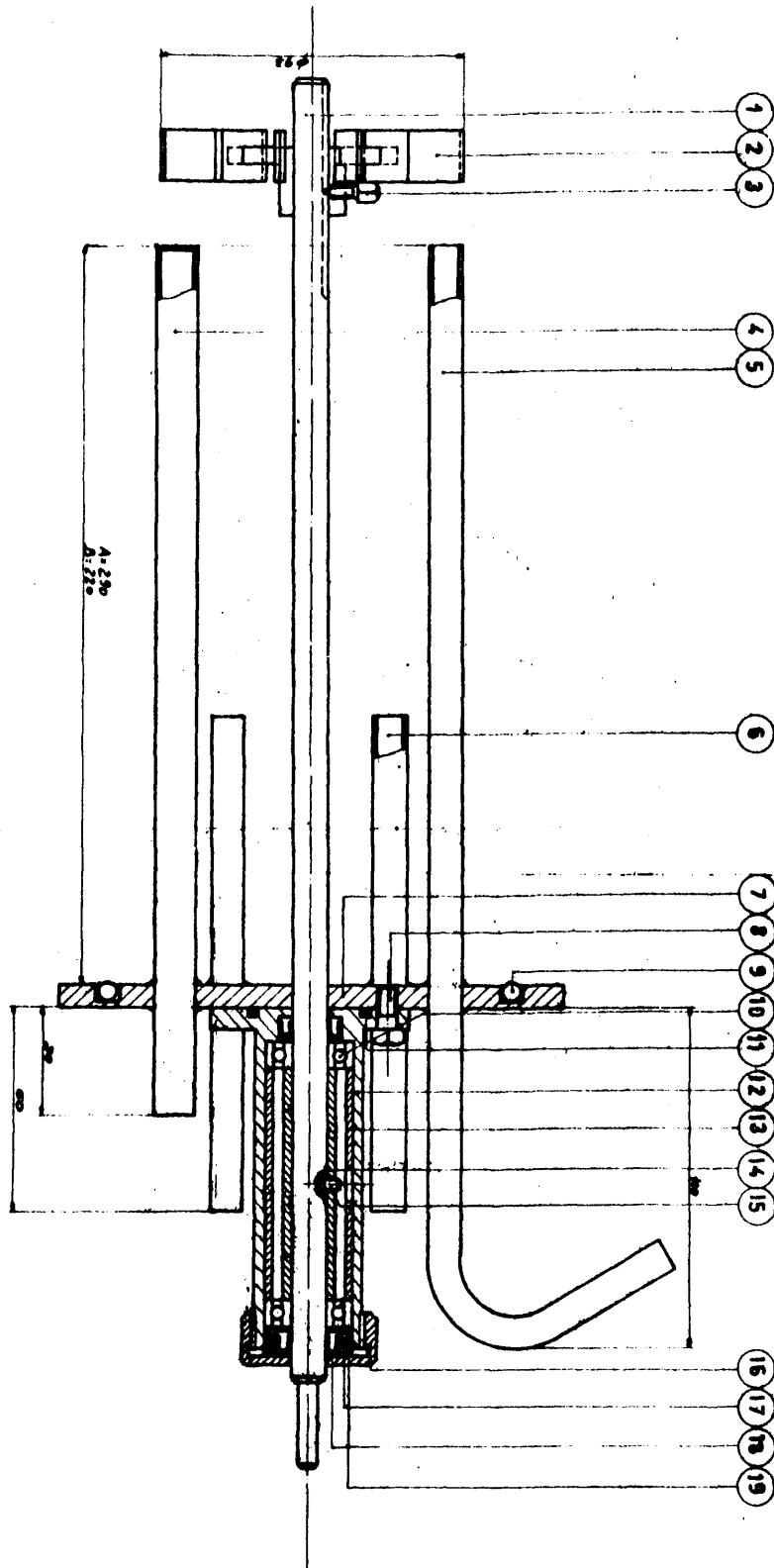
Las unidades de fermentación utilizadas constan de las siguientes partes (véase fotografías):

- 1) Reactores esféricos de 10 y 20 litros de capacidad - con boca de 10 cms de diámetro y superficie esmerilada. Van colocados sobre un soporte metálico con una pinza articulada de apoyo.
- 2) Cabeza de acero inoxidable con anillo tórico de cierre y tornillos de sujeción (ver el esquema). En esta cabeza hay 5 entradas, respectivamente, para inóculos, adiciones, toma de muestras, salida y entrada de aire y 1 tubo cerrado en su extremo inferior, - donde va incorporada la "pluma" del termostato. Este último se llena de parafina líquida.

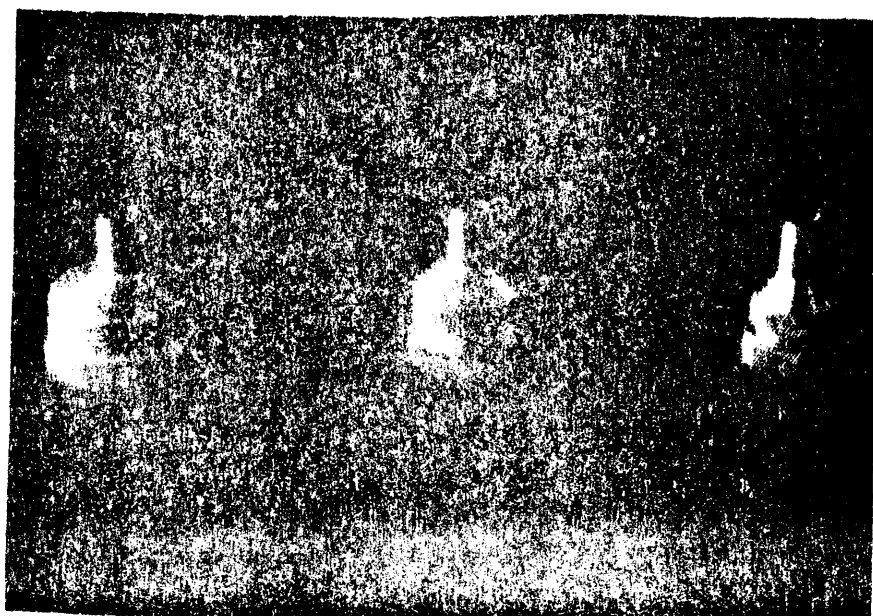
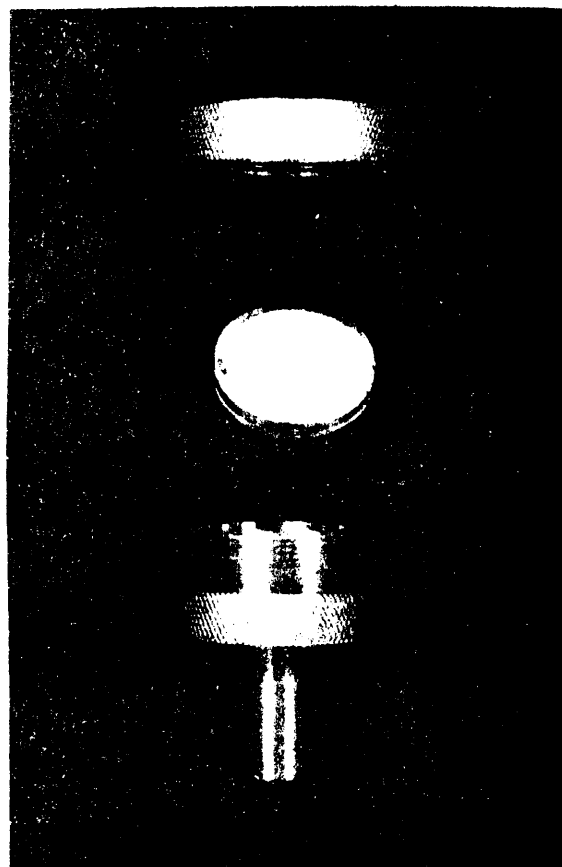
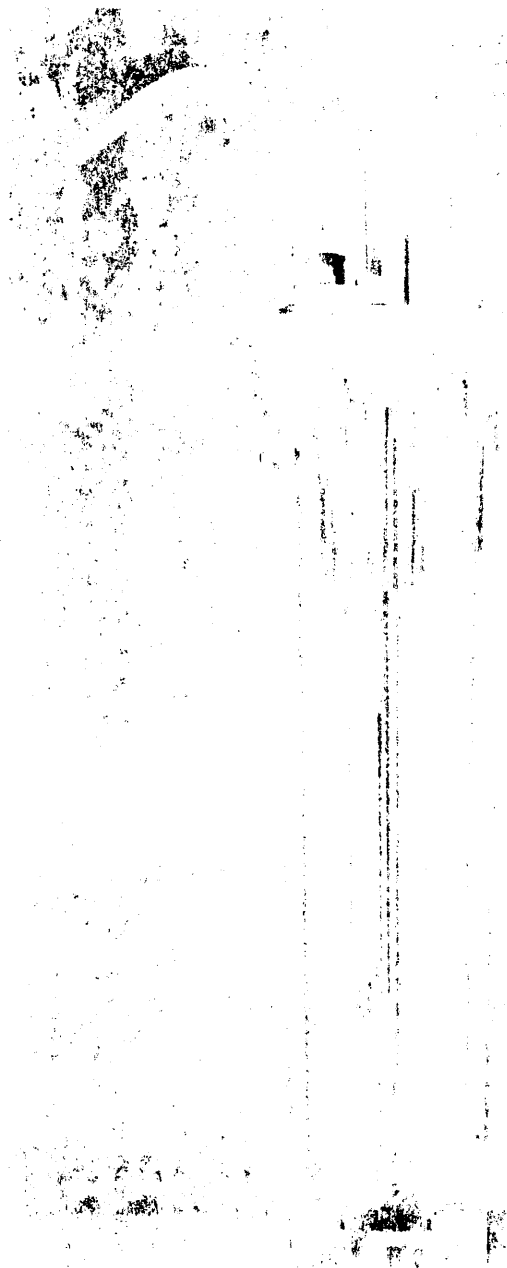
El eje de giro va incorporado en un sistema hermético con anillos tóricos y retenes y acaba en el interior del fermentador en una rueda de paletas desplazable a lo largo del eje.

El tubo de entrada de aire acaba roscado, para colocar en su extremo unos soportes para filtros de vidrio fritado, pudiéndose intercambiar varios de distinta porosidad. Estas piezas no están dibujadas en el plano por haberse añadido posteriormente.

Dicho plano, se corrigió también colocándose unas contratuercas en la parte inferior de la cabeza, en los tornillos que sujetan el soporte del eje de giro, por haberse comprobado fugas en las pruebas iniciales. Tampoco los tornillos de sujeción están señalados en el plano; estos tornillos permiten la esterilización en el autoclave del aparato completo cosa que se hace con el medio incluido.



- | | |
|---------------------|----------------------------|
| 1 - Eje | 11 - Anillo tórico |
| 2 - Turbina | 12 - Cuerpo |
| 3 - Tornillo | 13 - Distanciator |
| 4 - Tubo termostato | 14 - Distanciator |
| 5 - Tubo muestras | 15 - Prisionero |
| 6 - Tubos | 16 - Tuercas |
| 7 - Tapa | 17 - Casquillo porta retén |
| 8 - Tornillo | 18 - Retén |
| 9 - Anillo tórico | 19 - Anillo tórico |
| 10 - Resamiento | |



En el matraz reactor se colocaron unas crestas de vidrio a modo de cortacorrientes, que van pegadas a la superficie interior mediante un pegamento inerte e inatacable que además resiste la temperatura de esterilización (Silastic RTV). De esta forma se evita completamente el vórtice en la agitación.

Montaje y accesorios:

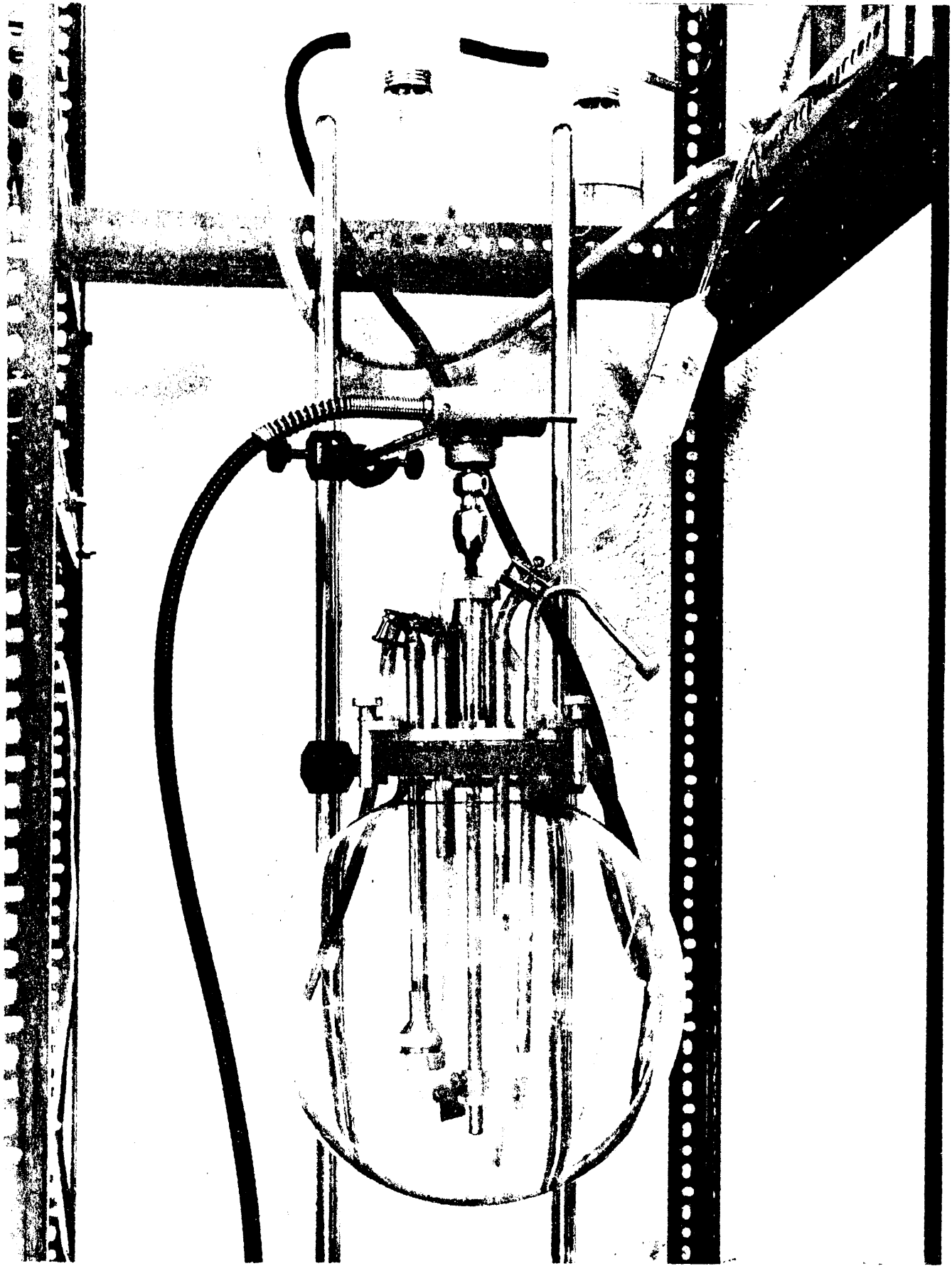
a) Aireación: El aire está suministrado por un motor trifásico de 3/4 H.P. de la casa Siemens y una bomba compresora Airco. Ambos elementos están montados sobre un calderín de 70 litros, con un presostato regulado entre 3 y 5,2 atmósferas. El equipo completo lleva también un cortafases automático y un manoreductor de salida fijado a 2 atmósferas, con un filtro desecador del aire.

En la entrada del fermentador se colocan un rotámetro New Brunswick con un intervalo de medida de flujo de 0 a 10 litros/minuto. Antes del tubo de entrada son montados en serie dos filtros de aire con lana de vidrio esterilizados en horno a 180°C durante una hora. Las conexiones son de goma especial que resiste esta temperatura de esterilización.

La salida de aire se realiza a través de los siguientes elementos: 1) Un frasco de dos bocas vacío, para evitar posibles retrocesos. 2) Un frasco como el anterior con ácido fénico al 10%. 3) Un frasco deflegmador y 4) un filtro de aire relleno de lana de vidrio como los anteriores. Todos estos recipientes se esterilizan aparte en el autoclave.

b) Agitación: El eje de giro va movido por un motor "Multifix" de 1/10 de C.V. con velocidad variable entre 0 y 2000 rpm, que puede ser reducida a 1/10. La conexión entre este motor y el eje de giro se hace mediante un eje flexible, lo cual reduce las vibraciones al mínimo.

c) Control de temperatura y calefacción: La calefacción se consigue mediante una lámpara de infrarrojos de 600 vatios situada exteriormente por debajo del matraz reactor. Esta lámpara se conecta a un disruptor y este a su vez a un termostato de mando a distancia cuya "pluma" se introduce en el tubo metálico de la tapa. El termostato tiene un margen de $\pm 0,5^\circ \text{C}$ y se puede regular en un intervalo de 10 a 55°C.



III - ESQUEMA DEL TRABAJO PROPUESTO

Con objeto de tener una idea de conjunto del trabajo - realizado, antes de pasar a la exposición de resultados, se da un esquema de las distintas etapas del mismo y de su organización general. En resumen sería:

- 1º - Aislamiento y clasificación del material biológico. Pruebas preliminares: Medios de cultivo; fuente óptima de carbono y nitrógeno; velocidad de agitación; especificidad de hidrocarburos. Cultivos sobre gas-oil.
- 2º - Estudio espectroscópico del gas-oil original. -- Asignación de bandas.
- 3º - Fraccionamiento del gas-oil por cromatografía. Estudio espectroscópico de las distintas fracciones: asignación de bandas.
- 4º - Cultivo de las estirpes en la fracción parafínica completa.
- 5º - Cultivos sobre pentadecano y tetrametilpentadecano.
- 6º - Separación de las parafinas por formación de aductos con urea.
- 7º - Cultivos sobre n-parafinas y sobre parafinas ramificadas y cíclicas.
- 8º - Cultivos sobre la fracción aromática.
- 9º - Cultivo de algunas especies en fermentadores, sobre gas-oil completo y sobre la fracción parafínica.
- 10º - Cromatografía de los extractos de los cultivos anteriores. Estudio espectroscópico.

IV - RESULTADOS

4.1. - Aislamiento y clasificación del material biológico

Para el aislamiento, se prepararon medios de cultivo - con distintos tipos de hidrocarburos como fuente única de carbono. En la descripción de las distintas especies se cita su origen y el medio en que fueron aislados.

Se obtuvieron en total 42 estirpes de bacterias 15 a partir de petróleo crudo como fuente de carbono, 16 utilizando gas-oil, 5 con parafinas comerciales, 4 con keroseno y 2 con asfaltos.

Para exponer los resultados de las pruebas morfológicas y bioquímicas, las ordenaremos siguiendo un criterio sistemático, por grupos afines. Cada uno de estos grupos se estudia en conjunto para simplificar la exposición, presentándose un estudio diagnóstico de los mismos que nos lleva a determinar la familia y el género a que pertenecen. A continuación - se expone en forma de tablas, los resultados de las pruebas - efectuadas con cada estirpe, comparados, en los casos en que se ha llegado a nivel de la especie, con las correspondientes descripciones del Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.

En primer lugar, se describen las estirpes Gram positivas:

4.1.1. - Estudio diagnóstico de las estirpes P-1, P-2, P-3 y P-36.

Los resultados de las pruebas realizadas para estas estirpes están expuestos en las tablas I, II, III y IV.

Se trata de Bacilos Gram positivos, no esporulados, - que muestran ramificación rudimentaria y, frecuentemente, dis

posición en empalizada; son pleomórficos y dan negativa la - prueba de Ziehl-Nielsen.

Todo ello nos hace suponer, que las estirpes anteriores pertenecen a una de las siguientes familias:

- | | |
|--------------------|-------------------------|
| | Fam. Corynebacteriaceae |
| O. Eubacteriales | Fam. Brevibacteriaceae |
| | Fam. Lactobacillaceae |
| | Fam. Mycobacteriaceae |
| O. Actinomycetales | Fam. Actinomycetaceae |
| | Fam. Streptomycetaceae |

La familia Mycobacteriaceae está formada por bacterias más ramificadas que las que hemos reunido en este grupo y además ácido-alcóhol resistentes. Por el contrario, la familia Lactobacillaceae presenta bacilos totalmente rectos. Estas razones nos llevan a descartar ambas familias.

La presencia de ramificaciones poco abundantes, que nunca dan lugar en estas estirpes a la aparición de un verdadero micelio, nos sirven para eliminar la posibilidad de un actinomiceto.

Con todo ello, podemos situar nuestras especies dentro de las familias Corynebacteriaceae o Brevibacteriaceae las cuales son muy próximas y no están bien diferenciadas entre sí. Por su tamaño y por su capacidad de fermentar glúcidos (salvo una de ellas) debemos colocar a estas estirpes en la familia Corynebacteriaceae.

En dicha familia hay 6 géneros: Corynebacterium, Listeria, Erysipelothrix, Microbacterium, Cellulomonas y Arthrobacter, siendo Listeria patógeno de animales de sangre caliente y Erysipelothrix, Microbacterium y Cellulomonas poseen características morfológicas y bioquímicas muy concretas que no presentan nuestras bacterias.

Quedan incluidas pues en los géneros restantes: Corynebacterium y Arthrobacter. Las diferencias entre ambos son fundamentalmente morfológicas; el G. Corynebacterium presenta disposición en empalizada, mientras Arthrobacter exhibe un ciclo de desarrollo bien definido, comenzando en medios jóvenes por presentar formas bacilares ligeramente ramificadas que, con el tiempo, se fragmentan en cocos. Estas formas, en un nuevo medio de cultivo, vuelven a adquirir su morfología bacilar.

Según esta descripción, podemos colocar a las estirpes P-1, P-3 y P-36 en el G. Corynebacterium y a la P-2 en el G. Arthrobacter.

Las cuatro especies fueron aisladas en un medio con petróleo crudo como única fuente de carbono.

Tanto el G. Corynebacterium como el G. Arthrobacter -- han sido citados a menudo entre los que son capaces de utilizar hidrocarburos.

TABLA I. CARACTERES QUE DESCRIBEN LA ESTIRPE P-1

		CORYNEBACTERIUM BOVIS		P - 1	
CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS	Forma	Bastones en grupos	Bacilos largos, agrupados, ramificados		
	Tamaño	0,5 a 0,7 x 2,5 a 3 u	0,5 x 3 micras		
	Movilidad	No móvil	No Móvil		
	Flagelos				
	Tinción de Gram	G (+)	G (+)		
	Esporas	No descrito	No posee		
	Acido alcóhol	No descrito	No resistente		
COLONIAS EN AGAR	Forma	Circular	Circular		
	Superficie	No descrito	Lisa		
	Color	Gris	Blanco grisáceo		
	Brillo	Seca	Brillante		
	Elevación	Lig. alzada	Lig. alzada		
AGAR INCLINADO	Crecimiento	Ligero	Crece poco		
	Forma	Filiforme	Filiforme		
	Brillo	Seca	Brillante		
	Color	Gris	Salmón		
	Superficie	No descrita	Lisa		
CALDO COMUN	Crecimiento en superficie	No descrito	Felícula		
	Turbidez	Ligera	Ligera		
	Sedimento	Granular	Granular		
CRECIMIENTO EN GELATINA	Crecimiento	Leve, gris, superficie lisa	Leve, salmón, superficie lisa		
	Licuefacción	No descrita	No licúa		
ACCION SOBRE LA LECHE TORNASOL		Lentamente se vuelve fuertemente alcalina	Alcalinización		
ACCION SOBRE LOS NITRATOS		No produce nitritos	No produce nitritos		
PRODUCCION DE SH ₂		No descrito	No produce		
PRODUCCION DE INDOL		No produce	No produce		
HIDROLISIS DE ALMIDON		No descrito	No hidroliza		
UTILIZACION DE AZUCARES EN CULTIVOS LIQUIDOS		<u>Acido</u>	<u>Gas</u>	<u>Acido</u>	<u>Gas</u>
	Xylosa	-	-	-	-
	Glucosa	-	-	+	-
	Lactosa	-	-	-	-
	Sacarosa	-	-	-	-
	Maltosa	-	-	-	-
	Manitol	-	-	+	-
Galactosa	-	-	-	-	
OXIDASA	No descrito		-		
CATALASA	No descrito		+		
AMONIACO	No descrito		-		
KOHLER	No descrito		-		
UTILIZACION DE HIDROCARBUROS COMO FUENTE DE CARBONO EN MEDIOS LIQUIDOS	Benzeno	No descrito		+ (6 días)	
	Tolueno	No descrito		+ (24 h.)	
	Naftaleno	No descrito		-	
	Xileno	No descrito		+ (9 días)	
	Antraceno	No descrito		+ (9 días)	
	Gasolina	No descrito		+ (9 días)	
	Gas-oil	No descrito		+ (6 días)	
Fuel-oil	No descrito		+ (6 días)		

CORYNEBACTERIUM SP.

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS	Forma	Bacilos, en grupos, ligeramente ramificados
	Tamaño	0,5 x 2,5 micras
	Movilidad	No móviles
	Flagelos	
	Tinción de Gram	G (+)
	Esporas	No posee
	Acido Alcóhol	No resistente

COLONIAS EN AGAR	Forma	Circular
	Superficie	Lisa
	Elevación	Lig. alzada
	Color	Amarillento
	Brillo	Brillante

AGAR INCLINADO	Crecimiento	Crece poco
	Forma	Filiforme
	Brillo	Brillante
	Color	Amarillo mostaza
	Superficie	Lisa

CALDO COMUN	Crecimiento en superficie	No presenta
	Turbidez	Escasa, crece mal
	Sedimento	No presenta

CRECIMIENTO EN GELATINA	Crecimiento	Crece poco
	Licuefacción	Licúa

ACCION SOBRE LA LECHE TORNASOL	Inalterada
ACCION SOBRE LOS NITRATOS	Produce nitritos
PRODUCCION DE SH ₂	†
PRODUCCION DE INDOL	No produce
HIDROLISIS DE ALMIDON	No hidroliza

		<u>Acido</u>	<u>Gas</u>
UTILIZACION DE AZUCARES EN CULTIVOS LIQUI- DOS	Xyloza	+	-
	Glucosa	+	-
	Lactosa	+	-
	Sacarosa	+	-
	Maltosa	+	-
	Manitol	+	-
	Galactosa	+	-

OXIDASA	-
CATALASA	+
AMONIACO	-
KOESER	†

UTILIZACION DE HIDROCARBUROS COMO FUENTE DE CARBONO EN ME- DIOS LIQUIDOS	Benceno	-
	Tolueno	-
	Naftaleno	-
	Xileno	-
	Antraceno	-
	Gasolina	-
	Gas oil	-
	Fuel-oil	+ (6 días)

CORYNEBACTERIUM SP.

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS	Forma	Bastones grandes, ligeramente ramificados en V; en cultivos viejos cocobacilos.
	Tamaño	0,8 a 1 x 4 a 6 micras
	Movilidad	Móviles
	Flagelos	Polares
	Tinción de Gram	Gram variable
	Esporas	No posee
	Acido alcóhol	No resistente

COLONIAS EN AGAR	Forma	Circular
	Superficie	Lisa
	Elevación	Ligeramente alzada
	Color	Amarillento
	Brillo	Brillante

AGAR INCLINADO	Crecimiento	Crece lentamente hasta las 48 h.
	Forma	Filiforme
	Brillo	Brillante
	Color	Amarillento
	Superficie	Lisa

CALDO COMUN	Crecimiento en superficie	Velo superficial
	Turbidez	Grande
	Sedimento	Abundante

CRECIMIENTO EN GELATINA	Crecimiento	Leve
	Licuefacción	No licúa

ACCION SOBRE LECHE TORNASOL	Alcalinización ligeramente peptonizada
ACCION SOBRE LOS NITRATOS	Produce nitritos
PRODUCCION DE SH ₂	+
PRODUCCION DE INDOLE	No produce
HIDROLISIS DE ALMIDON	No hidroliza

	<u>Acido</u>	<u>Gas</u>
Xylosa	-	-
Glucosa	-	-
Lactosa	-	-
Sacarosa	-	-
Maltosa	-	-
Manitol	-	-
Galactosa	-	-

OXIDASA	+
CATALASA	+
AMONIACO	-
KOSSER	+

UTILIZACION DE HIDROCARBUROS COMO FUENTE DE CARBONO EN ME- DIOS LIQUIDOS	Benceno	+ (24 h.)
	Tolueno	+ (24 h.)
	Naftaleno	+ (5 días)
	Xileno	+ (24 h.)
	Antraceno	+ (5 días)
	Gas oil	+ (24 h.)
	Fuel-oil	+ (18 días)
Keroseno	+ (6 días)	

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS	Forma	Bastones curvados, que en cultivos viejos se rompen en cocos	Bacilos ramificados, que en cultivos viejos se rompen en cocos		
	Tamaño	Bastones 0,4 a 0,5 x 1 a 3 u. Cocos 0,4 a 0,5 x 0,5 a 0,8 u	0,5 x 2,5 micras		
	Movilidad	No móvil	No móvil		
	Flagelos	-	-		
	Tinción de Gram	Gram variable. En los cocos predominancia G(+)	Gram variable		
	Esporas	-	-		
	Acido Alcóhol	No descrito	No resistente		
COLONIAS EN AGAR	Forma	Circular $\phi = 1 - 1,5$ mm	Circular		
	Superficie	Lisa	Lisa		
	Color	Crema	Crema		
	Brillo	Brillante	Brillante		
	Elevación	Ligeramente alzada	Ligeramente alzada		
AGAR INCLINADO	Forma	Bordes lobados	Bordes lobados		
	Crecimiento	Filiforme	Filiforme		
	Brillo	Brillante	Brillante		
	Color	Crema	Crema		
CALDO COMUN	Superficie	Lisa	Lisa		
	Crecimiento en superficie	No presenta	No presenta		
	Turbidez	Mediana	Mediana		
	Sedimento	Mediano	Mediano		
CRECIMIENTO EN GELATINA	Crecimiento	No descrito	Bueno, superficie lisa brillante		
	Licuefacción	Licúa	Licúa		
ACCION SOBRE LA LECHE TORNASOL		Lento aclaramiento - (7 - 10 días) sin coagulación; llega a ser alcalina	Alcalinización en 5 días		
ACCION SOBRE LOS NITRATOS		Produce nitritos	No produce nitritos		
PRODUCCION DE SH_2		+	+		
PRODUCCION DE INDOL		No produce	No produce		
HIDROLISIS DE ALMIDON		No hidroliza	No hidroliza		
UTILIZACION DE AZUCARES EN CULTIVOS LIQUIDOS		<u>Acido</u>	<u>Gas</u>	<u>Acido</u>	<u>Gas</u>
	Xyloza	+ lig.	-	+	-
	Glucosa	+ lig.	-	+	-
	Lactosa	+ lig.	-	+	-
	Sacarosa	+ lig.	-	+	-
	Maltosa	+ lig.	-	+	-
	Manitol	+ lig.	-	+	-
Galactosa	+ lig.	-	+	-	
OXIDASA		No descrito		-	
	CATALASA		+	+	
	AMONIACO		No descrito	+	
	KOBLER		No descrito	+	
UTILIZACION DE HIDROCARBONOS COMO FUENTE DE CARBONO EN MEDIOS LIQUIDOS	Benceno	No descrito		+	(6 días)
	Tolueno	No descrito		+	
	Naftaleno	No descrito		+	
	Xileno	No descrito		+	(48 h.)
	Antraceno	No descrito		+	(48 h.)
	Gasolina	No descrito		+	
	Gas-oil	No descrito		+	(24 h.)
	Fuel-oil	No descrito		+	(24 h.)

4.1.2. Estudio diagnóstico de las estirpes P-8, G-27, y G-32

Los resultados de las pruebas realizadas para las citadas estirpes están expuestos en las tablas V, VI y VII.

Son bacilos gram positivos, rectos, no formadores de esporas, no ácido-alcóhol resistentes, móviles o inmóviles, en el primer caso por flagelos peritricos.

Como en el caso anterior, las podemos situar en el -- Orden Eubacteriales, descartándose la Familia Lactobacillaceae por ser bacterias que no producen ácido de lactosa, son catalasa positivas y además no fermentan carbohidratos.

En cuanto a las familias Brevibacteriaceae y Corynebacteriaceae, las pruebas morfológicas y bioquímicas nos inclinan en este caso a la primera de las dos, apoyándonos sobre todo en que son bacilos muy pequeños, nunca ramificados, gram positivos (Corynebacteriaceae es a menudo gram variable) y poco fermentadores de glúcidos.

Dentro de esta familia, el Bergey's cita dos géneros: Brevibacterium y Kurthia. Las estirpes anteriores pertenecen al primero por ser bacilos cortos, casi cocoides, que no forman filamentos, características estas opuestas a las del género Kurthia.

La estirpe P-8 fue aislada con petróleo crudo como -- fuente de carbono única; las otras dos, lo fueron sobre gas-oil comercial.

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS	Forma	Bastones con los extremos redondeados, aislado no - capsulado	Cocobacilos ligera- mente ramificados		
	Tamaño	0,8 x 1,4 a 1,7 micras	0,8 x 1,5 micras		
	Movilidad	No móvil	No móvil		
	Flagelos	-	-		
	Tinción de Gram	G (+)	G (+)		
	Esporas	-	-		
	Acido alcohol	No descrito	No resistente		
COLONIAS EN AGAR	Forma	Circular	Circular		
	Superficie	Lisa	Lisa		
	Color	Gris (en ocasiones débil pigmento amarillo)	Blanca grisácea		
	Brillo	No descrito	Brillante		
	Elevación	Llana	Llana		
AGAR INCLINADO	Crecimiento	Moderado	Moderado		
	Forma	No descrita	Extendido		
	Brillo	Brillante	Brillante		
	Color	No descrito	Bianco grisáceo		
	Superficie	Llana, lisa	Llana, lisa		
CALDO COMUN	Crecimiento en superficie	No descrito	Película superficie gruesa		
	Turbidez	Moderada cerca de la superficie	Poca turbidez		
	Sedimento	Floculento	Floculento		
CRECIMIENTO EN GELATINA	Crecimiento	Moderado	Moderado		
	Licuefacción	No licúa	No licúa		
ACCION SOBRE LA LECHE TORNASOL		Ligeramente alcalina	Inalterada		
ACCION SOBRE LOS NITRATOS		Produce nitritos	Produce nitritos		
PRODUCCION DE SH ₂		No descrito	+		
PRODUCCION DE INDOLE		No produce	No produce		
HIDROLISIS DE ALMIDON		No descrito	No hidroliza		
UTILIZACION DE AZUCARES EN CULTIVOS LIQUI- DOS		<u>Acido</u>	<u>Gas</u>	<u>Acido</u>	<u>Gas</u>
	Xyloza	-	-	-	-
	Glucosa	-	-	-	-
	Lactosa	-	-	-	-
	Sacarosa	-	-	-	-
	Maltosa	-	-	-	-
	Manitol	-	-	-	-
Galactosa	-	-	-	-	
OXIDASA		No descrito		+	
	CATALASA	No descrito		+	
	AMONIACO	No descrito		-	
	POSSER	No descrito		+	
UTILIZACION DE HIDROCARBUROS COMO FUENTE DE CARBONO EN ME- DIOS LIQUIDOS	Benceno	No descrito		+	(6 días)
	Tolueno	No descrito		-	
	Naftaleno	No descrito		-	
	Xileno	No descrito		+	(24 h.)
	Antraceno	No descrito		-	
	Gasolina	No descrito		+	(24 h.)
	Gas-oil	No descrito		+	(48 h.)
	Fuel-oil	No descrito		-	

CARACTERISTICAS MORIOLÓGICAS	Forma	Bacilos pequeños, ligeramente ramificados en V.	
	Tamaño	0,5 x 2 micras	
	Movilidad	Móvil	
	Flagelos	Polares	
	Tinción de Gram	Gram variables	
	Esporas	Esporas	
	Acido Alcohol	No resistente	
COLONIAS EN AGAR	Forma	Circular	
	Superficie	Lisa	
	Elevación	Ligeramente alzado	
	Color	Amarillento	
	Brillo	Brillante	
AGAR INCLINADO	Crecimiento	Filiforme	
	Forma	Bordes lisos	
	Brillo	Brillante	
	Color	Amarillento	
	Superficie	Lisa	
CALDO COMUN	Crecimiento en superficie	Película sup.	
	Turbidez	Grande	
	Sedimento	Abundante	
CRECIMIENTO EN GELATINA	Crecimiento	Mediano	
	Licuefacción	Ligda	
ACCION SOBRE LA LECHE TORNASOL		Acidificación superficial	
ACCION SOBRE LOS NITRATOS		No produce nitritos	
PRODUCCION DE SH ₂		+	
PRODUCCION DE INDOL		No produce	
HIDROLISIS DE ALMIDON		No hidroliza	
UTILIZACION DE AZUCARES EN CULTIVOS LIQUIDOS		<u>Acido</u>	<u>Gas</u>
	Xyloza	-	-
	Glucosa	-	-
	Lactosa	-	-
	Sacarosa	-	-
	Maltosa	+	-
	Manitol	-	-
Galactosa	+	-	
OXIDASA		+	
CATALASA		+	
AMONIACO		+	
KOBER		+	
UTILIZACION DE HIDROCARBUROS COMO FUENTE DE CARBONO EN MEDIOS LIQUIDOS	Benceno	+++	(24 h.)
	Tolueno	+++	(24 h.)
	Naftaleno	+	(4 dias)
	Xileno	+++	(24 h.)
	Antraceno	+	(4 dias)
	Gasolina	+++	(24 h.)
	Gas-oil	+	(4 dias)
	Fuel-oil	-	(22 dias)

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS	Forma	Bastones pequeños, solos y en parejas	Bacilos muy pequeños		
	Tamaño	0,5 a 0,8 x 1 a 1,7 micras	0,5 x 1 micras		
	Movilidad	Unas pocas células móviles en cultivos jóvenes	Algunas pocas células móviles		
	Flagelos	Monotricos, en ocasiones - lateral	Polares		
	Tinción de Gram	G (+)	G (+)		
	Esporas	-	-		
	Acido Alcohol	No descrito	No resistente		
COLONIAS EN AGAR	Forma	Circular	Circular		
	Superficie	Entera	Rugosa		
	Elevación	No descrito	Ligeramente alzada		
	Color	Pig. de rosa anaranjado a amarillo	Naranja		
	Brillo	Casi traslúcida	Mate		
AGAR INCLINADO	Crecimiento	Filiforme	Filiforme		
	Forma	No descrito	Bordes lisos		
	Brillo	Brillante	Mate		
	Color	No descrito	Naranja		
	Superficie	Opaca	Rugosa		
CALDO COMUN	Crecimiento en superficie	No descrito	No presenta		
	Turbidez	Ligera a moderada	Muy ligera		
	Sedimento	Ligero			
CRECIMIENTO EN GELATINA	Crecimiento	No descrito	Mediano		
	Licuefacción	No licúa	No licúa		
ACCION SOBRE LA LECHE TORNASOL		No cambia al principio, luego se va volviendo lent. ácida	No produce nitritos		
ACCION SOBRE LOS NITRATOS		No produce nitritos	No produce nitritos		
PRODUCCION DE SH ₂		-	- (color naranja)		
PRODUCCION DE INDOL		-	-		
HIDROLISIS DE ALMIDON		No hidroliza	No hidroliza		
UTILIZACION DE AZU- CARES EN CULTIVOS - LIQUIDOS		<u>Acido</u>	<u>Gas</u>	<u>Acido</u>	<u>Gas</u>
	Xylosa	+	-	-	-
	Glucosa	+	-	-	-
	Lactosa	+ lent.	-	-	-
	Sacarosa	+	-	+	-
	Maltosa	+	-	-	-
	Manitol	+	-	-	-
Galactosa	+	-	-	-	
OXIDASA		No descrito		-	
CATALASA		No descrito		+	
AMONIACO		No descrito		+	
KOSSER		No descrito		+	
UTILIZACION DE HIDROCARBUROS COMO FUENTE DE CARBONO EN ME- DIOS LIQUIDOS	Benceno	No descrito		+++ (8 días)	
	Tolueno	No descrito		- (25 días)	
	Naftaleno	No descrito		- (25 días)	
	Xileno	No descrito		- (25 días)	
	Antraceno	No descrito		- (25 días)	
	Gasolina	No descrito		- (25 días)	
	Gas-oil	No descrito		+++ (10 días)	
	Fuel-oil	No descrito		++ (8 días)	

4.1.3. Estudio diagnóstico de las estirpes G-28, G-41, P-42, G-43 y P-44

Los resultados de las pruebas realizadas con estas estirpes están expuestos en las tablas VIII, IX, X, XI, y XII.

Se trata de bacilos gram positivos, no formadores de esporas, no ácido-alcohol resistentes, ramificados y formadores de micelios poco evidentes.

Dentro de las formas claramente ramificadas (Orden Actinomycetales) tenemos tres familias: Mycobacteriaceae, Actinomycetaceae, y Streptomycetaceae. Podemos descartar la primera, que es positiva a la prueba de Ziehl-Nielsen. En cuanto a las dos restantes, la familia Streptomycetaceae presenta un micelio aéreo, del que carecen las especies que estudiamos.

Se trata pues, de bacterias de la familia Actinomycetaceae la cual comprende dos géneros. Nocardia y Actinomyces, -- siendo el segundo de ellos parásito y anaerobio, caracteres -- que no presentan las estirpes aisladas por nosotros.

En consecuencia son especies del G. Nocardia, que proceden las señaladas con G de medios de enriquecimiento con --- gas-oil y las señaladas con P de petróleo crudo.

4.1.4. - Estudio diagnóstico de la estirpe Pa-19

Los resultados de las pruebas realizadas para esta estirpe, están expuestos en la tabla XIII.

Nuestra estirpe presenta un micelio vegetativo muy ramificado, con esporas exógenas. Es gram positivo y no ácido alcohol resistente.

Por las razones anteriormente expuestas, puede asignarse al Orden Actinomycetales y dentro de éste, siguiendo una discusión análoga, a la familia Streptomycetaceae, por presentar micelio aéreo que no se fragmenta en las sucesivas etapas del desarrollo.

NOCARDIA MINIMA

G - 28

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS		NOCARDIA MINIMA		
CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS	Forma	Filamentos y bastones, en V a Y en cultivos viejos cocos	Bacilos ramificados en cultivos viejos cocos	
	Tamaño	0,4 a 0,6 x 2 a 10 micras	0,4 x 6 micras	
	Movilidad	No móvil	No móvil	
	Flagelos	-	-	
	Tinción de Gram	G (+). Con colorantes ordinarios muestra barras y bandas	G (+), Variable	
	Esporas	-	-	
COLONIAS EN AGAR	Forma	No descrito	Circular	
	Superficie	No descrito	Rugosa	
	Elevación	ligeramente alzado	Ligeramente alzado	
	Color	No descrito	Naranja	
AGAR INCLINADO	Brillo	No descrito	Mate	
	Crecimiento	Crece lentamente	Crece lentamente	
	Forma	No descrito	Filiforme	
	Brillo	No descrito	Mate	
CALDO COMUN	Color	Al principio poco coloreado luego rosa carne o rosa coral	Naranja	
	Superficie	Rugosa	Rugosa	
	Turbidez	No descrito	Crece sin turbidez	
CRECIMIENTO EN GELATINA	Sedimento	No descrito	Sed. naranja	
	Crecimiento en superficie	No descrito	-	
ACCION SOBRE LA LECHE TORNASOL	Licuefacción	No licúa	Granulado, crema	
	ACCION SOBRE LOS NITRATOS	No descrito	No produce nitritos	
	PRODUCCION DE SH ₂	No descrito	- (coloración naranja)	
	PRODUCCION DE INDOL	No descrito	No produce	
	HIDROLISIS DE ALMIDON	No descrito	No hidroliza	
UTILIZACION DE AZUCARES EN MEDIOS LIQUIDOS	<u>Acido</u>		<u>Acido</u>	<u>Gas</u>
	Xylose	No descrito	-	-
	Glucosa	No descrito	+	-
	Lactosa	No descrito	-	-
	Sacarosa	No descrito	-	-
	Maltosa	No descrito	-	-
	Manitol	No descrito	-	-
Galactosa	No descrito	-	-	
UTILIZACION DE HIDROCARBUROS COMO FUENTE DE CARBONO EN MEDIOS LIQUIDOS	OXIDASA	No descrito	+	
	CATALASA	No descrito	-	
	AMONIACO	No descrito	-	
	KOESER	No descrito	+	
	Benceno	No descrito	+	(13 días)
	Tolueno	No descrito	-	(25 días)
	Naltaleno	No descrito	-	(25 días)
	Xileno	No descrito	+	(4 días)
	Antraceno	No descrito	-	(25 días)
	Gasolina	No descrito	+	(25 días)
Gas-oil	No descrito	+	(3 días)	
Fuel-oil	No descrito	+	(17 días)	

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS	Forma	Filamentos, bastones en cultivos viejos, frecuentemente en V, Y formas hinchadas y - cocos	Bacilos medianos ramificados en V en - cultivos viejos cocos		
	Tamaño	0,4 a 0,6 x 2 a 10 micras	0,6 x 4 micras		
	Movilidad	No móvil	No móvil		
	Flagelos	-	-		
	Tinción de Gram	G (+), con colorantes ordinarios, muestra barras y bandadas	G (+)		
	Esporas	-	-		
	Acido Alcohol	No descrito	No resistente		
COLONIAS EN AGAR	Forma	No descrito	Circular		
	Superficie	No descrito	Rugosa		
	Elevación	Ligeramente alzada	Ligeramente alzada		
	Color	No descrito	Blanco		
	Brillo	No descrito	Mate		
AGAR INCLINADO	Crecimiento	Crece lentamente	Crece lentamente		
	Forma	No descrito	Filiforme		
	Brillo	No descrito	Mate		
	Color	Al principio poco coloreado luego rosa carne o rosa coral	Blanco		
	Superficie	Rugosa	Rugosa		
CALDO COMUN	Crecimiento en superficie	No descrito	Velo		
	Turbidez	No descrito	-		
	Sedimento	No descrito	Membrana punteada		
CRECIMIENTO EN GELATINA	Crecimiento	Filiforme, granulado, crema	Granulado, crema		
	Licuefacción	No licda	No licda		
ACCION SOBRE LA LECHE TORNASOL	No descrito	No descrito	Inalterada		
ACCION SOBRE LOS NITRATOS	No descrito	No descrito	-		
PRODUCCION DE NH ₂	No descrito	No descrito	-		
PRODUCCION DE INDOL	No descrito	No descrito	-		
HIDROLISIS DEL ALMIDON	No descrito	No descrito	No hidroliza		
UTILIZACION DE AZUCARES EN MEDIOS LIQUIDOS		<u>Acido</u>	<u>Gas</u>	<u>Acido</u>	<u>Gas</u>
	Xylosa	No descrito	-	+	-
	Glucosa	No descrito	-	-	-
	Lactosa	No descrito	-	-	-
	Sacarosa	No descrito	-	+	-
	Maltosa	No descrito	-	-	-
	Manitol	No descrito	-	+	-
Galactosa	No descrito	-	-	-	
OXIDASA	No descrito	No descrito	No descrito	+	
CATALASA	No descrito	No descrito	No descrito	+	
AMONIACO	No descrito	No descrito	No descrito	-	
KOESER	No descrito	No descrito	No descrito	+	
UTILIZACION DE HIDROCARBUROS COMO FUENTE DE CARBONO EN MEDIOS LIQUIDOS	Benceno	No descrito	No descrito	+	(48 h.)
	Tolueno	No descrito	No descrito	+	(5 días)
	Naftaleno	No descrito	No descrito	+	(8 días)
	Xileno	No descrito	No descrito	+	(5 días)
	Antraceno	No descrito	No descrito	+	(15 días)
	Gas-oil	No descrito	No descrito	++	(3 días)
	Fuel-oil	No descrito	No descrito	+	(5 días)
Keroseno	No descrito	No descrito	+	(5 días)	

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS	Forma	Bastones curvados y filamentos con células cocoides en cultivos viejos	Bacilos en V, U rotos en cocos en cultivos viejos		
	Tamaño	1 x 2 a 8 micras	1 x 4 micras		
	Movilidad	No móviles	No móviles		
	Tinción de Gram	G (+)	G (+)		
	Esporas	-	-		
	Acido alcóhol	No descrito	No resistente		
COLONIAS EN AGAR	Forma	Tras 4 días colonias irregularmente redondas. Borda ondulado	Crece lentamente. Colonias irregularmente redondas		
	Superficie	Lisa	Lisa		
	Elevación	Covexa	Ligeramente alzada		
	Color	Blanco	Rosa claro		
	Brillo	Brillante	Brillante		
AGAR INCLINADO	Crecimiento	Después de 3 días filiforme	Crece lentamente. Filiforme		
	Forma	Bordes irregulares	Borde ondulado		
	Brillo	No descrito	Brillante		
	Color	No descrito	Rosa claro		
	Superficie	Lisa	Lisa		
CALDO COMUN	Crecimiento en superficie	No descrito	-		
	Turbidez	Turbidez con suspensión viscosa	Turbidez debida a suspensión granular		
	Sedimento	No descrito	-		
CRECIMIENTO EN GELATINA	Crecimiento	Tras 19 días colonias irregularmente redondas, lisa brillante	-		
	Licuefacción	No descrito	-		
ACCION SOBRE LA LECHE TORNASOL		Alcalinización	Alcalinización		
ACCION SOBRE LOS NITRITOS		-	-		
PRODUCCION DE SH ₂		No descrito	+		
PRODUCCION DE INDOL		-	-		
HIDROLISIS DE ALMIDON		No descrito	No hidroliza		
UTILIZACION DE AZUCARES EN MEDIOS LIQUIDOS		<u>Acido</u>	<u>Gas</u>	<u>Acido</u>	<u>Gas</u>
	Xylosa	No descrito	-	-	-
	Glucosa	-	-	-	-
	Lactosa	-	-	-	-
	Sacarosa	-	-	+	-
	Maltosa	-	-	-	-
	Manitol	No descrito	-	+	-
Galactosa	No descrito	-	-	-	
OXIDASA		No descrito	-	-	-
CATALASA		No descrito	-	+	-
AMONIACO		No descrito	-	-	-
KOESER		No descrito	-	+	-
UTILIZACION DE HIDROCARBUROS COMO FUENTE DE CARBONO EN MEDIOS LIQUIDOS	Benceno	No descrito	-	+	(2 días)
	Tolueno	No descrito	-	-	-
	Naftaleno	No descrito	-	+	(5 días)
	Xileno	No descrito	-	+	(17 días)
	Antraceno	No descrito	-	++	(5 días)
	Gas-oil	No descrito	-	+++	(24 h.)
	Fuel-oil	No descrito	-	++	(24 h.)
Keroseno	No descrito	-	++	(24 h.)	

NOCARDIA SP.

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS	Forma	Bastones muy largos, la mayoría en V, Y
	Tamaño	1 a 1,5 x 6 a 10 u
	Movilidad	No móviles
	Flagelos	-
	Tinción de Gram	G (+)
	Esporas	-
Acido alcóhol	No resistente	

COLONIAS EN AGAR	Forma	Colonias circulares, bordes ondulados
	Superficie	Lisa
	Elevación	Ligeramente alzada
	Color	Calabaza
	Brillo	Mate

AGAR INCLINADO	Crecimiento	Abundante en 48 h.
	Forma	Filiforme
	Brillo	Mate
	Color	Calabaza
	Superficie	Lisa

CALDO COMUN	Crecimiento en superficie	-
	Turbidez	Grande debida a granulos en suspensión
	Sedimento	Sedimento calabaza

CRECIMIENTO EN GELATINA	Crecimiento	-
	Licuefacción	-

ACCION SOBRE LA LECHE TORNASOL	Alcalinización
ACCION SOBRE LOS NITRATOS	-
PRODUCCION DE SH ₂	+
PRODUCCION DE INDOL	-
HIDROLISIS DE ALMIDON	No hidroliza

	<u>Acido</u>	<u>Gas</u>
UTILIZACION DE AZUCARES EN MEDIOS LIQUIDOS	Xylosa	-
	Glucosa	-
	Lactosa	-
	Sacarosa	+
	Maltosa	-
	Manitol	+
Galactosa	-	

OXIDASA	-
CATALASA	+
AMONIACO	-
ROSEBER	+

UTILIZACION DE HIDROCARBUROS COMO FUENTE DE CARBONO EN MEDIOS LIQUIDOS	Benceno	+	(14 días)
	Tolueno	+	(48 h.)
	Naftaleno	+	(24 h.)
	Xileno	+	(24 h.)
	Antraceno	+	(48 h.)
	Gas-oil	+++	(24 h.)
	Fuel-oil	+++	(24 h.)
Keroseno	+	(7 días)	

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	Forma	Bastones ramificados generalmente curvados; en cultivos viejos bastones más cortos y coccos	Bacilos grandes ramificados en cultivos viejos coccos		
	Tamaño	1 a 1,5 x 3 a 10 micras	1 a 1,5 x 6 a 8 micras		
	Movilidad	No móvil	No móvil		
	Flagelos	-	-		
	Tinción de Gram	G (+)	G (+)		
	Esporas	-	-		
Acido alcóhol	No descrito	No resistente			
COLONIAS EN AGAR	Forma	Redondas, bordes filamentosos o proyecciones arborescentes	Circulares con bordes arborescentes		
	Superficie	Lisa	Lisa		
	Elevación	Convexa	Ligeramente alzada		
	Color	Rosa	Rosa coral		
Brillo	Brillante o mate	Mate			
AGAR INCLINADO	CreCIMIENTO	Filiforme	Abundante, filiforme		
	Forma	Convexo, bordes arborescentes	Bordes arborescentes		
	Brillo	Brillante o mate	Mate		
	Color	Rosa	Rosa coral		
	Superficie	Lisa	Lisa		
CALDO COMUN	CreCIMIENTO en superficie	No descrito	Velo sup.		
	Turbidez	Usualmente turbio	Grande debido a partículas en suspensión		
	Sedimento	Sedimento rosa	Sedimento rosa		
CRECIMIENTO EN GELATINA	CreCIMIENTO	Colonias redondeadas, lisas, rosas brillantes convexas	Colonias redondeadas - lisas		
	Liquefacción	No licúa	+		
ACCION SOBRE LA LECHE TORNASOL		Alcalinización, película rosiza	Alcalinización		
ACCION SOBRE LOS NITRATOS		+	+		
PRODUCCION DE SH ₂		No descrito	-		
PRODUCCION DE INDOL		No descrito	-		
HIDROLISIS DE ALMIDON		No descrito	No hidroliza		
UTILIZACION DE AZUCAR EN MEDIOS LIQUIDOS		<u>Acido</u>	<u>Gas</u>	<u>Acido</u>	<u>Gas</u>
	Xylosa	No descrito	-	-	-
	Glucosa	+ algunas estirpes	-	-	-
	Lactosa	-	-	-	-
	Sacarosa	-	-	-	-
	Maltosa	-	-	-	-
	Manitol	No descrito	+	-	-
Galactosa	No descrito	-	-	-	
OXIDASA		No descrito	-	-	-
	CATALASA	No descrito	-	+	-
	AMONIACO	No descrito	-	-	-
	ROSSEER	No descrito	-	+	-
UTILIZACION DE HIDROCARBUROS COMO FUENTE DE CARBONO EN MEDIOS LIQUIDOS	Benceno	No descrito	-	+	(24 h.)
	Tolueno	No descrito	-	+	(25 días)
	Naftaleno	+ (algunas estirpes)	-	+	(25 días)
	Xileno	No descrito	-	+	(24 h.)
	Antraceno	No descrito	-	+	(5 días)
	Gas-oil	No descrito	-	+++	(24 h.)
	Fuel-oil	No descrito	-	+	(25 días)
	Keroseno	No descrito	-	+	(6 días)

STREPTOMYCES SP.

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS	Forma	Micelio muy ramificado	
	Tamaño	-	
	Movilidad	No móvil	
	Flagelos	-	
	Tinción de Gram	G (+)	
	Esporas	Esporulado	
	Acido alcóhol	No resistente	
COLONIAS EN AGAR	Forma	Colonias algodonosas	
	Superficie	Rugosa, seca	
	Elevación	Alzada	
	Color	Blanco	
	Brillo	Mate	
AGAR INCLINADO	Forma	Aspecto algodonoso, bordes lobados	
	Crecimiento	Bueno	
	Brillo	Mate	
	Color	Blanco	
	Superficie	Rugosa, seca	
CALDO COMUN	Crecimiento en superficie	Película blanca coriacea	
	Turbidez	No produce. Crecimiento granular	
	Sedimento	No produce	
CRECIMIENTO EN GELATINA	Crecimiento	No crece	
	Licuefacción	-	
ACCION SOBRE LA LECHE TORNASOL		Acidificación	
ACCION SOBRE LOS NITRITOS		-	
PRODUCCION DE SH ₂		-	
PRODUCCION DE INDOL		-	
HIDROLISIS DE ALMIDON		Hidroliza	
UTILIZACION DE AZUCARES EN ME DIO LIQUIDOS		<u>Acido</u>	<u>Gas</u>
	Xylosa	-	-
	Glucosa	-	-
	Lactosa	-	-
	Secarosa	-	-
	Maltosa	-	-
	Manitol	-	-
Gelactosa	-	-	
OXIDASA		-	
CATALASA		+	
AMONIACO		-	
KOBER		+	
UTILIZACION DE HIDROCARBUROS COMO FUENTE DE CARBONO EN ME DIO LIQUIDOS	Benceno	-	
	Tolueno	+	(24 h.)
	Naftaleno	-	
	Xileno	-	
	Antraceno	-	
	Gasolina	-	
	Gas-oil	+	(24 h.)
Fuel-oil	+	(24 h.)	

4.1.5. Estudio diagnóstico de las estirpes P-4, P-5, P-9, G-39
P-40

Veánse los resultados de las pruebas bioquímicas y morfológicas en las tablas XIV, XV, XVI, XVII y XVIII.

Se trata de cocos gram positivos o gram variables, en parejas o aislados, inmóviles. Crecen bien en medios normales a 25°C; son claramente aerobios. Colonias pigmentadas de rojo ó amarillo. Producen fermentación oxidativa de carbohidratos - sin producción de gas.

Todas estas pruebas coinciden con la descripción de la familia Micrococcaceae. Podría pensarse en bacterias del G. - Arthrobacter pero no se han observado nunca formas bacilares, habiéndose hecho abundantes preparaciones en todas sus etapas de desarrollo, en cultivos que oscilaron desde 4 horas hasta - varias semanas de edad.

Dentro de esta familia, el único género que reúne las citadas condiciones es el G. Micrococcus, al que pertenecen -- las cuatro estirpes descritas.

4.1.6. Estudio diagnóstico de la estirpe K-21

Los resultados de las pruebas bioquímicas y morfológicas en la tabla XIX.

Se trata de una especie no determinada del Género Arthrobacter.

MICROCOCCUS UREAE

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS	Forma	Cocos aislados, en parejas	Cocos aislados en parejas		
	Tamaño	0,8 a 1 micra	1 micra		
	Movilidad	Inmóviles	Inmóviles		
	Tinción de Gram	G (+)	G (+)		
	Flagelos	-	-		
	Esporas	-	-		
COLONIAS EN AGAR	Forma	Colonias redondas pequeñas	Colonias redondas pequeñas		
	Superficie	-	Lisa		
	Elevación	Poco elevadas	Poco elevadas		
	Color	Blanco	Blanco		
	Brillo	Brillante	Brillante		
AGAR INCLINADO	Crecimiento	Abundante	Abundante		
	Forma	Redonda	Redonda		
	Brillo	Brillante	Brillante		
	Color	Blanco grisáceo	Blanco		
	Superficie	Lisa	Lisa		
CALDO COMÚN	Crecimiento en superficie	-	No forma película		
	Turbidez	Abundante	Abundante		
	Sedimento	Viscoso	Viscoso		
CRECIMIENTO EN GELATINA	Crecimiento	Pequeño	Pequeño		
	Licuefacción	Muy lenta ó no líquida	No líquida		
ACCION SOBRE LA LECHE TORNASOL		Acidificación	Acidificación		
ACCION SOBRE LOS NITRATOS		No produce nitritos	No produce nitritos		
PRODUCCION DE SH ₂		No descrita	Produce		
PRODUCCION DE INDOL		No produce	No produce		
HIDROLISIS DEL ALMIDON		No hidroliza	No hidroliza		
UTILIZACION DE AZUCARES EN MEDIOS LIQUIDOS		<u>Acido</u>	<u>Gas</u>	<u>Acido</u>	<u>Gas</u>
	Xylosa	-	-	-	-
	Glucosa	+	-	+	-
	Lactosa	+	-	-	-
	Sacarosa	+	-	-	-
	Maltosa	-	-	-	-
	Manitol	+	-	+	-
Galactosa	-	-	+	-	
OXIDASA		No descrito		No produce	
CATALASA		No descrito		Produce	
AMONIACO		Utiliza como única fuente de carbono		Utiliza como única fuente de carbono	
KOELLER		Crece		Crece	
UTILIZACION DE HIDROCARBUROS COMO FUENTE DE CARBONO EN MEDIOS LIQUIDOS	Benceno	No descrito		+	(6 días)
	Tolueno	No descrito		±	
	Nattaleno	No descrito		-	(22 días)
	Xileno	No descrito		+	(3 días)
	Antraceno	No descrito		+	(3 días)
	Gasolina	No descrito		+	(3 días)
	Gas oil	No descrito		+	(48 horas)
	Fuel oil	No descrito		+	(3 días)

		MICROCOCCLUS UREAE		P - 5	
CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS	Forma	Cocos aislados, en parejas	Cocos aislados o en parejas	1 micra	
	Tamaño	0,8 a 1 micra	Inmóviles	Inmóviles	
	Movilidad	Inmóviles	G (+)	G (+)	
	Tinción de Gram	G (+)	No posee	No posee	
	Flagelos	No posee	No posee	No posee	
COLONIAS EN AGAR	Forma	Colonias redondas y pequeñas	Colonias redondas pequeñas	Lisa	
	Superficie	No descrita	Poco elevadas	Blanco	
	Elevación	Poco elevadas	Brillante	Brillante	
	Color	Blanco	Abundante	Viscoso	
	Brillo	Brillante	Viscoso		
AGAR INCLINADO	Crecimiento	Abundante	Pequeño	No licúa	
	Forma	Redonda	Muy lenta o no licúa		
	Brillo	Brillante	Acidificación	No produce nitritos	
	Color	Blanco grisáceo	No produce nitritos	Produce	
	Superficie	Lisa	No descrita	No produce	
CALDO COMUN	Crecimiento en superficie	No descrito	Acidificación	No produce nitritos	
	Turbidez	Abundante	No produce nitritos	Produce	
	Sedimento	Viscoso	No descrita	No produce	
CRECIMIENTO EN DELATINA	Crecimiento	Pequeño	Acidificación	No produce nitritos	
	Licuefacción	Muy lenta o no licúa	No produce nitritos	Produce	
ACCION SOBRE LA LECHE TOMASOL		Acidificación	Acidificación	No produce nitritos	
ACCION SOBRE LOS NITRATOS		No produce nitritos	No produce nitritos	Produce	
PRODUCCION DE SH ₂		No descrita	Produce	No produce	
PRODUCCION INDOL		No produce	No produce	No produce	
HIPOCLORIS DEL ALMIDON		No hidroliza	No hidroliza	No hidroliza	
UTILIZACION DE AZUCARES EN MEDIOS LIQUIDOS		<u>Acido</u>	<u>Gas</u>	<u>Acido</u>	<u>Gas</u>
	Xylose	-	-	-	-
	Glucosa	+	-	+	-
	Lactosa	+	-	-	-
	Sacarosa	+	-	-	-
	Maltosa	-	-	-	-
	Manitol	+	-	+	-
Galactosa	-	-	+	-	
OXIDASA CATALASA AMONIACO KOSSER		No descrito	No descrito	No produce	Produce
UTILIZACION DE HIDROCARBUROS COMO FUENTE DE CARBONO EN MEDIOS LIQUIDOS		Utiliza como única fuente de carbono	Utiliza como única fuente de carbono	Crece	
	Benceno	No descrito	No descrito	Crece	
	Tolueno	No descrito	No descrito	Crece	
	Naftaleno	No descrito	No descrito	Crece	
	Xileno	No descrito	No descrito	Crece	
	Antraceno	No descrito	No descrito	Crece	
	Gasolina	No descrito	No descrito	Crece	
	Gas-oil	No descrito	No descrito	Crece	
Fuel-oil	No descrito	No descrito	Crece		

TABLA XVI. CARACTERES QUE DESCRIBEN A LA ESTIRPE P-9

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS	Forma	Cocos aislados, en parejas	Cocos aislados o en parejas		
	Tamaño	0,8 a 1 micra	1 micra		
	Movilidad	Inmóviles	Inmóviles		
	Tinción de Gram	G (+)	G (+)		
	Flagelos	No posee	No posee		
	Esporas	No posee	No posee		
COLONIAS EN AGAR	Forma	Colonias redondas y pequeñas	Colonias redondas y pequeñas		
	Superficie	No descrita	Lisa		
	Elevación	Poco elevadas	Poco elevadas		
	Color	Blanco	Blanco		
	Brillo	Brillante	Brillante		
AGAR INCLINADO	Crecimiento	Abundante	Abundante		
	Forma	Redonda	Redonda		
	Brillo	Brillante	Brillante		
	Color	Blanco grisáceo	Blanco		
	Superficie	Lisa	Lisa		
CALDO COMUN	Crecimiento en superficie	No descrito	No forma película		
	Turbidez	Abundante	Abundante		
	Sedimento	Viscoso	Viscoso		
CRECIMIENTO EN GELATINA	Crecimiento	Pequeño	Pequeño		
	Licuefacción	Muy lenta o no licúa	No licúa		
ACCION SOBRE LA LECHE TORNASOL		Acidificación	Acidificación, coagulación		
ACCION SOBRE LOS NITRATOS		No produce nitritos	No produce nitritos		
PRODUCCION DE CH ₄		No descrita	Produce		
PRODUCCION DE INDOL		No produce	No produce		
HIDROLISIS DEL ALMIDON		No hidroliza	No hidroliza		
UTILIZACION DE AZUCARES EN MEDIOS LIQUIDOS		<u>Acido</u>	<u>Gas</u>	<u>Acido</u>	<u>Gas</u>
	Xyloso	-	-	-	-
	Glucosa	+	-	+	-
	Lactosa	+	-	-	-
	Sacarosa	+	-	-	-
	Maltosa	-	-	-	-
	Manitol	+	-	+	-
Galactosa	-	-	+	-	
OXIDASA		No descrito	No produce		
CATALASA		No descrito	Produce		
AMONIACO		Utilización como única fuente de Carbono	Utilización como única fuente de Carbono		
KONSER		Crece	Crece		
UTILIZACION DE HIDROCARBUROS COMO FUENTE DE CARBONO EN MEDIOS LIQUIDOS	Benceno	No descrito	- (22 días)		
	Tolueno	No descrito	+		
	Naftaleno	No descrito	- (22 días)		
	Xileno	No descrito	+		
	Antraceno	No descrito	- (22 días)		
	Gasolina	No descrito	+		
	Gas-oil	No descrito	+		
Fuel-oil	No descrito	- (22 días)			

TABLA XVII. CARACTERES QUE DESCRIBEN LA ESTIRPE G-39

MICROCOCCUS ROSEUS

G - 39

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS	Forma	Cocos aislados o en parejas	Cocos aislados, o en parejas		
	Tamaño	1 a 1,5 micras	1 a 1,5 micras		
	Movilidad	Inmóviles	Inmóviles		
	Flagelos	No poseen	No poseen		
	Tinción de Gram	G (+)	G (+)		
	Esporas	No poseen	No poseen		
COLONIAS EN AGAR	Forma	Circular	Circular		
	Superficie	Lisa	Lisa		
	Elevación	Elevadas	Elevadas		
	Color	Rosa	Rosa		
	Brillo	Brillantes	Brillantes		
AGAR INCLINADO	Crecimiento	Abundante	Abundante		
	Forma	Circular	Circular		
	Brillo	Brillante	Brillante		
	Color	Rosa	Rosa		
	Superficie	Lisa	Lisa		
CALDO COMUN	Crecimiento en superficie	No forma velo	No forma velo		
	Turbidez	Debilmente turbia	Debilmente turbia		
	Sedimento	Rosa	Rosa		
CRECIMIENTO EN GELATINA	Crecimiento	Escaso	Escaso		
	Licuefacción	Licúa lentamente	No licúa		
ACCION SOBRE LA LECHE TORNASOL		No cambia o alcalina	No cambia		
ACCION SOBRE LOS NITRATOS		Usualmente produce nitritos	Produce nitritos		
PRODUCCION DE SH ₂		No descrita	No produce nitritos		
PRODUCCION DE INDOL		No descrito	No produce nitritos		
HIDROLISIS DEL ALMIDON		No hidroliza	No hidroliza		
UTILIZACION DE AZUCARES EN MEDIOS LIQUIDOS		<u>Acido</u>	<u>Gas</u>	<u>Acido</u>	<u>Gas</u>
	Xylosa	-	-	-	-
	Glucosa	-	-	-	-
	Lactosa	-	-	-	-
	Sacarosa	-	-	+	-
	Maltosa	-	-	-	-
	Manitol	+	-	-	-
Galactosa	-	-	-	-	
OXIDASA CATALASA AMONIACO KOESER		No descrita		No produce	
		No descrito		Produce +	
		No descrito		No produce	
		Crece		Crece	
UTILIZACION DE HIDROCARBUROS COMO FUENTE DE CARBONO EN MEDIOS LIQUIDOS	Benceno	No descrito		+ (6 dias)	
	Tolueno	No descrito		+	
	Naftaleno	No descrito		- (22 dias)	
	Xileno	No descrito		+ (20 dias)	
	Antraceno	No descrito		± (20 dias)	
	Gasolina	No descrito		+ (26 dias)	
	Gas-oil	No descrito		+ (24 horas)	
Fuel-oil	No descrito		+ (48 horas)		

ARTHROBACTER SP.

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS	Forma	Bacilos, largos en cultivos viejos se fragmentan en cocos
	Tamaño	0,8 x 4 micras
	Movilidad	Inmóviles
	Flagelos	No posee
	Tinción de Gram	G (+)
	Esporas	No poseen

COLONIAS EN AGAR	Forma	Redondas grandes
	Superficie	Lisa
	Elevación	Convexa
	Color	Crema
	Brillo	Brillante

AGAR INCLINADO	Crecimiento	Abundante
	Forma	Circular
	Brillo	Brillante
	Color	Blanco crema
	Superficie	Lisa

CALDO COMUN	Crecimiento en superficie	No forma velo
	Turbidez	Abundante
	Sedimento	Mucoso y abundante

CRECIMIENTO EN GELATINA	Crecimiento	Mucoso
	Licuefacción	No licúa

ACCION SOBRE LA LECHE TORNASOL	Alcalinización leve
ACCION SOBRE LOS NITRATOS	No produce nitritos
PRODUCCION DE SH ₂	Dudoso
PRODUCCION DE INDOL	No produce
HIDROLISIS DEL ALMIDON	No hidroliza

	<u>Acido</u>	<u>Gas</u>	
UTILIZACION DE AZUCARES EN MEDIOS LIQUIDOS	Xylosa	+	-
	Glucosa	-	-
	Lactosa	-	-
	Sacarosa	-	-
	Maltosa	-	-
	Manitol	-	-
Galactosa	-	-	

OXIDASA	No produce
CATALASA	Produce
AMONIACO	Produce
KOSUER	Crece

UTILIZACION DE HIDROCARBUROS COMO FUENTE DE CARBONO EN MEDIOS LIQUIDOS	Benceno	+ (3 días)
	Tolueno	±
	Naftaleno	+ (3 días)
	Xileno	+ (24 horas)
	Antraceno	±
	Gasolina	+ (24 horas)
	Gas-oil	+ (24 horas)
	Fuel-oil	+ (24 horas)

ESPECIES GRAM NEGATIVAS

4.1.7. - Estudio diagnóstico de las estirpes P-7, K-10, G-11, G-12, A-13, A-14, K-15, G-16, Pa-17, Pa-18, K-22, Pa-23, G-26, G-31, G-33, P-34, P-35, P-37 y P-38

Los resultados de las pruebas realizadas con estas estirpes están expuestos en las tablas XX, XXI, XXII, XXIII, XXV, XXVI, XXVII, XXVIII, XXIX, XXX, XXXI, XXXII, XXXIII, XXXIV, XXXV, XXXVI, XXXVII, y XXXVIII.

Todos ellos son bacilos gram negativos, móviles por flagelos polares, no esporulados, aerobios, heterotrofos oxidativos. Producen en general, ácido pero no gas de carbohidratos. No fermentan lactosa. Algunas estirpes producen pigmentos verdes o azulados.

Todas estas características responden a la descripción del G. *Pseudomonas*, dentro de la familia Pseudomonadaceae (O. Pseudomonadales).

Las estirpes señaladas con una P fueron aisladas con petróleo crudo como fuente única de carbono; las K sobre keroseno; las A sobre asfalto; las G sobre gas-oil y las Pa sobre parafinas comerciales.

4.1.8. - Estudio diagnóstico de las estirpes P-24 y G-25

Los resultados de las pruebas realizados con estas estirpes están expuestos en las tablas XXXIX y XL.

Se trata de bacilos pequeños gramnegativos móviles por flagelos peritríticos o inmóviles. No fermentan azúcares. Presentan muy poca actividad bioquímica. No producen pigmento.

Todo ello nos los sitúa en el Orden Eubacteriales y dentro de este en la familia Achromobacteraceae.

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	Forma	Bacilos aislados en parejas o cortas cadenas	Bacilos aislados		
	Tamaño	0,5 a 0,6 x 1,5 micras	2,5 x 3 micras		
	Movilidad	Móvil con flagelos polares	Móvil con flagelos polares		
	Tinción de Gram	C (-)	G (-)		
	Esporas	No posee	No posee		
	Acido alcohol				
COLONIAS EN AGAR	Forma	Colonias grandes e irregulares	Grandes		
	Superficie	No descrita	Lisa		
	Elevación	Escasa	Convexa		
	Color	Grisáceo, medio verde fluorescente	Blanco crema		
	Brillo	Centro opaco y bordes traslúcidos	Brillante		
AGAR INCLINADO	Crecimiento	Abundante	Abundante		
	Forma	No descrita	Irregular		
	Brillo	Brillante	Brillante		
	Color	Blanco, en medio se torna verde, marrón o negro fluorescente	Blanco crema. El medio se torna verde. Pérdida de la capacidad de cromatogénesis		
	Superficie	No descrito			
CALDO COMUN	Crecimiento en superficie	Película superficial	Anillo		
	Sedimento	Abundante	Abundante		
	Turbidez	Abundante	Homogénea		
CRECIMIENTO EN GELATINA	Crecimiento	Colonias irregulares en los bordes sup. granulares			
	Licuefacción	Licúa	Licúa		
ACCION SOBRE LA LECHE TORNASOL		Coagulación peptonizada, reducción del tornasol y reacción alcalina	Alcalinización y reducción del tornasol		
ACCION SOBRE LOS NITRATOS		Produce nitritos y nitrógeno	Produce nitritos y nitrógeno		
PRODUCCION DE SH ₂		No descrito	No produce		
PRODUCCION DE INDOL		No produce generalmente	No produce		
HIDROLISIS DE ALMIDON		No descrito	No hidroliza		
UTILIZACION DE AZUCARES EN MEDIOS LIQUIDOS		<u>Acido</u>	<u>Gas</u>	<u>Acido</u>	<u>Gas</u>
	Xylosa	No descrito		-	-
	Glucosa	-	-	-	-
	Lactosa	-	-	-	-
	Sacarosa	-	-	-	-
	Maltosa	-	-	-	-
	Manitol	-	-	-	-
Galactosa	-	-	-	-	
OXIDASA		No descrito		No produce	
CATALASA		No descrito		No produce	
AMONIACO		No descrito		No produce	
KOESLER		Crece		Crece	
UTILIZACION DE HIDROCARBUROS COMO FUENTE DE CARBONO EN MEDIOS LIQUIDOS	Benceno	No descrito		+	(24 horas)
	Tolueno	No descrito		+	
	Naftaleno	No descrito		+	
	Xileno	No descrito		+	(24 horas)
	Antraceno	No descrito		+	(24 horas)
	Gas-oil	No descrito		+	(6 días)
	Fuel-oil	No descrito		+	(3 días)
	Keroseno	No descrito		+	(24 horas)

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	Forma	Bacilos aislados, en pares o cortas cadenas	Bacilos aislados		
	Tamaño	0,5 a 0,6 x 1,5 micras	0,5 x 1 micras		
	Movilidad	Móvil por flagelos polares	Móviles por flagelos polares		
	Tinción de Gram	G (-)	G (-)		
	Esporas	No produce	No posee		
	Acido alcohol				
	COLONIAS EN AGAR	Forma	Colonias grandes irregulares	Grandes	
		Superficie	No descrito	Lisa	
		Elevación	Facasa	Poco elevada	
		Color	Grisáceo, medio verdoso - fluorescente	Verde	
Brillo		Centro opaco y bordes traslúcidos	Brillante		
AGAR INCLINADO	Crecimiento	Abundante	Abundante		
	Forma	No descrita	Irregular		
	Brillo	Brillante	Brillante		
	Color	Blanco, el medio se torna verde opaco marrón o negro fluorescente	Blanco, medio verdoso		
CALDO COMUN	Superficie	No descrita	Lisa		
	Crecimiento superficial	Forma película en superficie	Ligero anillo superficial		
	Turbidez	Abundante	Abundante y homogénea		
	Sedimento	Abundante	No presenta		
CRECIMIENTO EN GELATINA	Crecimiento	Bordes irregulares. Superficial y circular. Amarillento o anillo verdoso	-		
	Licuefacción	Licúa	Licúa		
ACCION SOBRE LA LECHE TORNASOL		Cosgulación peptonización y reducción del tornasol. Alcalinización	Alcalinización, reducción del tornasol, peptonización		
ACCION SOBRE LOS NITRATOS		Produce nitritos y nitrógeno	No produce		
PRODUCCION DE SH ₂		No descrito	Produce		
PRODUCCION DE INDOL		No produce generalmente	No produce		
HIDROLISIS DEL ALMIDON		No descrito	No hidroliza		
UTILIZACION DE AZUCARES EN MEDIOS LIQUIDOS		<u>Acido</u>	<u>Gas</u>	<u>Acido</u>	<u>Gas</u>
	Xylosa	-	-	+	-
	Glucosa	-	-	+	-
	Lactosa	-	-	-	-
	Sacarosa	-	-	-	-
	Maltosa	-	-	-	-
	Manitol	-	-	-	-
Galactosa	-	-	+	-	
OXIDASA		No descrito		Produce	
	CATALASA	No descrito		Produce	
	AMONIACO	No descrito		Produce	
	KOESER	No descrito		Crece	
UTILIZACION DE HIDROCARBUROS COMO FUENTE DE CARBONO EN MEDIOS LIQUIDOS	Benceno	No descrito		-	(22 dias)
	Tolueno	No descrito		-	(22 dias)
	Naftaleno	No descrito		-	(22 dias)
	Xileno	No descrito		+	
	Antraceno	No descrito		-	(22 dias)
	Gasolina	No descrito		+	(24 horas)
	Gas-oil	No descrito		+	
	Fuel-oil	No descrito		-	(22 dias)
Keroseno	No descrito		+	(24 horas)	

PSEUDOMONAS SP.

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS	Forma	Bacilos aislados	
	Tamaño	0,5 micras x 1 micra	
	Movilidad	Móvil	
	Flagelos	Polares	
	Tinción de Gram	G (-)	
	Esporas	No posee	
COLONIAS EN AGAR	Forma	Circular. Bordes lisos	
	Superficie	Lisa	
	Color	Blanco	
	Brillo	Brillante	
	Elevación	Centro alzado	
AGAR INCLINADO	Crecimiento	Abundante	
	Forma	Circular	
	Brillo	Brillante	
	Color	Blanco	
	Superficie	Ligeramente alzada en el centro	
CALDO COMUN	Crecimiento en superficie	Película superficial	
	Turbidez	Homogénea	
	Sedimento	Sedimento	
CRECIMIENTO EN GELATINA	Crecimiento	-	
	Licuefacción	No licúa	
ACCION SOBRE LA LECHE TORNASOL		Acidificación y peptonización	
ACCION SOBRE LOS NITRATOS		No produce nitritos	
PRODUCCION DE SH ₂		Produce	
PRODUCCION DE INDOL		No produce	
HIDROLISIS DE ALMIDON		No hidroliza	
UTILIZACION DE AZUCARES EN MEDIOS LIQUIDOS		<u>Acido</u>	<u>Gas</u>
	Xylosa	+	-
	Glucosa	+	-
	Lactosa	-	-
	Sacarosa	-	-
	Maltosa	-	-
	Manitol	-	-
Galactosa	+	-	
OXIDASA		Produce	
CATALASA		Produce	
AMONIACO		Produce	
KOESER		Crece	
UTILIZACION DE HIDROCARBUROS COMO FUENTE DE CARBONO EN MEDIOS LIQUIDOS	Benceno	+	(2 días)
	Tolueno	-	(22 días)
	Naftaleno	-	(22 días)
	Xileno	+	(24 horas)
	Antraceno	-	(22 días)
	Gasolina	+	(3 días)
	Gas-oil	+	(24 horas)
Fuel-oil	-	(22 días)	

TABLA CARACTERES QUE DESCRIBEN LA ESTIRPE G-12

		PSEUDOMONAS BOREOPOLIS	G - 12		
CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS	Forma	Bacilos aislados o en parejas	Bacilos aislados		
	Tamaño	0,5 a 1 x 2 a 3 u	1 u		
	Movilidad	Móvil. Flagelos polares	Flagelos polares		
	Tinción de Gram	G (-)	G (-)		
	Esporas	No posee	No posee		
COLONIAS EN AGAR	Forma	Circular o ameboide	Ameboide		
	Superficie	Plana y lisa	Lisa		
	Color	Blanco, bordes traslúcidos	Crema		
	Brillo	Brillante	Brillante		
	Elevación	Escasa	Ligeramente alzada en el centro		
AGAR INCLINADO	Crecimiento	No descrito	Abundante		
	Forma	Filiforme	Ameboide		
	Brillo	Brillante, fluorescente	Brillante		
	Color	Blanquecino	Blanco		
	Superficie	Alzada	Alzada en el centro		
CALDO COMÚN	Crecimiento en superficie	No descrito	Película superficial		
	Turbidez	Ligera	Homogénea		
	Sedimento	No descrito	Sedimento escaso		
CRECIMIENTO EN GELATINA	Crecimiento	No descrito			
	Elasticación	Licida	Licida		
ACCION SOBRE LA LECHE TORNASOL		No descrita	Alcalinización, peptonización		
ACCION SOBRE LOS NITRITOS		Reducción de nitratos a nitritos, algunas estirpes	Produce nitritos		
PRODUCCION DE INDOL		No descrito	No produce		
PRODUCCION DE SH ₂		No descrito	No produce		
HIDROLISIS DE ALMIDON		No hidroliza	No hidroliza		
		<u>Acido</u>	<u>Gas</u>	<u>Acido</u>	<u>Gas</u>
UTILIZACION DE AZUCARES EN MEDIOS LIQUIDOS	Xylosa	-	-	-	-
	Glucosa	+	-	+	-
	Lactosa	-	-	-	-
	Sacarosa	-	-	-	-
	Maltosa	-	-	-	-
	Manitol	-	-	-	-
	Galactosa	-	-	+	-
CATALASA		No descrito	Produce		
	OXIDASA	No descrito	No produce		
	AMONIACO	No descrito	Produce		
	FOSSER	No descrito	Crece		
UTILIZACION DE HIDROCARBUROS COMO FUENTE DE CARBONO EN MEDIOS LIQUIDOS	Benceno	No descrito	++ (3 días)		
	Tolueno	No descrito	+ (6 días)		
	Naftaleno	No descrito	+ (2 días)		
	Xileno	No descrito	++ (2 días)		
	Antraceno	No descrito	+ (6 días)		
	Gasolina	No descrito	+ (3 días)		
	Gas oil	No descrito	+ (24 horas)		
	Fuel-oil	No descrito	- (22 días)		

TABLA CARACTERES QUE DESCRIBEN LA ESTIRPE A-13

		PSEUDOMONAS DACUNNAE	A-13
CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS	Forma	Bacilos aislados	Bacilos aislados
	Tamaño	0,5 a 0,8 x 1,5 a 3 micras	0,5 x 1,5 micras
	Movilidad	Móvil	Móvil
	Flagelos	1 a 6 flagelos polares	Flagelos polares
	Tinción de Gram	G (-)	G (-)
	Esporas	No posee	No posee
COLONIAS EN AGAR	Forma	Circular ameboidea	Ameboidea
	Superficie	No descrito	Lisa
	Elevación	Plana bordes enteros	Plana, bordes lisos
	Color	Blanco	Blanco
	Brillo	Brillante	Brillante
AGAR INCLINADO	Crecimiento	No descrito	Abundante
	Forma	Filiforme, ondulado	Ondulado
	Brillo	Brillante	Brillante
	Color	Blanquecino	Blanco
	Superficie	Plana	Plana
CALDO COMUN	Crecimiento en superficie	No descrito	Forma anillo superficial
	Turbidez	Abundante	Abundante y homogénea
	Sedimento	No descrito	Sedimento blanco
CRECIMIENTO EN GELATINA	Crecimiento	Colonias circulares, blanquecinas. Superficie lisa. Levantada	
	Licuefacción	No licúa	No licúa
ACCION SOBRE LA LECHE TORNASOL		No descrito	Alcalinización
ACCION SOBRE LOS NITRATOS		No produce nitritos	No produce nitritos
PRODUCCION DE SH ₂		No descrito	Produce
PRODUCCION DE INDOL		No descrito	Negativo
HIDROLISIS DE ALMIDON		No hidroliza	No hidroliza
UTILIZACION DE AZUCARES EN MEDIOS LIQUIDOS		<u>Acido</u>	<u>Gas</u>
	Xyloza	-	-
	Glucosa	-	-
	Lactosa	-	-
	Sacarosa	-	-
	Maltosa	-	-
	Manitol	-	-
Galaetosa	-	-	
OXIDASA		No descrito	Produce
CATALASA		No descrito	Produce
AMONIACO		No descrito	Dudoso
KOSSLER		No descrito	Crece
UTILIZACION DE HIDROCARBUROS COMO FUENTE DE CARBONO EN MEDIOS LIQUIDOS	Benceno	No descrito	++ (3 días)
	Tolueno	No descrito	- (22 días)
	Naftaleno	No descrito	+ (3 días)
	Xileno	No descrito	+ (5 días)
	Antraceno	No descrito	+ (6 días)
	Gasolina	No descrito	- (22 días)
	Gas-oil	No descrito	+ (3 días)
Fuel-oil	No descrito	- (22 días)	

PSEUDOMONAS AERUGINOSA

A - 14

CARACTERISTICAS MORFOLÓGICAS	Forma	Bacilos aislados, en pares o cortas cadenas	Bacilos		
	Tamaño	0,5 a 0,8 x 1,5 u	0,5 x 1,5 u		
	Movilidad	Móvil por flagelos polares	Móvil		
	Tinción de Gram	G (-)	G (-)		
	Esporas	No posee	No posee		
Acido alcohol					
COLONIAS EN AGAR	Forma	Colonias grandes e irregulares	Ameboidea		
	Superficie	No descrita	Lisa		
	Elevación	Escasa	Elevada en el centro		
	Color	Grisáceo, medio verdoso - fluorescente	Crema. Pigmento verde en el medio		
	Brillo	Centro opaco, bordes traslúcidos	Brillante		
AGAR INCLINADO	Crecimiento	Abundante	Abundante		
	Forma	No descrita	Ameboidea		
	Brillo	Brillante	Brillante		
	Color	Blanco. El medio se torna verde opaco o marrón. Fluorescente	Blanco. Pigmento verde al medio		
	Superficie	No descrito	Ligeramente alzada en el centro		
CALDO COMUN	Crecimiento en superficie	Película en superficie	Película superficial		
	Turbidez	Homogénea	Homogénea		
	Sedimento	Escaso	Escaso		
CRECIMIENTO EN GELATINA	Crecimiento	Colonias de bordes irregulares. Superficie granulada amarillenta	-		
	Licuefacción	Licúa	Licúa		
ACCION SOBRE LA LECHE TORNASOL		Coagulación peptonización y reducción del tornasol. Reacción alcalina	Alcalinización. Reducción del tornasol		
ACCION SOBRE NITRATOS		Produce nitritos y a veces nitratos	Produce (5 días)		
PRODUCCION DE SH ₂		No descrito	Produce		
PRODUCCION DE INDOL		No produce generalmente	No produce		
HIDROLISIS DE ALMIDON		No descrito	No hidroliza		
UTILIZACION DE AZUCARES EN MEDIOS LIQUIDOS		<u>Acido</u>	<u>Gas</u>	<u>Acido</u>	<u>Gas</u>
	Xylosa	-	-	+	-
	Glucosa	-	-	+	-
	Lactosa	-	-	-	-
	Sacarosa	-	-	-	-
	Maltosa	-	-	-	-
	Manitol	-	-	-	-
Galectosa	-	-	+	-	
OXIDASA		No descrito		Produce	
	CATALASA	No descrito		Produce	
	AMONIACO	No descrito		Produce	
	KOESER	No descrito		Crece	
UTILIZACION DE HIDROCARBUROS COMO FUENTE DE CARBONO EN MEDIOS LIQUIDOS	Benceno	No descrito		-	(22 días)
	Tolueno	No descrito		-	(22 días)
	Naftaleno	No descrito		-	(22 días)
	Xileno	No descrito		+	(3 días)
	Antraceno	No descrito		-	(22 días)
	Gasolina	No descrito		-	(14 días)
	Gas-oil	No descrito		-	(14 días)
	Fuel-oil	No descrito		-	(22 días)

	PSEUDOMONAS AKEUGINOSA	K-15			
CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS	Forma	Bacilos aislados o en pares o cortas cadenas	Bacilos aislados		
	Tamaño	0,5 a 0,6 x 1,5 micras	0,5 x 1 micras		
	Movilidad	Móvil. Flagelos polares	Móvil. Flagelos polares		
	Tinción de Gram	G (-)	G (-)		
	Esporas	No posee	No posee		
Acido alcohol					
COLONIAS EN AGAR	Forma	Colonias grandes e irregulares	Tamaño medio		
	Superficie	No descrito	Centro abultado bordes lisos		
	Color	Grisáceo, medio verde. - Fluorescente	Crema		
	Brillo	Centro opaco, bordes traslúcidos	Centro opaco, bordes traslúcidos		
	Elevación	Escasa	Escasa		
AGAR INCLINADO	Crecimiento	Abundante	Abundante		
	Forma	No descrito	Circular		
	Brillo	Brillante	Centro opaco y bordes traslúcidos		
	Color	Blanco, medio borde y marrón. Fluorescente	Blanco crema		
	Superficie	No descrito	Centro hundido y bordes lisos		
CALDO COMUN	Crecimiento en superficie	Forma película superficial	Ligero anillo superficial		
	Turbidez	Abundante	Abundante y homogénea		
	Sedimento	Abundante	No presenta		
CRECIMIENTO EN GELATINA	Crecimiento	Bordes irregulares. Superficie granular. Amarillentas			
	Licuefacción	Licúa	Licúa		
ACCION SOBRE LA LECHE TORNASOL	Coagulación, peptonización, red. del tornasol. Reacción alcalina	Alcalinización			
ACCION SOBRE LOS NITRATOS	Produce nitritos y nitrogeno	No produce			
PRODUCCION DE SH ₂	No descrito	Produce			
PRODUCCION DE INDOL	No produce generalmente	No produce			
HIDROLISIS DE ALMIDON	No descrito	No hidroliza			
UTILIZACION DE AZUCARES EN MEDIOS LIQUIDOS	<u>Acido</u>	<u>Gas</u>	<u>Acido</u>	<u>Gas</u>	
	Xylosa	-	-	-	
	Glucosa	-	-	+	-
	Lactosa	-	-	-	-
	Sacarosa	-	-	-	-
	Maltosa	-	-	-	-
	Manitol	-	-	-	-
Galactosa	-	-	+	-	
OXIDASA	No descrito		Produce		
	CATALASA	No descrito	Produce		
	AMONIACO	No descrito	Produce		
	ROSER	No descrito	Crece		
UTILIZACION DE HIDROCARBUROS COMO FUENTE DE CARBONO EN MEDIOS LIQUIDOS	Benceno	No descrito	- (22 días)		
	Tolueno	No descrito	- (22 días)		
	Naftaleno	No descrito	+ (6 días)		
	Xileno	No descrito	+ (24 horas)		
	Antraceno	No descrito	- (22 días)		
	Gasolina	No descrito	+ (3 días)		
	Gas-oil	No descrito	+ (3 días)		
Fuel-oil	No descrito	- (22 días)			

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS	Forma	Bacilos redondeados aislados o en cortas cadenas	Bacilos		
	Tamaño	No descrito	0,5 x 1 micra		
	Movilidad	Móvil	Móvil		
	Flagelos	1 a 5 polares	Polares		
	Tinción de Gram	G (-)	G (-)		
	Esporas	No posee	No posee		
	Acido alcohol				
COLONIAS EN AGAR	Forma	Circular, bordes enteros	Circular		
	Superficie	Lisa	Lisa		
	Elevación	Ligeramente alzada	Ligeramente alzada en - el centro		
	Color	No descrito	Crema, medio verde por difusión		
	Brillo	No descrito	Brillante		
AGAR INCLINADO	Crecimiento	Abundante	Colonias pequeñas abun-- dantes		
	Forma	No descrito	Redondeada		
	Brillo	No descrito	Brillante		
	Color	Ocre	Verde en el medio		
	Superficie	No descrito	Lisa		
	Olor	Penetrante	Fuerte olor		
CUBO COMUN	Crecimiento en superficie	Produce película de as-- pecto oleaginoso	Anillo		
	Turbidez	Ligera	Ligera		
	Sedimento	Produce	Forma sedimento blanco		
CRECIMIENTO EN GELATINA	Crecimiento	No descrito	-		
	Licuefacción	No licúa	No licúa		
ACCION SOBRE LA LECHE TORNASOL		Acidificación, coagulación y reducción del tornasol	Acidificación dudosa y peptonización		
ACCION SOBRE NITRITOS		No produce nitritos	No produce		
PRODUCCION DE NH ₃		Produce	-		
PRODUCCION DE INDOL		No produce	No produce		
HIDROLISIS DEL ALMIDON		No hidroliza	No hidroliza		
		<u>Acido</u>	<u>Gas</u>		
UTILIZACION DE AZUCARES EN - CULTIVOS LIQUI- DOS	Xylosa	+	-	-	-
	Glucosa	+	-	+	-
	Lactosa	+	-	-	-
	Sacarosa	-	-	-	-
	Maltosa	-	-	-	-
	Manitol	+	-	+	-
	Galactosa	+	-	+	-
OXIDASA CATALASA AMONIACO KOSSEK		No descrito		+	
		+		+	
		No descrito		Produce	
		No descrito		Crece	
UTILIZACION DE HIDROCARBUROS COMO FUENTE DE CARBONO EN ME- DIOS LIQUIDOS	Benceno	No descrito		-	(22 días)
	Tolueno	No descrito		+	(14 días)
	Naftaleno	No descrito		-	(22 días)
	Antraceno	No descrito		+	(9 días)
	Xileno	No descrito		+	(14 días)
	Gasolina	No descrito		+	(14 días)
	Gas-oil	No descrito		+	(2 días)
	Fuel-oil	No descrito		+	(14 días)

PSEUDOMONAS ALMUGINOSA

Pa-17

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS	Forma	Bacilos aislados en pares o cortas cadenas	Bacilos		
	Tamaño	0,5 a 0,6 x 1,5 micras	0,5 x 1,5 micras		
	Movilidad	Móvil	Móvil		
	Tinción de Gram	G (-)	G (-)		
	Flagelos	Polares	Polares		
	Esporas	No posee	No posee		
COLONIAS EN AGAR	Forma	Colonias grandes e irregulares	Pequeñas		
	Superficie	No descrito	Lisa		
	Elevación	Escasa	Escasa		
	Color	Grisáceo, medio verdoso. - Fluorescente	Blanco. Difunde pig. - verde-pardo al medio		
	Brillo	Centro opaco y bordes traslúcidos	Brillante		
AGAR INCLINADO	Crecimiento	Abundante	Abundante		
	Forma	No descrita	Circular		
	Brillo	Brillante	Brillante		
	Color	Blanco, el medio se torna - verde-negro. Fluorescente	Blanco, difunde pig. - verde-pardo al medio		
CALDO COMUN	Superficie	No descrita	Lisa		
	Crecimiento en superficie	Forma película en la superficie	No forma		
	Turbidez	Abundante	Abundante		
	Sedimento	Abundante	No posee		
CRECIMIENTO EN GELATINA	Crecimiento	Colonias bordes irregulares superficie granular	No forma		
	Licuefacción	Licúa	Licúa		
	Color	Amarillo a amarillo verdoso			
ACCION SOBRE LA LECHE TORNASOL		Coagulación, peptonización red. del tornasol. Reacción alcalina	Alcalinización, coagulación		
ACCION SOBRE LOS NITRITOS		Produce nitritos y nitrógeno	No produce		
PRODUCCION DE SH ₂		No descrito			
PRODUCCION DE INDOL		No produce, generalmente	No produce		
HIDROLISIS DEL ALMIDON		No descrito	No hidroliza		
UTILIZACION DE AZUCARES EN CULTIVOS LIQUIDOS		<u>Acido</u>	<u>Gas</u>	<u>Acido</u>	<u>Gas</u>
	Xylosa	-	-	-	-
	Glucosa	-	-	-	-
	Lactosa	-	-	-	-
	Sacarosa	-	-	-	-
	Maltona	-	-	-	-
	Manitol	-	-	-	-
Galactosa	-	-	-	-	
OXIDASA	No descrito	Produce			
CATALASA	No descrito	Produce			
AMONIACO	No descrito	Produce			
KONGER	No descrito	Crece			
UTILIZACION DE HIDROCARBUROS COMO FUENTE DE CARBONO EN MEDIOS LIQUIDOS	Benceno	No descrito	+ (1 día)		
	Tolueno	No descrito	- (22 días)		
	Naftaleno	No descrito	- (22 días)		
	Xileno	No descrito	+ (9 días)		
	Antraceno	No descrito	- (22 días)		
	Gasolina	No descrito	+ (2 días)		
	Gas-oil	No descrito	+ (1 día)		
	Fuel-oil	No descrito	+ (1 día)		

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS	Forma	Bacilos aislados, en pares o cortas cadenas	Bacilos aislados		
	Tamaño	0,5 a 0,6 x 1,5 micras	0,5 x 1 micras		
	Movilidad	Móvil	Móvil		
	Flagelos	Polares	Polares		
	Tinción de Gram	G (-)	G (-)		
	Esporas	No posee	No posee		
COLONIAS EN AGAR	Forma	Colonias grandes e irregulares	Ameboide, tamaño pequeño		
	Superficie	No descrito	Lisa		
	Elevación	Escasa	Ligeramente alzada en el centro		
	Color	Grisáceo	Blanco - crema		
	Brillo	Centro opaco, bordes traslúcidos	Brillante		
AGAR INCLINADO	Crecimiento	Abundante	Abundante		
	Forma	No descrita	Circular		
	Brillo	Brillante	Brillante		
	Color	Blanco	Blanco - crema		
	Superficie	No descrito	Ligeramente alzada		
CALDO COMUN	Crecimiento en superficie	Forma película superficial	Anillo superficial		
	Turbidez	Abundante	Homogénea		
	Sedimento	Abundante	Gran cantidad de sedimento filiforme		
CRECIMIENTO EN GELATINA	Crecimiento	Bordes irregulares. Superficie irregular	-		
	Licuefacción	Licúa	Licúa		
ACCION SOBRE LA LECHE TORNASOL		Coagulación, peptonización, reducción del tornasol. Alcalinización	Alcalinización y peptonización		
ACCION SOBRE LOS NITRATOS		Produce nitritos y nitrógeno	Produce nitritos		
PRODUCCION DE NH ₂		No descrito			
PRODUCCION DE INDOL		No produce generalmente	No produce		
HIDROLISIS DE ALMIDON		No descrito	Hidroliza		
UTILIZACION DE AZÚCARES EN CUL TIVOS LIQUIDOS		<u>Acido</u>	<u>Gas</u>	<u>Acido</u>	<u>Gas</u>
	Xylosa	-	-	-	-
	Glucosa	-	-	+	-
	Lactosa	-	-	-	-
	Sacarosa	-	-	-	-
	Maltosa	-	-	-	-
	Manitol	-	-	++	-
Galactosa	-	-	-	-	
OXIDASA CATALASA AMONIACO KOSSER		No descrito		Produce	
		No descrito		Produce	
		No descrito		Produce	
		No descrito		Crece	
UTILIZACION DE HIDROCARBUROS COMO FUENTE DE CARBONO EN ME DIOS LIQUIDOS	Benceno	No descrito		+	
	Tolueno	No descrito		+	(24 horas)
	Naftaleno	No descrito		-	(22 días)
	Xileno	No descrito		+	(24 horas)
	Antraceno	No descrito		+	(2 días)
	Gasolina	No descrito		+	(24 horas)
	Gas-oil	No descrito		+	(24 horas)
Fuel-oil	No descrito		+	(6 días)	

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS	Forma	Bacilos aislados, en pares o cortas cadenas	Bacilos aislados o en parejas		
	Tamaño	0,5 a 0,6 x 1,5 micras	0,5 x 1,5 micras		
	Movilidad	Móvil	Móvil		
	Flagelos	Polares	Polares		
	Tinción de Gram	G (-)	G (-)		
	Esporas	No posee	No posee		
COLONIAS EN AGAR	Forma	Colonias grandes e irregu- lares	Grandes e irregulares		
	Superficie	No descrito	Lisa		
	Elevación	Escasa	Centro abultado y bor- des lisos		
	Color	Grisáceo, el medio se torna verde fluorescente	Difunde pig. al medio		
Brillo	Centro opaco y bordes tras- lúcidos	Brillante			
AGAR INCLINADO	Crecimiento	Abundante	Abundante		
	Forma	No descrita	Ameboide, borde ligera- mente dentado		
	Brillo	Brillante	Brillante		
	Color	Blanco el medio se torna - verde-marrón. Fluorescente	Crema		
	Superficie	No descrito	Lisa		
CALDO COMUN	Crecimiento en superficie	Forma película en superfi- cie	Anillo superficial		
	Turbidez	Abundante	Abundante		
	Sedimento	Abundante	Sedimento filamentoso		
CRECIMIENTO EN GELATINA	Crecimiento	Colonias bordes irregula- res y superficie granular	-		
	Liquefacción	Licúa	Licúa		
ACCION SOBRE LA LECHE TORNASOL		Coagulación, peptonización y reducción del tornasol. Reacción alcalina	Alcalinización y pep- tonización		
ACCION SOBRE LOS NITRITOS		Produce nitritos y nitrógeno	No produce		
PRODUCCION DE NH ₂		No descrito	-		
PRODUCCION DE INDOL		No produce generalmente	No produce		
HIDROLISIS DE ALMIDON		No descrito	Débil		
UTILIZACION DE AZUCARES EN CUL- TIVOS LIQUIDOS		<u>Acido</u>	<u>Gas</u>	<u>Acido</u>	<u>Gas</u>
	Xylosa	-	-	-	-
	Glucosa	-	-	-	-
	Lactosa	-	-	-	-
	Sacarosa	-	-	-	-
	Maltosa	-	-	-	-
	Manitol	-	-	+	-
Galactosa	-	-	+	-	
OXIDASA		No descrito		Produce	
	CATALASA	No descrito		Produce	
	AMONIACO	No descrito		No produce	
	KONNER	No descrito		Crece	
UTILIZACION DE HIDROCARBUROS COMO FUENTE DE CARBONO EN ME- DIOS LIQUIDOS	Benceno	No descrito		-	(22 días)
	Tolueno	No descrito		-	(22 días)
	Naftaleno	No descrito		-	(22 días)
	Xileno	No descrito		-	(22 días)
	Antraceno	No descrito		-	(22 días)
	Gasolina	No descrito		+	(24 horas)
	Gas-oil	No descrito		+	(48 horas)
	Fuel-oil	No descrito		+	(24 horas)

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS	Forma	Bacilos aislados en pares o cortas cadenas			
	Tamaño	0,5 a 0,6 x 1,5 micras	0,5 x 1,5 micras		
	Movilidad	Móvil	Móvil		
	Flagelos	Polares	Polares		
	Tinción de Gram	G (-)	G (-)		
	Esporas				
COLONIAS EN AGAR	Forma	Colonias grandes e irregulares	Grandes e irregulares		
	Superficie	No descrito	Lisa		
	Color	Grisáceo, medio verdoso. - Fluorescente	Verdoso. Pig. difudible al medio		
	Brillo	Centro opaco y bordes transparentes	Brillante		
	Elevación	Escasa	Convexa		
AGAR INCLINADO	Crecimiento	Abundante	Abundante		
	Forma	No descrita	Circular		
	Brillo	Brillante	Brillante		
	Color	Bianco, al medio se torna verde. Fluorescente	Bianco - crema		
CALDO COMUN	Superficie	No descrito	Lisa		
	Crecimiento en superficie	Forma película en superficie	No forma película		
	Turbidez	Abundante	Abundante y homogénea		
CRECIMIENTO EN GELATINA	Sedimento	Abundante	Filamentoso		
	Crecimiento	Bordes irregulares superficie granular	-		
ACCION SOBRE LA LECHE TORNASOL	Liquefacción	Licúa	Licúa		
		Coagulación, peptonización y reducción del tornasol. Reacción alcalina	Alcalinización y peptonización		
ACCION SOBRE LOS NITRATOS	PRODUCCION DE SH ₂	Producen nitritos y nitratos	Produce (1 día)		
	PRODUCCION DE INDOL	No descrito	Produce		
	PRODUCCION DE AMONIACO	No produce generalmente	No produce		
	HIDROLISIS DEL ALMIDON	No descrito	No hidroliza		
UTILIZACION DE AZUCARES EN MEDIOS LIQUIDOS		<u>Acido</u>	<u>Gas</u>	<u>Acido</u>	<u>Gas</u>
	Xilosa	-	-	-	-
	Glucosa	-	-	+	-
	Lactosa	-	-	-	-
	Sacarosa	-	-	-	-
	Maltosa	-	-	-	-
	Manitol	-	-	+	-
Galactosa	-	-	+	-	
OXIDASA		No descrito		Produce	
	CATALASA	No descrito		Produce	
	AMONIACO	No descrito		No produce	
	KOESLER	No descrito		Crece	
UTILIZACION DE HIDROCARBUROS COMO FUENTE DE CARBONO EN MEDIOS LIQUIDOS	Benceno	No descrito		-	(22 días)
	Tolueno	No descrito		-	(22 días)
	Naftaleno	No descrito		-	(22 días)
	Xileno	No descrito		-	(22 días)
	Antraceno	No descrito		-	(22 días)
	Gasolina	No descrito		+	(3 días)
	Gasoil	No descrito		+	(6 días)
	Fuel-oil	No descrito		+	(1 día)

TABLA CARACTERES QUE DESCRIBEN LA ESTIRPE G-26

		PSEUDOMONAS HILDENBERGII	G-26			
CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS	Forma	Bacilos aislados, extremos redondeados	Bacilos			
	Tamaño	0,3 a 0,5 x 1 a 3,5 micras	0,5 x 1 micras			
	Movilidad	Móviles	Móviles			
	Flagelos	Polares	Polares			
	Tinción de Gram	G (-)	G (-)			
	Esporas	No posee	No posee.			
COLONIAS EN AGAR	Forma	Circular bordes enteros	Circulares bordes lisos			
	Superficie	No descrito	Rugosa			
	Elevación	No descrito	Escasa, convexa			
	Color	Amarillento	Blanco - crema			
	Brillo	Iridiscente	Brillante			
AGAR INCLINADO	Crecimiento	Escaso	Abundante			
	Forma	No descrita	Circular			
	Brillo	Fluorescente	Brillante			
	Color	Verdoso	Blanco - crema			
	Superficie	Lisa	Lisa			
CALDO COMUN	Crecimiento en superficie	No produce velo	Forma velo			
	Turbidez	Produce	Abundante, homogénea			
	Sedimento	Escaso	No produce			
CRECIMIENTO EN GELATINA	Crecimiento	Superficie lisa bordes - aizados brillantes	-			
	Licuefacción	Licúa	No licúa			
ACCION SOBRE LA LECHE TORNASOL		No coagula. Produce un - anillo azulado	Alcalina			
ACCION SOBRE LOS NITRATOS		No produce nitritos	No produce			
PRODUCCION DE SH ₂		No descrito	Produce pig. verde - difusible			
PRODUCCION DE INDOL		No produce	No produce			
HIDROLISIS DE ALMIDON		No descrito	No hidroliza			
UTILIZACION DE AZUCARES EN CULTIVOS LIQUIDOS		<u>Acido</u>	<u>Gas</u>	<u>Acido</u>	<u>Gas</u>	
		Xylosa	-	-	+	-
		Glucosa	-	-	+	-
		Lactosa	-	-	-	-
		Sacarosa	-	-	-	-
		Maltosa	-	-	-	-
		Mannitol	-	-	+	-
	Galactosa	-	-	+	-	
OXIDASA		No descrito		Produce		
	CATALASA	No descrito		Produce		
	AMONIACO	No descrito		Dudoso		
	KOESER	No descrito		Crece		
UTILIZACION DE HIDROCARBUROS COMO FUENTE DE CARBONO EN MEDIOS LIQUIDOS		Benceno	No descrito		+ (1 día)	
		Tolueno	No descrito		+ (3 días)	
		Naftaleno	No descrito		+ (3 días)	
		Xileno	No descrito		+ (3 días)	
		Antraceno	No descrito		+ (3 días)	
		Gasolina	No descrito		+ (3 días)	
		Gas-oil	No descrito		+ (3 días)	
	Fuel-oil	No descrito		- (22 días)		

PSEUDOMONAS AERUGINOSA

G-31

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS					
	Forma	Bacilos aislados, en parejas o cortas cadenas		Bacilos aislados	
	Tamaño	0,5 a 0,6 x 1,5 micras		0,5 x 1 micra	
	Movilidad	Móviles		Móviles	
	Tinción de Gram	G (-)		G (-)	
	Esporas	No posee		No posee	
	Flagelos	Polares		Polares	
COLONIAS EN AGAR					
	Forma	Colonias grandes e irregulares		-	
	Superficie	No descrito		-	
	Color	Grisáceo, medio verde. Fluorescente		Blanco, difunde pig. verde al medio	
	Brillo	Centro opaco y bordes traslúcidos		-	
	Elevación	Escasa		-	
AGAR INCLINADO					
	Crecimiento	Abundante			
	Forma	No descrito			
	Brillo	Brillante			
	Color	Blanco, el medio se torna verde, marrón o negro			
	Superficie	No descrito			
CALDO COMUN					
	Crecimiento en superficie	Forma película superficial			
	Turbidez	Abundante			
	Sedimento	Abundante			
CRECIMIENTO EN GELATINA					
	Crecimiento	Colonias grandes e irregulares superficie granular			
	Licuefacción	Licúa		Licúa	
ACCION SOBRE LA LECHE TORNASOL					
		Coagulación, peptonización Red. del tornasol y alcalinización		Alcalinización. Red. del tornasol y peptonización	
ACCION SOBRE LOS NITRATOS					
		Produce nitritos y nitrógeno		Produce nitritos	
PRODUCCION DE SH ₂					
		No descrito		Produce	
PRODUCCION DE INDOL					
		No produce generalmente		No produce	
HIDROLISIS DEL ALMIDON					
		No descrito		No hidroliza	
UTILIZACION DE AZUCARES EN MEDIOS LIQUIDOS					
		<u>Acido</u>	<u>Gas</u>	<u>Acido</u>	<u>Gas</u>
	Xylosa	-	-	+	-
	Glucosa	-	-	+	-
	Lactosa	-	-	-	-
	Sacarosa	-	-	-	-
	Maltosa	-	-	-	-
	Manitol	-	-	-	-
	Gelactosa	-	-	+	-
OXIDASA					
		No descrito		Produce	
CATALASA					
		No descrito		Produce	
AMONIACO KOSEER					
		No descrito		Produce	
UTILIZACION DE HIDROCARBUROS COMO FUENTE DE CARBONO EN MEDIOS LIQUIDOS					
	Benceno	No descrito			
	Tolueno	No descrito			
	Naftaleno	No descrito			
	Xilosa	No descrito			
	Antraceno	No descrito			
	Gasolina	No descrito			
	Gas-oil	No descrito			
	Fuel-oil	No descrito			

PSEUDOMONAS RATHONIS

G-33

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS	Forma	Bacilos aislados o en pares	Bacilos aislados		
	Tamaño	0,5 a 1 x 1 a 3 micras	0,5 x 2 micras		
	Movilidad	Móviles	Móviles		
	Flagelos	Polares	Polares		
	Tinción de Gram	G (-)	G (-)		
	Esporas	No posee	No posee		
COLONIAS EN AGAR	Forma	Circulares	Ameboides		
	Superficie	Lisa	Lisa		
	Color	No descrito	Crema		
	Brillo	Brillante	Brillante		
	Elevación	Excesa	Convexa		
AGAR INCLINADO	Crecimiento	Filiforme	Abundante		
	Forma	No descrito	Circular, bordes enteros		
	Brillo	Brillante	Brillante		
	Color	No descrito	Crema		
	Superficie	Convexa	Convexa		
CALDO COMUN	Superficie	Produce película	Forma película		
	Turbidez	Produce	Produce		
	Sedimento	No produce	No produce		
CRECIMIENTO EN GELATINA	Crecimiento	Colonias areolares, blancas y brillantes			
	Licuefacción	No descrito	No licúa		
ACCION SOBRE LA LECHE TORNASOL		No descrito	Alcalinización		
ACCION SOBRE LOS NITRATOS		Produce nitritos	Produce nitritos		
PRODUCCION DE SH ₂		No descrito	No produce		
PRODUCCION DE INDOL		No descrito	No produce		
HIDROLISIS DE ALMIDON		Hidroliza	Hidroliza		
UTILIZACION DE AZUCARES EN MEDIOS LIQUIDOS		<u>Acido</u>	<u>Gas</u>	<u>Acido</u>	<u>Gas</u>
	Xylosa	-	-	+	-
	Glucosa	+	-	+	-
	Lactosa	-	-	-	-
	Sacarosa	-	-	-	-
	Maltosa	-	-	-	-
	Manitol	-	-	-	-
Galactosa	-	-	-	-	
OXIDASA		No descrito		Produce	
CATALASA		No descrito		Produce	
AMONIACO		No descrito		Produce	
KOESER		No descrito		Crece	
UTILIZACION DE HIDROCARBUROS COMO FUENTE DE CARBONO EN MEDIOS LIQUIDOS	Benceno	No descrito			+ (3 días)
	Tolueno	No descrito			+ (24 horas)
	Naftaleno	Ataca			+ (24 horas)
	Xileno	No descrito			+ (24 horas)
	Antraceno	No descrito			+ (24 horas)
	Gasolina	No descrito			+ (24 horas)
	Gas-oil	No descrito			±
	Fuel-oil	No descrito			+ (24 horas)

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS	Forma	Bacilos aislados, en pares o cortas cadenas	Bacilos aislados		
	Tamaño	0,5 a 0,6 x 1,5 micras	0,5 x 1 micras		
	Flagelos	Móvil por flagelos polares	Móvil. Flagelos polares		
	Tinción de Gram	G (-)	G (-)		
	Esporas	No posee	No posee		
COLONIAS EN AGAR	Forma	Colonias grandes e irregulares	Grandes y ameboides		
	Superficie	No descrito	Lisa		
	Elevación	Escasa	Centro elevado		
	Color	Grisáceo, al medio se torna verde, marrón o negro	Crema. Difunde al medio pig. verde		
	Brillo	Centro opaco y bordes traslúcidos	Brillante		
AGAR INCLINADO	Crecimiento	Abundante	Abundante		
	Forma	No descrita	Ameboide		
	Brillo	Brillante	Brillante		
	Color	Blanco, difunde pig. verde	Blanco - crema. Difunde pig. verde al medio		
	Superficie	No descrita	Lisa		
CALDO COMUN	Crecimiento en superficie	Forma película en superficie	Película superficial		
	Turbidez	Abundante	Produce		
	Sedimento	Abundante	Produce		
CRECIMIENTO EN GELATINA	Crecimiento	Colonias con bordes irregulares. Superficie granular	-		
	Licuefacción	Licúa	No licúa		
ACCION SOBRE LA LECHE TORNASOL		Coagulación peptonización Reducción del tornasol. - Reacción alcalina	Alcalinización coagulación y reducción del tornasol		
ACCION SOBRE LOS NITRATOS		Produce nitritos y nitrógeno	Produce		
PRODUCCION DE SH ₂		No descrito	Produce en profundidad		
PRODUCCION DE INDOL		No produce generalmente	No produce		
HIDROLISIS DE ALMIDON		No descrito			
UTILIZACION DE AZUCARES EN MEDIOS LIQUIDOS		<u>Acido</u>	<u>Gas</u>	<u>Acido</u>	<u>Gas</u>
	Xylosa	-	-	+	-
	Glucosa	-	-	-	-
	Lactosa	-	-	-	-
	Sacarosa	-	-	+	-
	Maltosa	-	-	+	-
Manitol	-	-	-	-	
Galactosa	-	-	-	-	
OXIDASA		No descrito		Produce	
CATALASA		No descrito			
AMONIACO		No descrito		Produce	
ROBBER		No descrito		Crece	
UTILIZACION DE HIDROCARBUROS COMO FUENTE DE CARBONO EN MEDIOS LIQUIDOS	Benceno	No descrito			
	Tolueno	No descrito			
	Naftaleno	No descrito			
	Xileno	No descrito			
	Antraceno	No descrito			
	Gasolina	No descrito			
Gas-oil	No descrito				
Fuel-oil	No descrito				

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	Forma	Bacilos aislados, en pares o cortas cadenas	Bacilos aislados o en pares		
	Tamaño	0,5 a 0,6 x 1,5 micras	0,5 x 1 micras		
	Movilidad	Móvil	Móvil		
	Tinción de Gram	G (-)	G (-)		
	Esporas	No posee	No posee		
	Flagelos	Polares	Polares		
COLONIAS EN AGAR	Forma	Colonias grandes e irregulares	Grandes ameboideas		
	Superficie	No descrito	Lisa		
	Elevación	Escasa	Elevada en el centro		
	Color	Grisáceo, medio verde fluorescente	Blanco-crema, medio verde fluorescente		
	Brillo	Centro opaco y bordes traslúcidos	Brillante		
AGAR INCLINADO	Crecimiento	Abundante	Abundante		
	Forma	No descrito	Ameboidea		
	Brillo	Brillante	Brillante		
	Color	Bianco, al medio se torna marrón o negro fluorescente	Crema. Difunde al medio pig. verde		
	Superficie	No descrito	Lisa		
CALDO COMUN	Crecimiento en superficie	Forma película superficial	Forma película		
	Turbidez	Abundante	Abundante		
	Sedimento	Abundante	Abundante		
CRECIMIENTO EN GELATINA	Crecimiento	Colonias bordes irregulares superficie granular. Amarillentas o amarillas verdosas			
	Licuefacción	Licúa	Licúa		
ACCION SOBRE LA LECHE TORNASOL		Coagulación, peptonización y reducción del tornasol. Reacción alcalina	Peptonización. Alcalinización y reducción del tornasol		
ACCION SOBRE LOS NITRATOS		Produce nitritos y nitrógeno	Produce nitratos		
PRODUCCION DE SH ₂		No descrito	Produce		
PRODUCCION DE INDOL		No produce generalmente	No produce		
HIDROLISIS DE ALMIDON		No descrito	No hidroliza		
UTILIZACION DE AZUCARES EN MEDIOS LIQUIDOS		<u>Acido</u>	<u>Gas</u>	<u>Acido</u>	<u>Gas</u>
	Xylosa	-	-	+	-
	Glucosa	-	-	-	-
	Lactosa	-	-	-	-
	Sacarosa	-	-	-	-
	Maltosa	-	-	-	-
	Manitol	-	-	-	-
Galactosa	-	-	+	-	
OXIDASA		No descrito		Produce	
CATALASA		No descrito		Produce	
AMONIACO		No descrito		Produce	
POSSLER		No descrito		Produce	
UTILIZACION DE HIDROCARBUROS COMO FUENTE DE CARBONO EN MEDIOS LIQUIDOS	Benceno	No descrito		+	(24 horas)
	Tolueno	No descrito		+	(24 horas)
	Naftaleno	No descrito		+	(24 horas)
	Xileno	No descrito		+	(24 horas)
	Antraceno	No descrito		+	(24 horas)
	Gasolina	No descrito			
	Gas-oil	No descrito		+	(24 horas)
	Fuel-oil	No descrito		+	(18 días)

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS	Forma	Bacilos aislados en pares o en cadenas	Bacilos aislados		
	Tamaño	No descrito	0,5 x 1 micras		
	Movilidad	Móviles	Móvil		
	Tinción de Gram	G (-)	G (-)		
	Flagelos	Polares	Polar		
	Esporas	No posee	No posee		
COLONIAS EN AGAR	Forma	No descrita	Circular, pequeña		
	Superficie	No descrita	Lisa		
	Elevación	No descrita	Convexa		
	Color	No descrita	Crema		
	Brillo	No descrito	Brillante		
AGAR INCLINADO	Crecimiento	No descrito	Abundante		
	Forma	Irregular. Colonias convexas	Circular		
	Brillo	Brillante	Brillante		
	Color	Blanco grisáceo. No produce pigmento	Crema. No produce pigmento		
	Superficie	Lisa	Lisa		
CALDO COMUN	Crecimiento	Forma película que se adhiere a las paredes del tubo	Forma película superficial		
	Turbidez	Homogénea	Produce		
	Sedimento	No produce	No produce		
CRECIMIENTO EN GELATINA	Crecimiento	Colonias circulares, elevadas brillantes, blancas de bordes enteros. Nódulo central			
	Licuefacción	Lenta licuefacción	Ligera		
ACCION SOBRE LA LECHE TORNASOL		Alcalinización, peptonización, lenta. Reduce el tornasol	Alcalinización. Peptonización lenta. Coagulación		
ACCION SOBRE LOS NITRATOS		No descrito	No produce nitritos		
PRODUCCION SH ₂		No descrito	No produce		
PRODUCCION DE INDOL		No produce	No produce		
HIDROLISIS DE ALMIDON		No descrito	Hidroliza		
UTILIZACION DE AZUCARES EN MEDIOS LIQUIDOS		<u>Acido</u>	<u>Gas</u>	<u>Acido</u>	<u>Gas</u>
	Xylosa	No descrito		+	-
	Glucosa	No descrito		+	-
	Lactosa	No descrito		-	-
	Sacarosa	No descrito		-	-
	Maltosa	No descrito		-	-
	Manitol	No descrito		-	-
Galactosa	No descrito		-	-	
OXIDASA		No descrito	Produce		
	CATALASA	No descrito	Produce		
	AMONIACO	No descrito	No produce		
	ROSEER	No descrito	Crece		
UTILIZACION DE HIDROCARBUROS COMO FUENTE DE CARBONO EN MEDIOS LIQUIDOS	Benceno	No descrito	+ (24 horas)		
	Tolueno	No descrito	+		
	Naftaleno	No descrito	+ (8 días)		
	Xileno	No descrito	+ (24 horas)		
	Antraceno	No descrito	+ (24 horas)		
	Gasolina	No descrito			
	Gas-oil	No descrito	+		
Fuel-oil	No descrito	+ (18 días)			

	PSEUDOMONAS AERUGINOSA	P-38			
CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS	Forma	Bacilos aislados en pares o cortas cadenas	Bacilos aislados o en parejas		
	Tamaño	0,5 a 0,6 x 1,5 micras	0,5 x 1 micras		
	Movilidad	Móviles	Móviles		
	Tinción de Gram	G (-)	G (-)		
	Flagelos	Polares	Polares		
	Esporas	No posee	No posee		
COLONIAS EN AGAR	Forma	Colonias grandes e irregulares	Colonias ameboides grandes		
	Superficie	No descrita	Lisa		
	Elevación	Escasa	Convexa		
	Color	Grisáceo, el medio se torna verde fluorescente marrón o negro	Crema. Difunde pig. verde al medio		
	Brillo	Centro opaco y bordes traslúcidos	Brillante		
AGAR INCLINADO	Crecimiento	Abundante	Abundante		
	Forma	No descrito	Ameboidea		
	Brillo	Brillante	Brillante		
	Color	Blanco, el medio se torna verde, marrón o negro. Fluorescente	Crema. Difunde pig. verde al medio, que se ennegrece con el tiempo		
	Superficie	No descrito	Lisa		
CALDO COMUN	Crecimiento en superficie	Forma película superficial	Forma película superficial		
	Turbidez	Abundante	Abundante		
	Sedimento	Abundante	Sedimento escaso		
CRECIMIENTO EN RELATINA	Crecimiento	Colonias bordes irregulares superficie granular, amarillo-verdoso			
	Licuefacción	Licúa	Licúa		
ACCION SOBRE LA LECHE TORNASOL		Coagulación, peptonización y reducción del tornasol. -- Reacción alcalina	Alcalinización, peptonización. Reducción del tornasol		
ACCION SOBRE LOS NITRATOS		Produce nitritos y nitrógeno	Produce nitritos		
PRODUCCION DE SH ₂		No descrito	Produce		
PRODUCCION DE INDOL		No produce generalmente	No produce		
HIDROLISIS DEL ALMIDON		No descrito	No hidroliza		
UTILIZACION DE AZUCARES EN MEDIOS LIQUIDOS		<u>Acido</u>	<u>Gas</u>	<u>Acido</u>	<u>Gas</u>
	Xylosa	-	-	+	-
	Glucosa	-	-	-	-
	Lactosa	-	-	-	-
	Sacarosa	-	-	-	-
	Maltosa	-	-	-	-
	Manitol	-	-	-	-
Galactosa	-	-	+	-	
OXIDASA		No descrito		Produce	
	CATALASA	No descrito		Produce	
	AMONIACO	No descrito		Produce	
	KOESSER	No descrito		Crece	
UTILIZACION DE HIDROCARBUROS COMO FUENTE DE CARBONO EN MEDIOS LIQUIDOS	Benceno	No descrito		+	(24 horas)
	Tolueno	No descrito		+	(24 horas)
	Naftaleno	No descrito		+	(20 días)
	Xileno	No descrito		+	(24 horas)
	Antraceno	No descrito		+	(20 días)
	Gasolina	No descrito			
	Gas-oil	No descrito		+	(24 horas)
Fuel-oil	No descrito		+	(18 días)	

		ACHROMOBACTER PARVULUS	Pa-24
CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS	Forma	Bacilos pequeños	Bacilos pequeños
	Tamaño	0,1 a 0,2 x 0,3 a 0,5 m.	0,1 x 0,5 micras
	Movilidad	Inmóviles	Inmóviles
	Flagelos	No poseen	No poseen
	Tinción de Gram	G (-)	G (-)
	Horas	No poseen	No poseen
COLONIAS EN AGAR	Forma	Puntiforme	Muy pequeñas
	Superficie	No descrito	
	Elevación	No descrita	
	Color	No descrito	Incolora
	Brillo	No descrito	
AGAR INCLINADO	Crecimiento	No descrito	Colonias muy pequeñas
	Forma	No descrito	
	Brillo	No descrito	
	Color	No descrito	
	Superficie	No descrito	
CALDO COMÚN	Crecimiento en superficie	No descrito	No forma velo
	Turbidez	Muy escasa	Muy escasa
	Sedimento	Muy descrito	No produce
CRECIMIENTO EN GELATINA	Crecimiento	Colonias puntiformes	Colonias puntiformes
	Liquefacción	No licúan	No licúan
ACCION SOBRE LA LECHE TORNASOL		No descrito	No cambia
ACCION SOBRE LOS NITRATOS		Producen nitritos	Producen nitritos
PRODUCCION DE SH ₂		No descrito	
PRODUCCION DE INDOL		No produce	No produce
HIDROLISIS DE ALMIDON		No hidroliza	No hidroliza
		<u>Acido</u>	<u>Gas</u>
UTILIZACION DE AZUCARES EN MEDIOS LIQUIDOS	Xylosa	No descrito	-
	Glucosa	-	-
	Lactosa	-	-
	Sacarosa	-	-
	Maltosa	No descrito	-
	Manitol	No descrito	-
	Galactosa	No descrito	-
OXIDASA		No descrito	No produce
	CATALASA	No descrito	Produce
	AMONIACO	No descrito	No produce
	KORSER	No descrito	Crece
UTILIZACION DE HIDROCARBUROS COMO FUENTE DE CARBONO EN MEDIOS LIQUIDOS	Benceno	No descrito	+ (24 horas)
	Tolueno	No descrito	- (22 días)
	Naftaleno	No descrito	- (22 días)
	Xileno	No descrito	+ (24 horas)
	Antraceno	No descrito	+ (14 días)
	Gasolina	No descrito	+ (24 horas)
	Gas-oil	No descrito	+ (48 horas)
	Fuel-oil	No descrito	+ (24 horas)

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	Forma	Bacilos aislados en pares o en cadenas	Bacilos aislados o en cadenas		
	Tamaño	0,5 x 1 a 2 micras	0,5 x 2 micras		
	Movilidad	Móviles	Móviles		
	Flagelos	Peritricos	Peritricos		
	Tinción de Gram	G (-)	G (-)		
	Esporas	No poseen	No poseen		
	COLONIAS EN AGAR	Forma	Circulares	Circulares	
Superficie		Lisa	Lisa		
Elevación		No descrita	Plana		
Color		Blanco	Blanco		
Brillo		Opaco	Opaco		
AGAR INCLINADO	Crecimiento	No descrito			
	Forma	No descrito			
	Brillo	No descrito			
	Color	Blanco	Blanco		
	Superficie	No descrita	Lisa		
CALDO COMÚN	Crecimiento en superficie	Película delgada	Forma película		
	Turbidez	Abundante	Abundante		
	Sedimento	Viscoso	Viscoso		
CRECIMIENTO EN GELATINA	Crecimiento	Colonias circulares y grisáceas	Colonias redondas		
	Liquefacción	No licúa	No licúa		
ACCION SOBRE LA LECHE TORNASOL		Alcalinización	Alcalinización		
ACCION SOBRE LOS NITRATOS		Variable	No produce nitritos		
PRODUCCION DE SH ₂		No descrito	Dudoso		
PRODUCCION DE INDOL		No produce	No produce		
HIDROLISIS DE ALMIDON		No descrito	No hidroliza		
UTILIZACION DE AZUCARES EN MEDIOS LIQUIDOS		<u>Acido</u>	<u>Gas</u>	<u>Acido</u>	<u>Gas</u>
	Xylosa	No descrito	-	-	-
	Glucosa	No descrito	-	-	-
	Lactosa	No descrito	-	-	-
	Sacarosa	No descrito	-	-	-
	Maltosa	No descrito	-	-	-
	Manitol	No descrito	-	-	-
Galactosa	No descrito	-	-	-	
OXIDASA		No descrito	No produce		
	CATALASA	No descrito	Produce		
	AMONIACO	No descrito	No produce		
	KOBER	No descrito	No produce		
UTILIZACION DE HIDROCARBUROS COMO FUENTE DE CARBONO EN MEDIOS LIQUIDOS	Benceno	No descrito	+ (3 días)		
	Tolueno	No descrito	+ (3 días)		
	Naftaleno	No descrito	- (22 días)		
	Xileno	No descrito	+ (4 días)		
	Antraceno	No descrito	- (22 días)		
	Gasolina	No descrito	+ (4 días)		
	Gas-oil	No descrito	+ (3 días)		
Fuel-oil	No descrito	+ (11 días)			

4.2. - Pruebas preliminares. Medios de cultivo

4.2.1. - Estudio de la fuente óptima de Nitrógeno

Utilizando gas-oil como fuente única de carbono, se hicieron pruebas para determinar la fuente de nitrógeno óptima y su concentración en los medios de cultivo.

En una primera experiencia, las condiciones de cultivo fueron:

- Medio de sales minerales "A"
- Temperatura 26°C
- pH 7,2
- Fuente de carbono 20 ml gas-oil comercial/litro
- Velocidad de agitación . 150 rpm
- Inóculo 0,2 ml de un cultivo de 72 horas en caldo común
- Tiempo de incubación ... 7 días
- Matraces "erlenmeyer" de 150 cc con 20 ml de medio

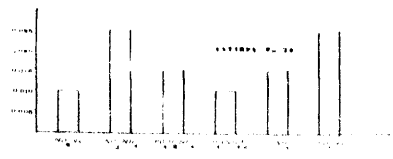
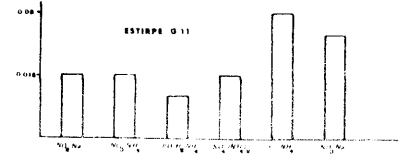
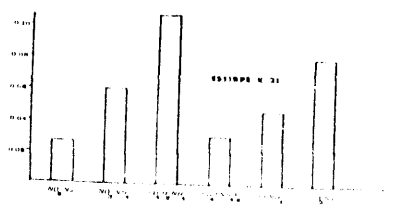
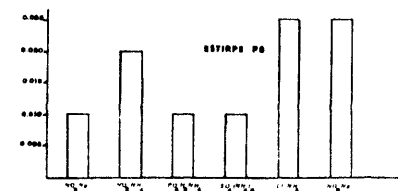
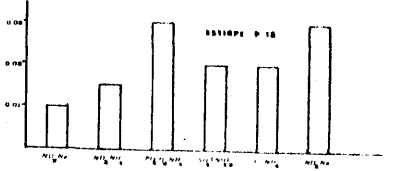
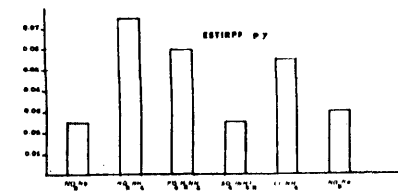
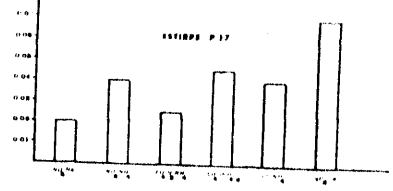
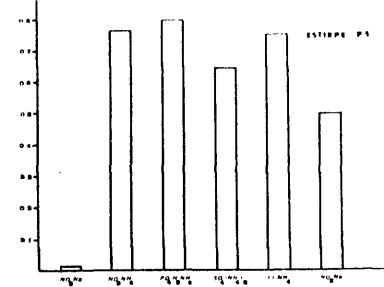
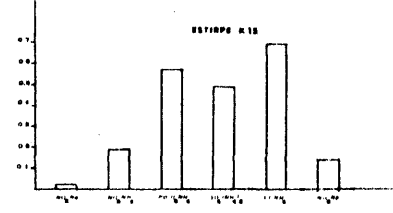
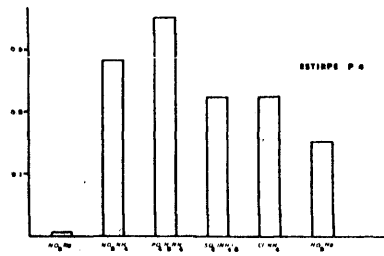
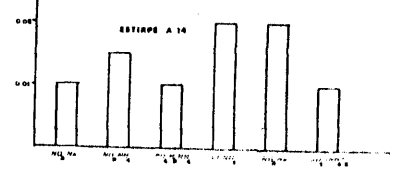
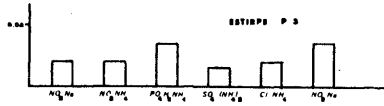
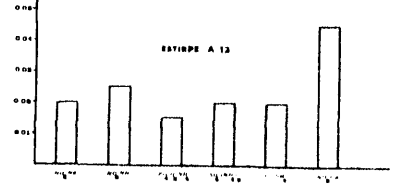
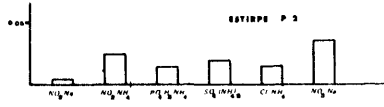
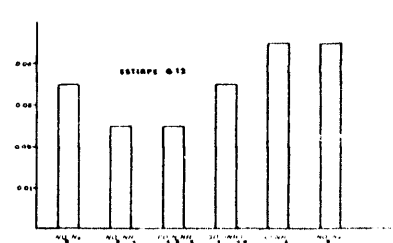
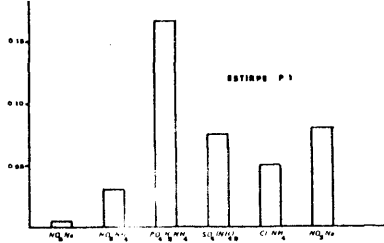
Las medidas de crecimiento se hicieron por turbidimetría.

Las sales nitrogenadas ensayadas fueron las siguientes:

- ClNH₄ 5 gr/l
- NO₃Na 7,43 gr/l
- NO₂Na 6,45 gr/l
- SO₄(NH₄)₂ 6,17 gr/l
- NO₃NH₄ 3,73 gr/l
- PO₄H₂NH₄ 10,8 gr/l

Las cantidades de cada una fueron calculadas en relación con la proporción de nitrógeno, tomando 5 gr/l de ClNH₄ como referencia. No se ensayaron fuentes orgánicas de nitrógeno, para evitar introducir una fuente de carbono distinta del hidrocarburo.

Los resultados se exponen en forma gráfica a continuación (gráfica 1). Como se ve, se probaron 18 estirpes diferentes.



Se puede concluir, que las sales mejor utilizadas en general fueron ClNH_4 , $\text{PO}_4\text{H}_2\text{NH}_4$ y NO_3NH_4 , siendo menor el crecimiento con NO_3Na y $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ y casi nulo con NO_2Na .

En consecuencia, siempre utilizamos en las pruebas -- ClNH_4 , cuyos resultados fueron los más homogéneos.

Los valores numéricos de esta experiencia están representados en la tabla XLIII.

ESTUDIO DE LA FUENTE OPTIMA DE NITROGENO

Valores de absorbancia a 500 m μ . una vez

extraído el resto de hidrocarburo

TABLA XLIII -

Microorganismo	NO_2Na	NO_3NH_4	$\text{PO}_4\text{H}_2\text{NH}_4$	$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	ClNH_4	NO_3Na
P - 1	0,005	0,030	0,165	0,075	0,050	0,080
P - 2	0,005	0,025	0,015	0,020	0,015	0,035
P - 3	0,020	0,020	0,035	0,015	0,020	0,035
P - 4	0,005	0,285	0,345	0,225	0,225	0,155
P - 5	0,005	0,765	0,800	0,645	0,750	0,490
P - 7	0,025	0,075	0,060	0,025	0,055	0,030
P - 8	0,010	0,020	0,010	0,010	0,025	0,025
P - 9	0,005	0,185	0,570	0,480	0,690	0,140
K - 15	0,010	0,015	0,010	0,005	0,050	0,020
A - 14	0,010	0,015	0,010	0,010	0,020	0,020
G - 12	0,035	0,025	0,025	0,035	0,045	0,045
G - 11	0,015	0,015	0,010	0,015	0,030	0,025
Pa - 23	0,010	0,025	0,015	0,005	0,015	0,025
K - 21	0,025	0,060	0,105	0,030	0,045	0,080
P - 18	0,010	0,015	0,030	0,020	0,020	0,030
A - 13	0,020	0,025	0,015	0,020	0,020	0,045
P - 17	0,020	0,040	0,025	0,045	0,040	0,070

4.2.2. - Concentración óptima de la fuente nitrogenada

En una segunda experiencia se probaron distintas concentraciones de $ClNH_4$ en el medio de cultivo, manteniéndose - fijas las demás condiciones, con objeto de encontrar los valores óptimos.

Las condiciones de cultivo fueron las siguientes:

Medio de sales minerales "A"

Temperatura 26°C

pH 7,2

Fuente de Carbono 20 ml gas-oil comercial/litro

Agitación 150 rpm

Inóculo 0,2 ml de cultivo de 72 horas en caldo común

Matraces "erlenmeyer" de 150 cc de capacidad con 20 ml de medio

Tiempo de incubación ... 7 días

Las medidas de crecimiento se hicieron por turbimetría.

La fuente de nitrógeno fue $ClNH_4$, variándose la concentración en 5 ensayos entre 1 y 5 gramos por litro.

Se cultivaron 14 estirpes cuyos resultados se exponen en la tabla XLIV.

ESTUDIO DE LA CONCENTRACION DE LA FUENTE DE NITROGENO. VALORES DE ABSORBANCIA MEDIDOS - COMO EN LA TABLA ANTERIOR

TABLA XLIV -

Microorganismo	1	2	3	4	5	grs/litro $ClNH_4$
P - 1	0,030	0,015	0,020	0,015	0,075	
P - 4	0,020	0,230	0,210	0,500	0,070	
P - 7	0,045	0,045	0,040	0,040	0,045	
P - 9	0,090	0,290	0,325	0,210	0,360	
K - 15	0,020	0,015	0,020	0,010	0,015	
A - 14	0,020	0,020	0,020	0,015	0,015	
G - 12	0,040	0,035	0,065	0,055	0,040	
G - 11	0,025	0,020	0,025	0,015	0,015	
Pa - 23	0,020	0,015	0,015	0,015	0,020	
K - 21	0,085	0,070	0,055	0,045	0,085	
P - 18	0,025	0,020	0,025	0,015	0,020	
A - 13	0,030	0,025	0,025	0,020	0,025	
P - 17	0,080	0,040	0,035	0,040	0,045	

Aunque los resultados no fueron homogéneos, se puede concluir un mayor crecimiento con la concentración más alta, - 5 gr/l, que fue elegida para el resto de los cultivos.

4.2.3. - Proporción óptima de la fuente de carbono

La cantidad de hidrocarburo en el medio de cultivo para obtener el rendimiento óptimo, se determinó en una serie de experiencias previas empleando ClNH_4 como fuente nitrogenada - en la proporción 5 gr/l y variando la de gas-oil.

Se hicieron dos experimentos paralelos, con dos velocidades de agitación diferentes.

Medio de sales minerales "A"

Temperatura 26°C

pH 7,2

Inóculo 0,2 ml a partir de un cultivo de 72 horas en caldo común.

Matraces "erlenmeyer" de 150 cc con 20 ml de medio

Fuente de nitrógeno 5 gr de ClNH_4 /l

Tiempo de incubación ... 7 días

La fuente de carbono fue gas-oil gomercial en las proporciones de 20, 15, 10 y 5 ml por litro de medio.

La agitación fue de 150 y 200 de rpm respectivamente - en los tipos de experimento.

Los resultados se dan en la tabla XLV;

ESTUDIO DE LA CONCENTRACION OPTIMA DE HIDROCARBURO EN EL MEDIO DE CULTIVO. VALORES DE ABSORBANCIA MEDIDOS COMO EN LOS CASOS ANTERIORES

TABLA XLV -

Microorganismo	5	10	15	20	ml gasoil/l medio
P - 1	0,045	0,010	0,010	0,005	150 rpm
	0,030	0,020	0,010	0,015	200 rpm
P - 4	0,120	0,055	0,080	0,100	150 rpm
	0,035	0,020	0,025	0,010	200 rpm
P - 7	0,035	0,035	0,035	0,040	150 rpm
	0,030	0,025	0,045	0,030	200 rpm

Microorganismo	5	10	15	20	ml gasoil/l medio
P - 9	0,290	0,430	0,210	0,420	150 rpm
	0,230	0,120	0,150	0,170	200 rpm
K - 15	0,010	0,010	0,020	0,015	150 rpm
	0,010	0,015	0,025	0,015	200 rpm
A - 14	0,010	0,015	0,010	0,020	150 rpm
	0,035	0,015	0,020	0,035	200 rpm
G - 12	0,035	0,035	0,035	0,050	100 rpm
	0,045	0,040	0,035	0,055	200 rpm
G - 11	0,035	0,040	0,015	0,030	150 rpm
	0,020	0,020	0,020	0,020	200 rpm
Pa - 23	0,010	0,010	0,010	0,010	150 rpm
	0,015	0,025	0,015	0,015	200 rpm
K - 21	0,165	0,060	0,030	0,025	150 rpm
	0,070	0,045	0,050	0,040	200 rpm
A - 13	0,015	0,020	0,020	0,010	150 rpm
	0,020	0,020	0,020	0,020	200 rpm
P - 17	0,035	0,035	0,030	0,030	150 rpm
	0,030	0,045	0,040	0,030	200 rpm

Estos resultados no fueron concluyentes, respecto a la proporción de gas-oil en el medio de cultivo. Respecto a la agitación se comprobó que, al menos, en nuestro aparato de agitación orbital, no se conseguían mejores resultados a 200 que a 150 rpm, por lo que elegimos la segunda de las dos velocidades.

4.3. - Estudio espectroscópico del gas-oil

El gas-oil elegido para este trabajo, lo fue después de realizarse una serie de pruebas de crecimiento con un número elevado de microorganismos y compararse los resultados obtenidos con otros tipos de gas-oil brutos o refinados.

Aunque no se detalla aquí la prueba por considerarse de poco interés en el conjunto del trabajo, los productos que se ensayaron fueron los siguientes:

- 1) Gas-oil "Cepsa"
- 2) Gas-oil atmosférico "Río Gulf"
- 3) Gas-oil ligero de vacío "Río Gulf"
- 4) Gas-oil pesado de vacío "Río Gulf"
- 5) Extracto del Edeleanu. Cepsa
- 6) Gas-oil vacío Foster-1. Cepsa
- 7) Gas-oil de 1^a, 2^a y 3^a extracción de dos fases 2. Repesa
- 8) Gas-oil de 2^a y 3^a extracción de Topping n^o 1. - Repesa

Solo detallamos aquí los datos que conocemos del gas-oil ligero de vacío que fue de todos ellos el elegido para el trabajo. (Tabla XLVI).

DATOS DEL ANALISIS DEL GAS-OIL LIGERO DE VACIO

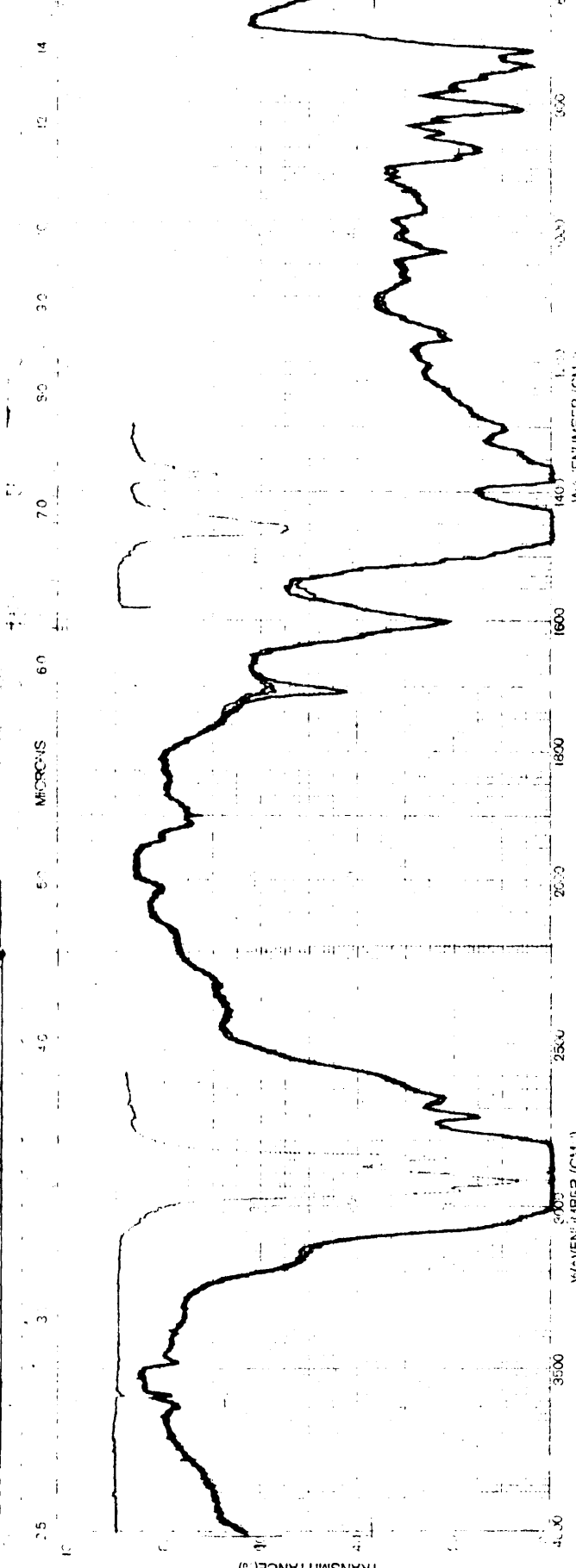
TABLA XLVI -

Densidad	0,8970
Punto de congelación		+ 18
Viscosidad	19,1 cs (100°F)
Destilación:		
	P.D.I. °C...	294
	95%V °C 351
Análisis elemental:		
	C 86,66
	H 12,19
	N 00

El espectro de infrarrojos de este producto se expone a continuación (gráfica 2).

Está realizado en célula de ClNa de 0,1 mm de espesor y las bandas intensas se han repetido entre cristales.

Los números de onda de las diferentes bandas de este - espectro están expuestos en la tabla XLVII.



Gráfica 2. Espectro IR del gas-oil ligero de vacío "Río Gulf".

SAMPLE	SCAN SPEED	M	OPERATOR
OP/IN	UNIT	N	DATE
	REF. NO.		

LONGITUDES DE ONDA EN CM^{-1} DE LAS BANDAS DEL
ESPECTRO INFRARROJO DEL GAS-OIL LIGERO DE VACIO

TABLA XLVII

700	885	1130	1750	2955
720	905	1150	1840	3050
740	915	1165	1910	
750	930	1205	2025	
765	945	1300	2770	
780	965	1340	2670	
810	1000	1365	2730	
830	1030	1375	2850	
845	1060	1460	2870	
875	1075	1600	2925	
	1115	1705		

El estudio y la asignación de estas bandas se realizan más adelante. Antes se exponen los resultados de la separación cromatográfica y los espectros de las diferentes fracciones.

4.4. - Fraccionamiento del Gas-oil por cromatografía y formación de aductos con urea

4.4.1. - Fraccionamiento por cromatografía

El desarrollo de las separaciones cromatográficas, se siguió utilizando como norma el índice de refracción del eluyente. Posteriormente, y una vez fijadas las condiciones, que se repitieron en pruebas sucesivas, se prescindió de este procedimiento.

En la primera columna, se pasaron 162,5 ml de gas-oil ligero de vacío en forma de mezcla equivolúmetrica con 2,2,4-trimetilpentano. La carga de la columna fue de 360 gr. de silicagel. A continuación se pasaron 1500 ml del mismo disolvente.

Se tomaron muestras del índice de refracción (n_D^{20}) - cada 100 ml de eluyente.

Los valores del índice de refracción se exponen en - la tabla XLVIII.

VALORES DE $n_D^{20^\circ}$ DEL ELUYENTE (FRACCION ISOCTANO)

1^a Columna

TABLA XLVIII -

Muestra	$n_D^{20^\circ}$	Muestra	$n_D^{20^\circ}$	Muestra	$n_D^{20^\circ}$
1 ^a	1,3860	6 ^a	1,4220	11 ^a	1,3947
2 ^a	1,3912	7 ^a	1,4030	12 ^a	1,3933
3 ^a	1,3912	8 ^a	1,3880	13 ^a	1,3928
4 ^a	1,3887	9 ^a	1,3852	14 ^a	1,3919
5 ^a	1,4219	10 ^a	1,3961	15 ^a	1,3919

Indice de refracción del disolvente puro: 1,3910

Se añaden luego 1100 ml del segundo disolvente (ben- ceno) y se toman muestras cada 150 ml del eluyente.

Los valores del índice de refracción se exponen en - la tabla XLIX.

VALORES DE $n_D^{20^\circ}$ DEL ELUYENTE (FRACCION BENCENO)

TABLA XLIX -

Muestra	$n_D^{20^\circ}$	Muestra	$n_D^{20^\circ}$	Muestra	$n_D^{20^\circ}$
1-	1,4439	5-	1,4409	8-	1,4897
2-	1,4889	6-	1,5001		
3-	1,4990	7-	1,5001		

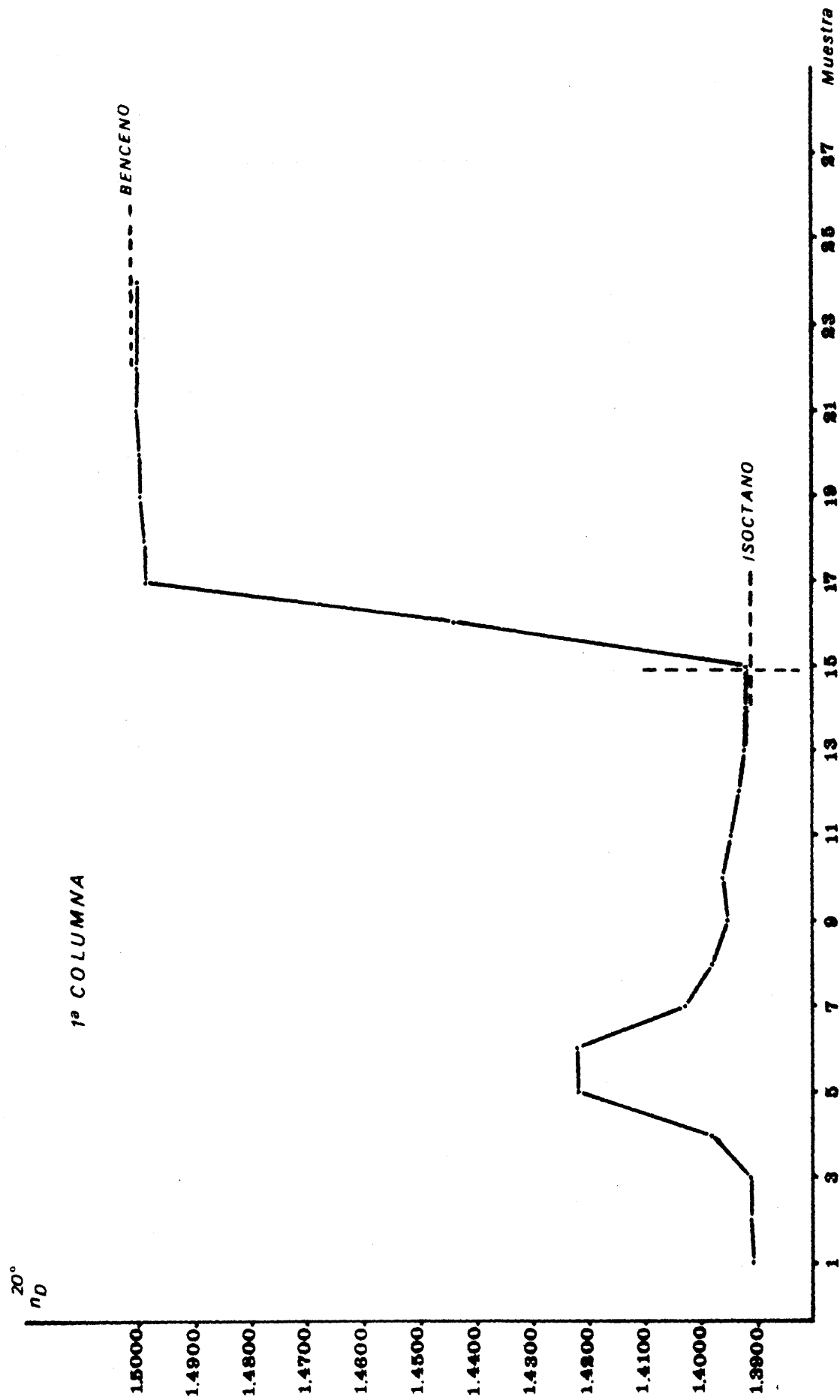
Indice de refracción del disolvente puro: 1,5005

En la gráfica (3) se muestra la variación del índice de refracción del eluyente frente al volumen del mismo en litros. En esta primera prueba no se extrajo el residuo de la columna con propanol-2, acabándose la experiencia al obtener el índice de refracción del disolvente puro.

Segunda columna

Después de realizar los expectros de absorción infrarro

Gráfica 3. Variación del índice de refracción (n_D^{20}) en las muestras sucesivas de eluyente. Primera columna.



ja de las fracciones de la primera columna, se pudo observar que en la primera de ellas (fracción parafínica) se arrastraban parte de los compuestos aromáticos de la mezcla por ello, en experiencias sucesivas, se procedió a separar aquella primera fracción en tres, demostrándose en el espectro infrarrojo la aparición de las bandas correspondientes a hidrocarburos aromáticos después de haberse pasado 500 ml del primer disolvente.

Las variaciones del índice de refracción del primer eluyente (isooctano) en esta segunda experiencia se exponen en la tabla L. Las muestras se tomaron cada 200 ml.

VALORES DE $n_D^{20^\circ}$ DEL ELUYENTE (FRACCION ISOCTANO)

2ª Columna

TABLA L -

Muestra	$n_D^{20^\circ}$	Muestra	$n_D^{20^\circ}$	Muestra	$n_D^{20^\circ}$
1ª	1,3912	6ª	1,4010	11ª	1,3922
2ª	1,3906	7ª	1,3970	12ª	1,3920
3ª	1,4201	8ª	1,3959	13ª	1,3920
4ª	1,4300	9ª	1,3937		
5ª	1,4322	10ª	1,3830		

Indice de refracción del disolvente (recuperado): 1,3917

A continuación, se añaden 2.400 c.c. del segundo eluyente (benceno) y se toman muestras cada 200 c.c.

Los valores del índice de refracción se exponen en la tabla LI.

VALORES DE $n_D^{20^\circ}$ DEL ELUYENTE (FRACCION BENCENO)

2ª Columna

TABLA LI -

Muestra	$n_D^{20^\circ}$	Muestra	$n_D^{20^\circ}$	Muestra	$n_D^{20^\circ}$
1ª	1,4436	5ª	1,4934	9ª	1,4984
2ª	1,4670	6ª	1,4962	10ª	1,4981
3ª	1,4768	7ª	1,4984	11ª	1,4981
4ª	1,4928	8ª	1,4981	12ª	1,4989

Indice de refracción disolvente - (recuperado) - : 1,4990

Finalmente se hicieron pasar 2400 ml de propanol-2, to mándose muestras de eluyente cada 200 ml.

Las variaciones del índice de refracción están expuestas en la tabla LII.

VALORES DE $n_D^{20^\circ}$ DEL ELUYENTE (FRACCION PROPANOL-2)

2^a Columna

TABLA LII -

Muestra	$n_D^{20^\circ}$	Muestra	$n_D^{20^\circ}$	Muestra	$n_D^{20^\circ}$
1 ^a	1,3809	3 ^a	1,3770	5 ^a	1,3765
2 ^a	1,3776	4 ^a	1,3766	6 ^a	1,3762

Indice de refracción del disolvente puro: 1,3761

En la gráfica (4) se muestra la variación del índice de refracción del eluyente frente al volumen del mismo en litros.

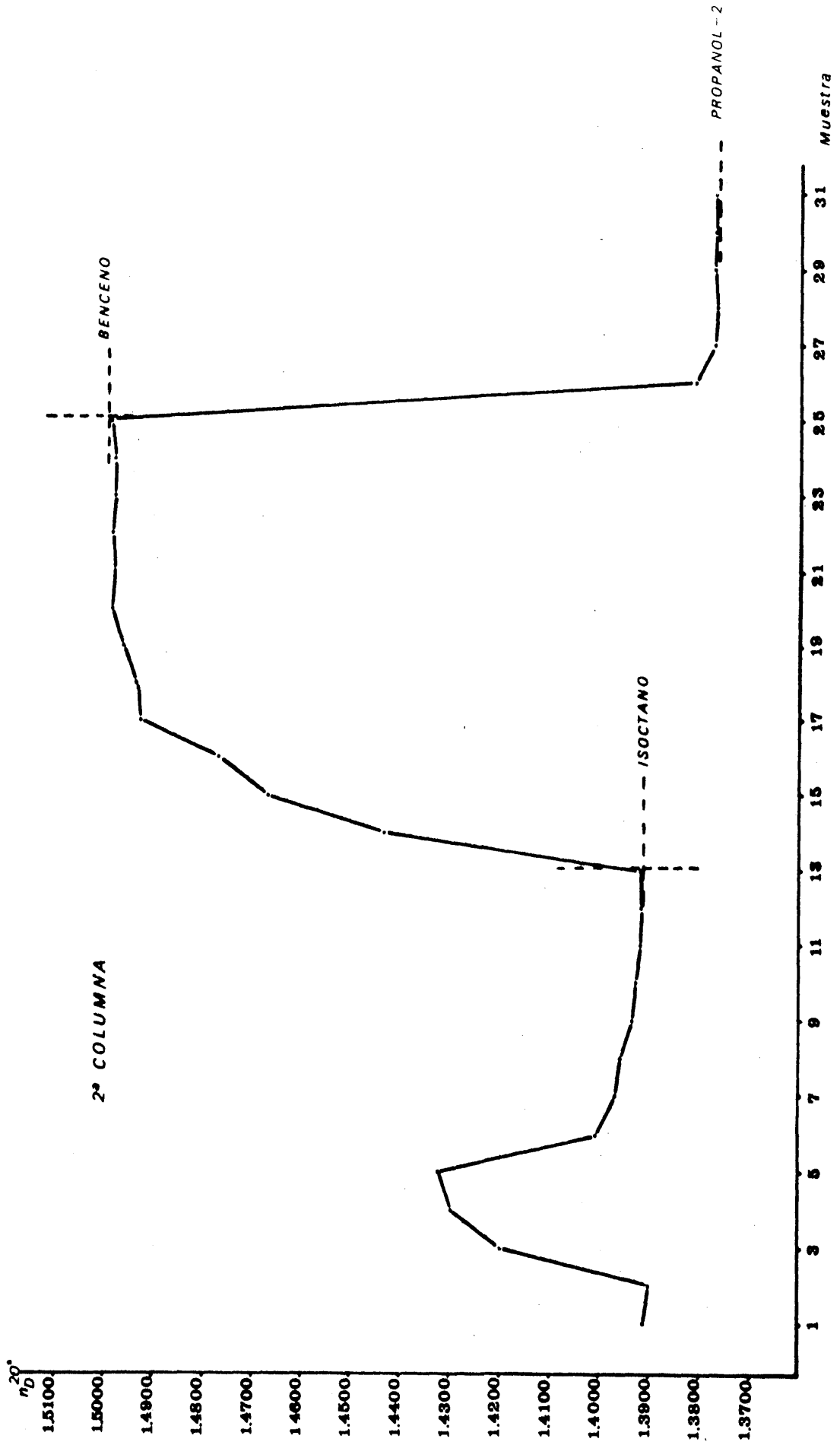
Tercera columna

En una tercera experiencia, se empleó otro tipo de gas-oil (Repesa, proceso 2) con la idea de obtener mayores cantidades de compuestos aromáticos. Aunque no se consiguió este objetivo, las parafinas obtenidas sirvieron para los experimentos preliminares de cultivos en parafinas y para ensayar, posteriormente, la separación de parafinas ramificadas y lineales por formación de aductos con urea. Por ello, y aunque solo sea a título de experimento auxiliar, exponemos aquí brevemente los resultados.

La columna se cargó en las mismas condiciones que en casos anteriores. Se pasaron 162,5 ml de gas-oil mezclado con la misma cantidad de isoctano y, sucesivamente, 2200 ml de isoctano, 2000 ml de benceno y 1800 ml de propanol-2. Las muestras se tomaron cada 200 ml de eluyente.

Los valores del índice de refracción se exponen en las tablas LIII, LIV y LV.

Gráfica 4. Variación del índice de refracción (n_D^{20}) en las muestras sucesivas de eluyente. Segunda columna.



VALORES DE $n_D^{20^\circ}$ DEL ELUYENTE (FRACCION ISOCTANO)

3ª Columna

TABLA LIII -

Muestra	$n_D^{20^\circ}$	Muestra	$n_D^{20^\circ}$	Muestra	$n_D^{20^\circ}$
1ª	1,3915	5ª	1,4000	9ª	1,3925
2ª	1,3951	6ª	1,3945	10ª	1,3923
3ª	1,4105	7ª	1,3937	11ª	1,3928
4ª	1,4068	8ª	1,3928	12ª	1,3922
				13ª	1,3922

Indice de refracción del disolvente (recuperado): 1,3915

VALORES DE $n_D^{20^\circ}$ DEL ELUYENTE (FRACCION BENCENO)

3ª Columna

TABLA LIV -

Muestra	$n_D^{20^\circ}$	Muestra	$n_D^{20^\circ}$	Muestra	$n_D^{20^\circ}$
1ª	1,4069	4ª	1,4941	7ª	1,4969
2ª	1,4796	5ª	1,4944	8ª	1,4973
3ª	1,4831	6ª	1,4963	9ª	1,4978
				10ª	1,4978

Indice de refracción del disolvente (recuperado): 1,4985

VALORES DE $n_D^{20^\circ}$ DEL ELUYENTE (FRACCION PROPANOL-2)

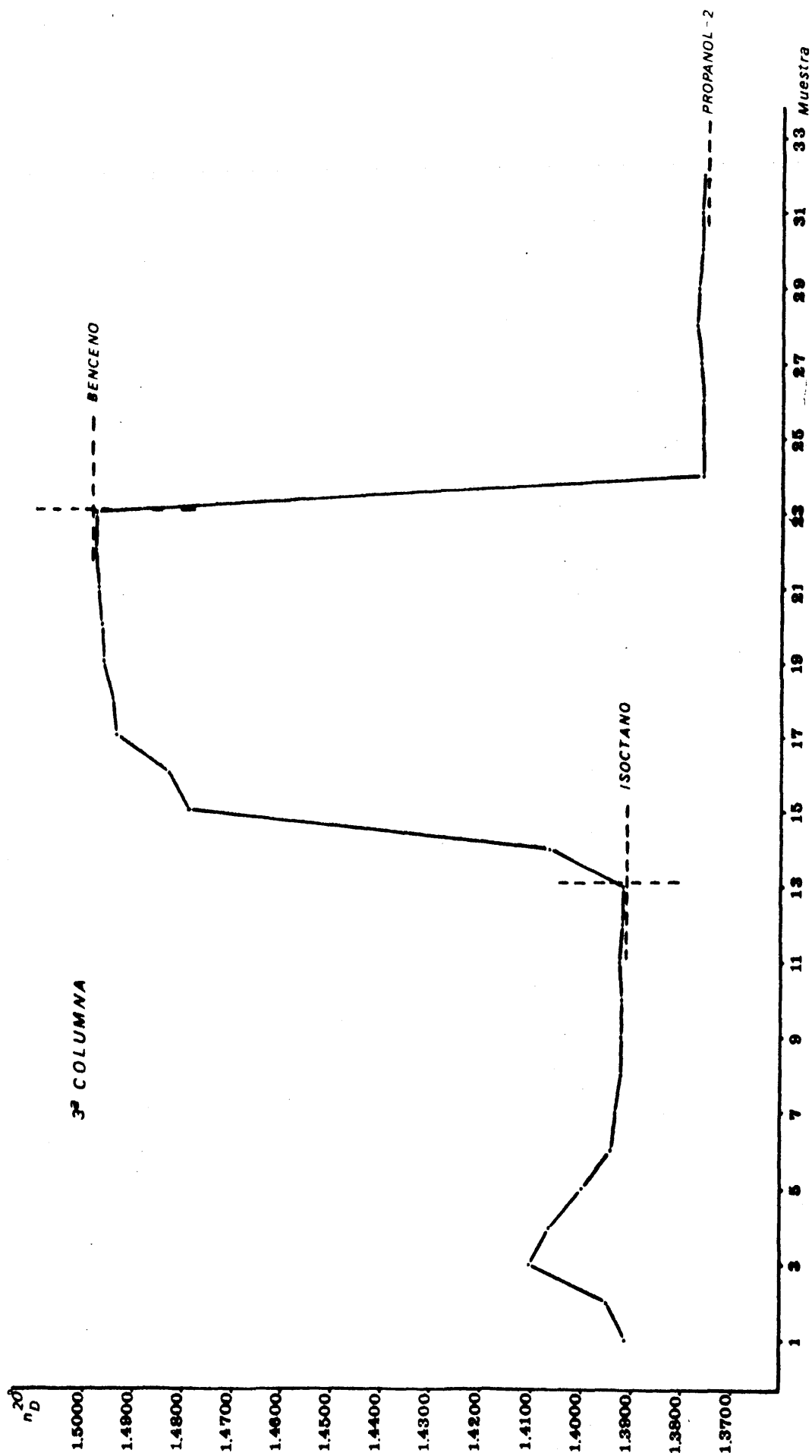
3ª Columna

TABLA LV -

Muestra	$n_D^{20^\circ}$	Muestra	$n_D^{20^\circ}$	Muestra	$n_D^{20^\circ}$
1ª	1,3762	4ª	1,3767	7ª	1,3766
2ª	1,3763	5ª	1,3776	8ª	1,3765
3ª	1,3764	6ª	1,3770	9ª	1,3762

Indice de refracción del disolvente (puro): 1,3761

Gráfica 5. Variación del índice de refracción (n_D^{20}) en las muestras sucesivas de eluyente. Tercera columna.



En la gráfica (5) se muestra la variación del índice de refracción frente al volumen de eluyente en litros.

En el resto de los fraccionamientos, solo se hicieron medidas del índice de refracción en el momento de cambiar de eluyentes, para asegurarse de la buena marcha de la separación. Por lo demás, se reprodujo en todos los casos el fraccionamiento de la columna segunda.

4.4.2. - Separación de parafinas lineales y parafinas ramificadas y cíclicas

Siguiendo el procedimiento descrito en el capítulo de métodos, se hicieron tres separaciones de este tipo utilizando las fracciones parafínicas obtenidas en los fraccionamientos anteriores.

En la primera, a título de experiencia previa, se empleó el producto de la tercera columna, que procedía de un gas-oil diferente al que sirvió para el resto de las pruebas. En los otros dos experimentos se fraccionaron parafinas procedentes del gas-oil ligero de vacío, obtenidas en la 6ª columna.

En todos los casos se procedió de la siguiente forma:

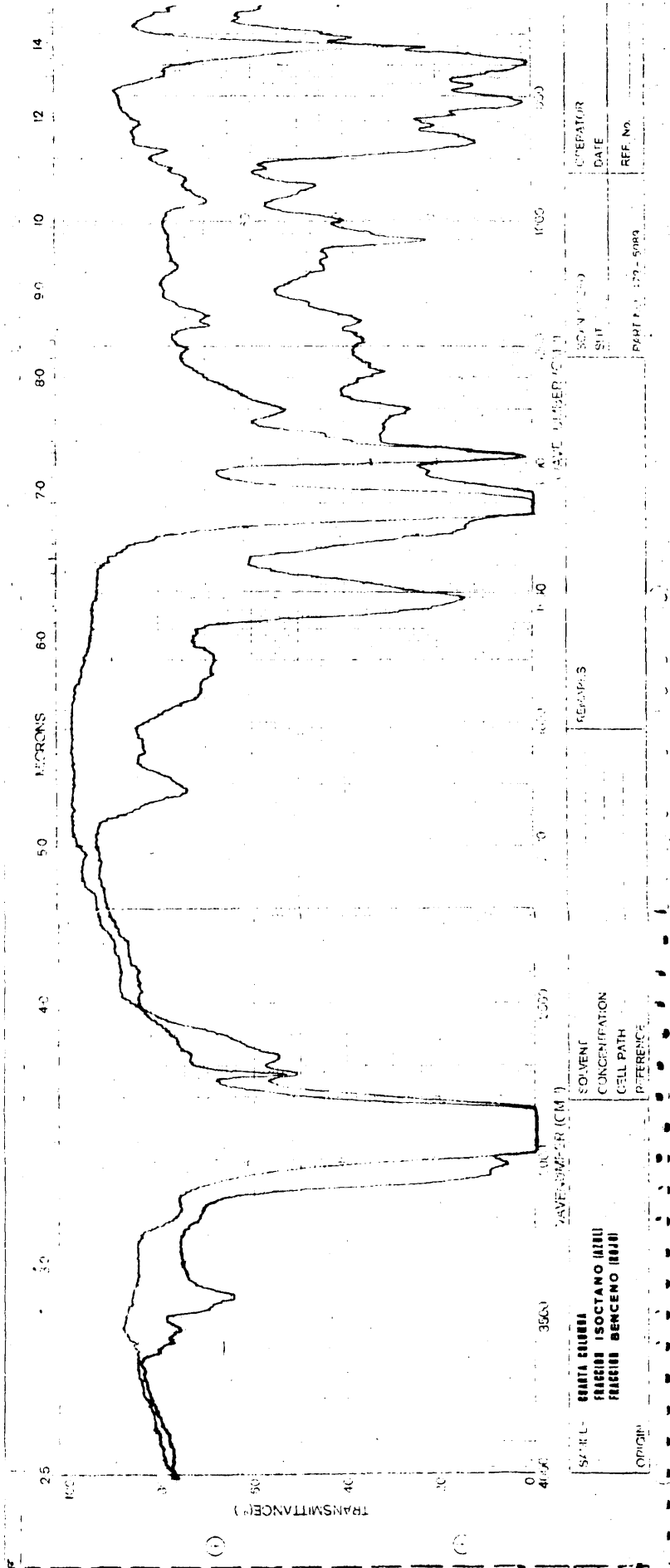
Se mezclaron 50 ml de parafinas "totales" con 200 ml de acetona y se añadieron lentamente 45 gr. de urea. Todo ello se agitó con agitador magnético durante una hora a 2000 rpm, tras de lo cual se centrifugó durante 15 minutos a 4000 rpm. El sobrenadante se lavó repetidas veces con agua fría y se separaron en embudo de decantación las parafinas ramificadas y cíclicas.

Al centrifugado se le añaden 20 gr. de urea y 200 ml de acetona; se agita durante 15 minutos y se vuelve a centrifugar. Con el sobrenadante se repite el proceso anterior y el centrifugado se lava ahora varias veces con agua caliente, obteniéndose un primer concentrado de parafinas lineales con el que se vuelve a repetir todo el proceso descrito hasta aquí.

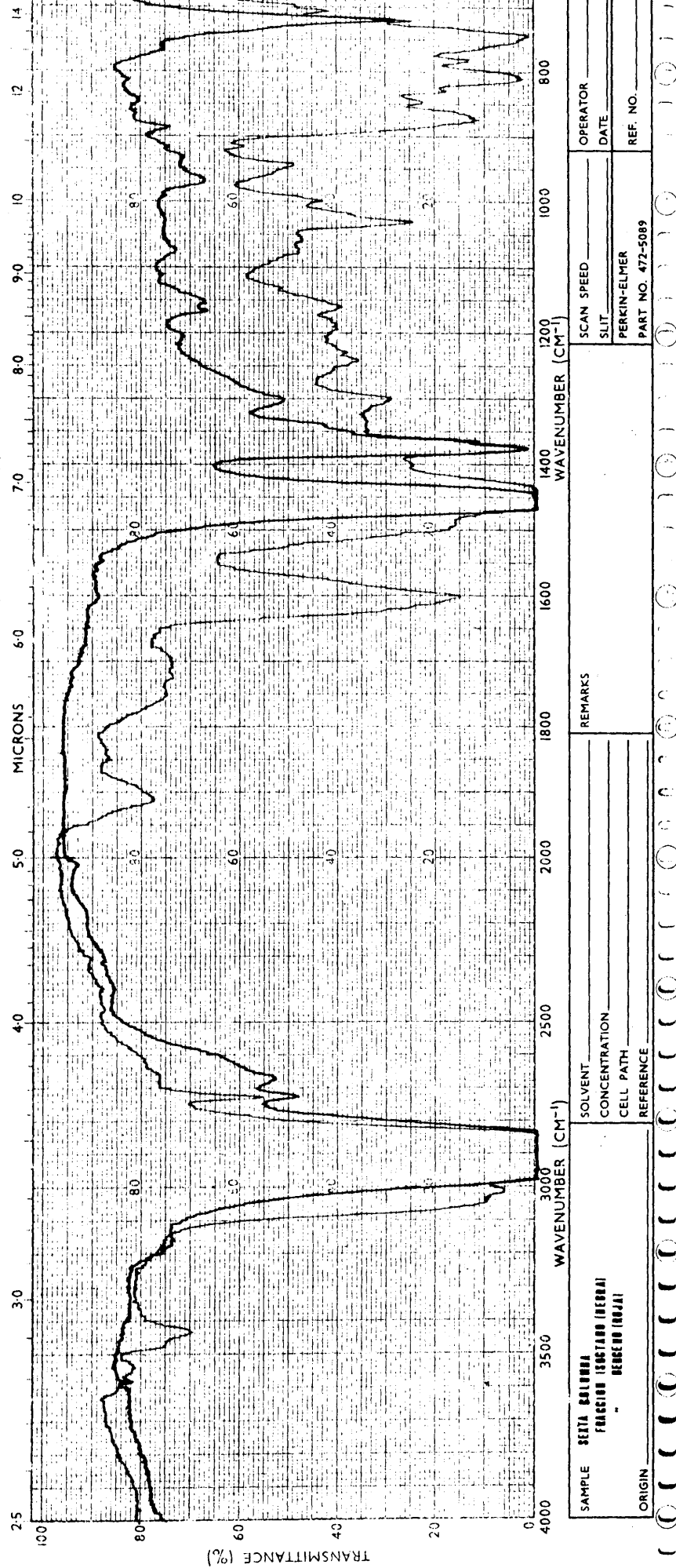
Como se hace notar más adelante, la separación de las parafinas lineales por este procedimiento no llega a ser completa. Esto se puede notar perfectamente en los espectros realizados de las dos fracciones. Sin embargo, el proceso resulta sumamente útil en el contexto general del presente trabajo.

4.5. - Estudio espectroscópico del gas-oil y sus fracciones

En las gráficas (6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12, se muestran



Gráfica 6. Fracciones parafínica (1) y aromática (2) obtenidas de la cuarta - columna de cromatografía.



SAMPLE BETA BOLONNA FRAZIONE (ESTERO) (ERRAI) " BERGHO (RAZI)		SOLVENT _____ CONCENTRATION _____ CELL PATH _____ REFERENCE _____		REMARKS _____ _____ _____	
ORIGIN _____		SCAN SPEED _____ SLIT _____ PERKIN-ELMER PART NO. 472-5089		OPERATOR _____ DATE _____ REF. NO. _____	

Gráfica 7. Fracciones parafínica (1) y aromática (2) obtenidas de la sexta -
columna de cromatografía.

los espectros infrarrojos de las diferentes fracciones obtenidas en los experimentos anteriores. Solo se reproducen los resultados de algunas separaciones, para evitar repetir espectros idénticos. Por ello se han elegido los de las fracciones que se han utilizado en los cultivos posteriores, que nos sirven de paso como controles.

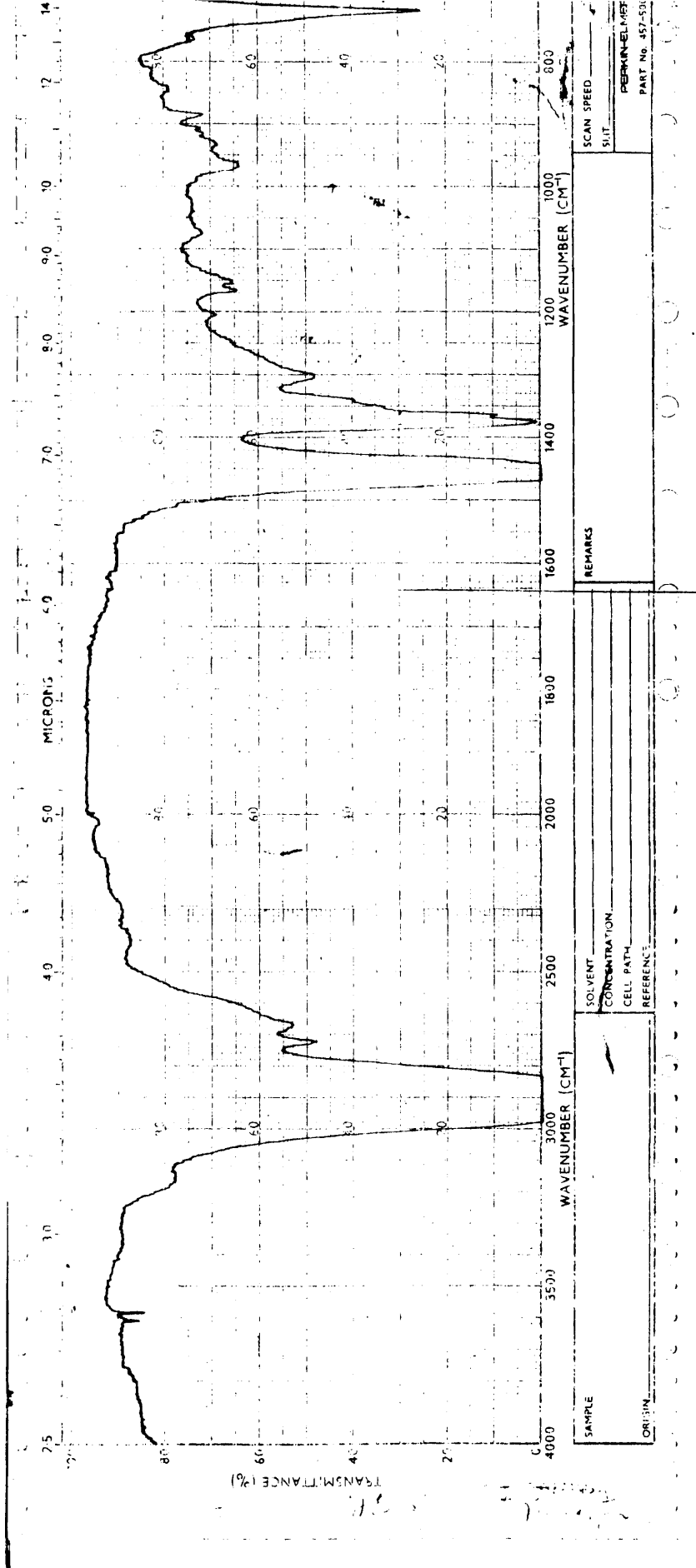
En la tabla LVI, se dan los números de onda (cm^{-1}) de las bandas registradas en los espectros.

ESPECTROS DE LAS FRACCIONES PARAFINICA, AROMATICA Y RESIDUAL DE LA 6ª COLUMNA. Números de onda en cm^{-1}

TABLA LVI -

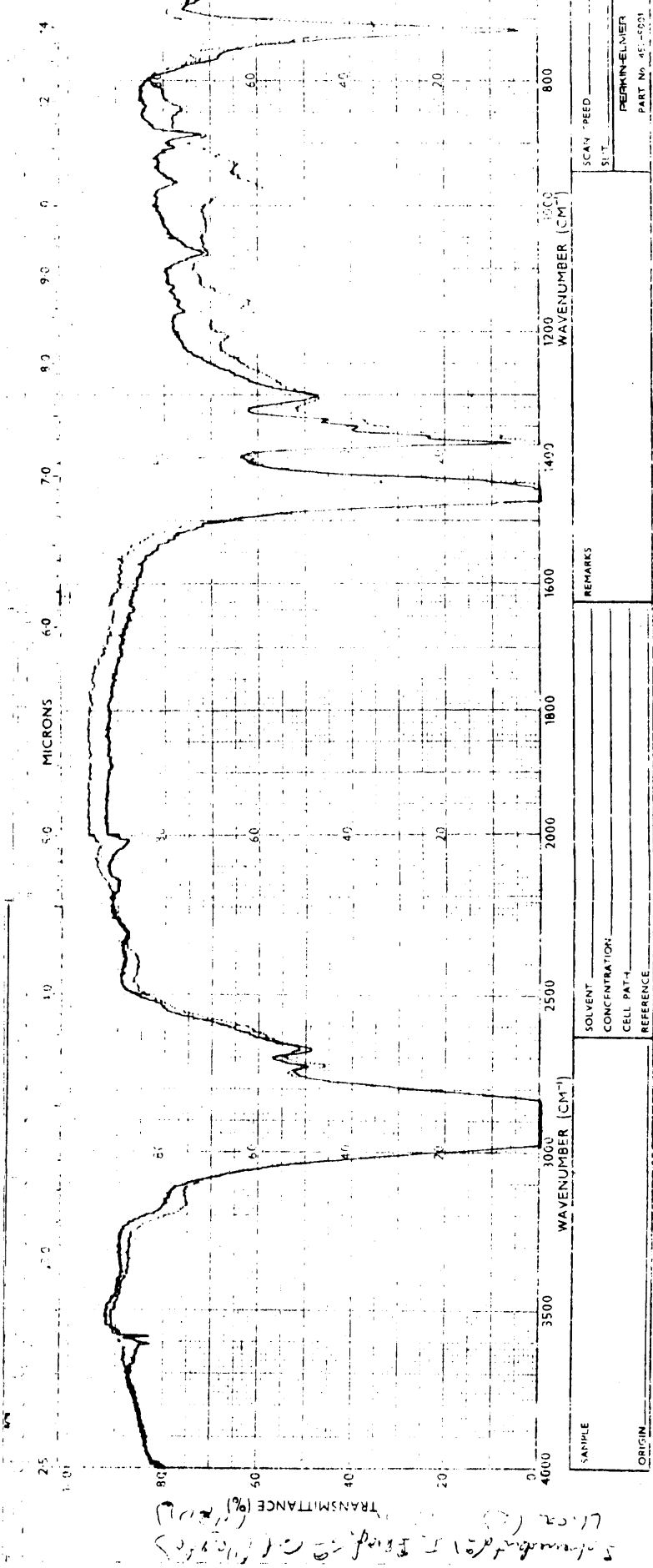
Fracción parafínica	Fracción Aromática	Fracción Residual
720	700	695
765	710	720
845	720	760
885	740	1030
905	780	1200 - 1300
915	810	1365
935	830	1380
965	845	1455
1075	875	1600
1150	915	1640
1165	945	1710
1205	1000	2500 - 3300
1300	1020	2850
1340	1030	2870
1350	1060	2925
1365	1075	2985
1375	1165	
1460	1195	
2025	1245	
2670	1305	
2730	1375	
2850	1460	
2870	1500	
2925	1600	
2955	1700	
	1730	
	1755	
	1840	
	1910	
	1730	
	1850	
	1870	
	1925	
	1955	
	3020	
	3050	

Las diferencias entre los espectros infrarrojos de las fracciones de parafinas lineales y parafinas ramificadas y cíclicas se pueden observar en las gráficas respectivas corres--



Gráfica 8. Fracción parafínica de la sexta columna.

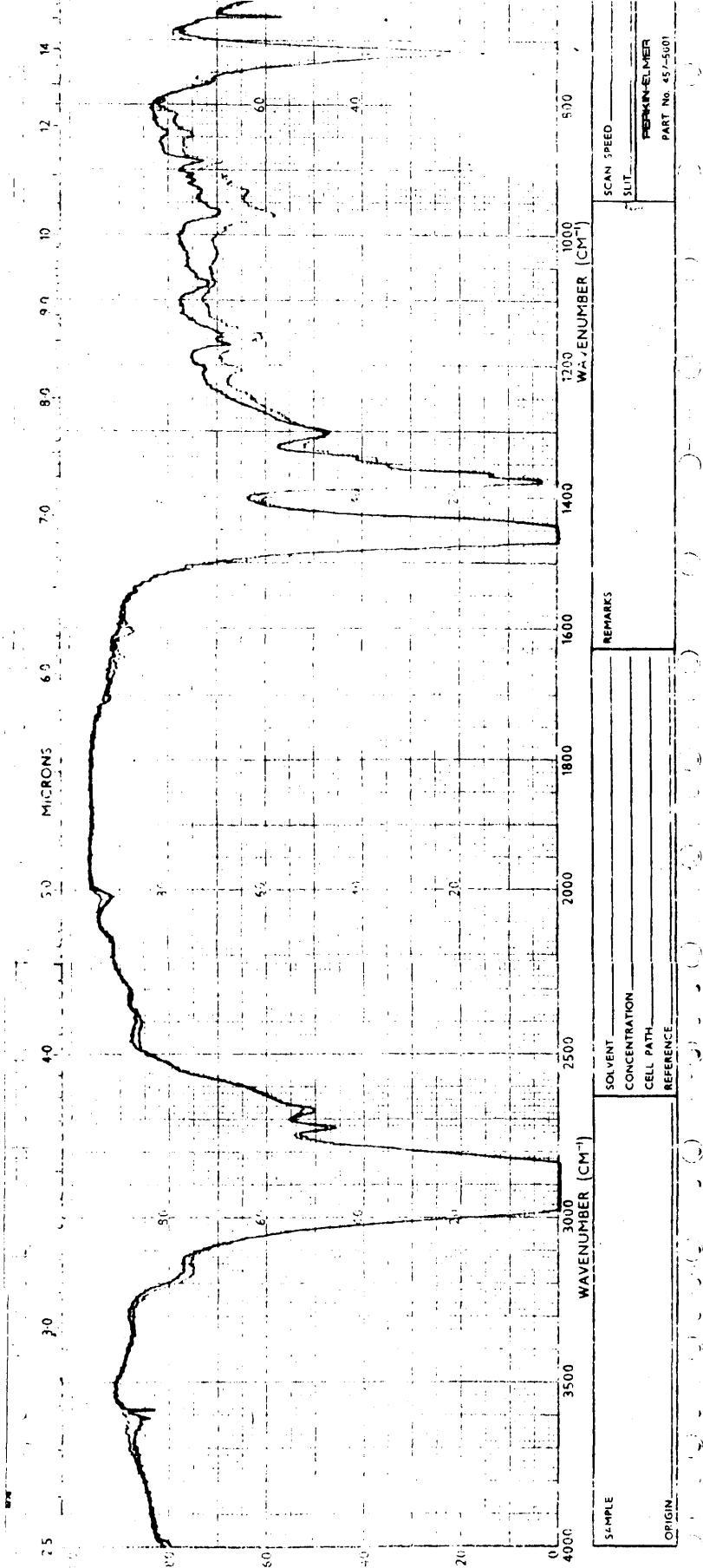
SAMPLE	SOLVENT	REMARKS	SCAN SPEED
	CONCENTRATION		5/IT
ORIGIN	CELL PATH	PERMITS-ELMER	PART NO. 457-50
	REFERENCE		



Gráfica 9. Fracciones de parafinas lineales (1) y parafinas ramificadas y cíclicas (2) obtenidas por formación de aductos con urea.

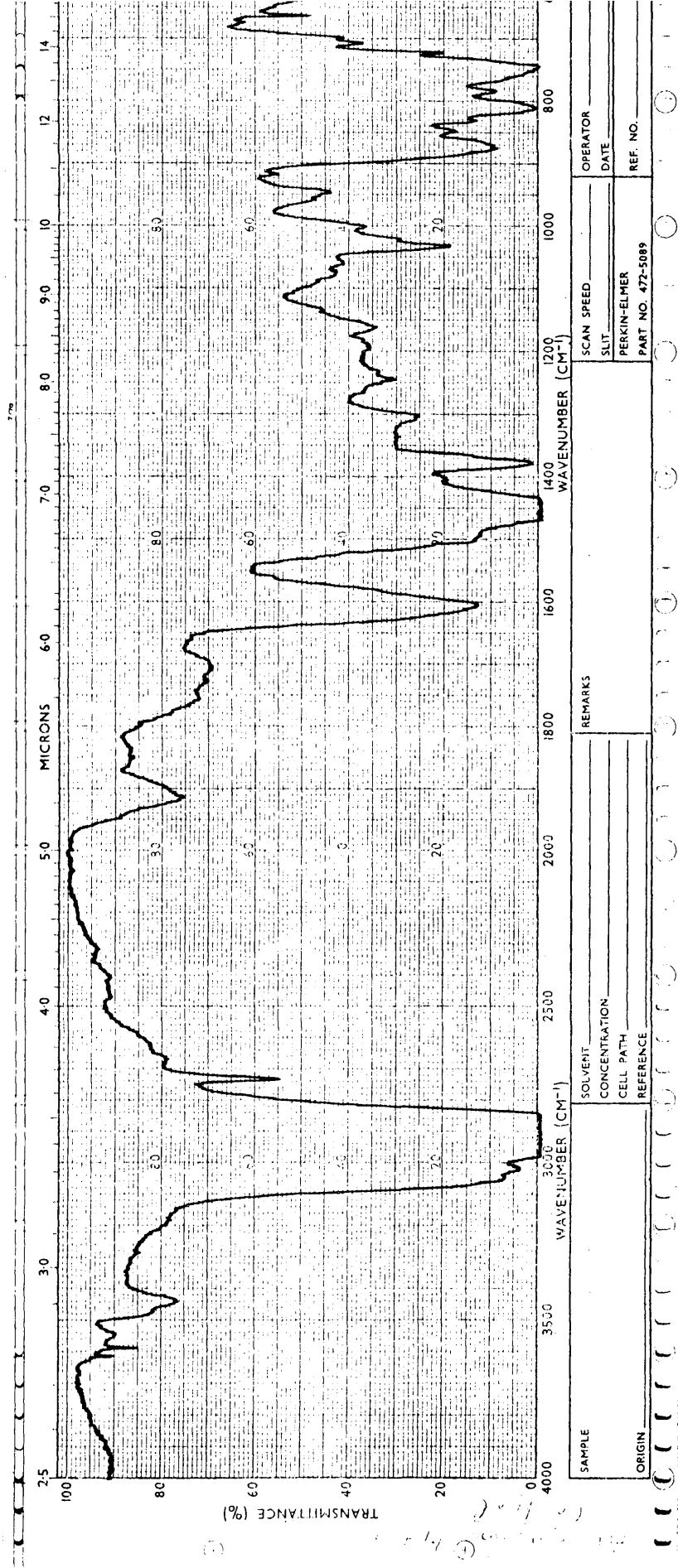
SAMPLE	SOLVENT	REMARKS	SCAN "REED"
	CONCENTRATION:		SIT
ORIGIN	CELL PATH		PERKINELMER
	REFERENCE		PART No. 45-5001

Laboratorio de Investigación Científica
 U.C.R. (1970)

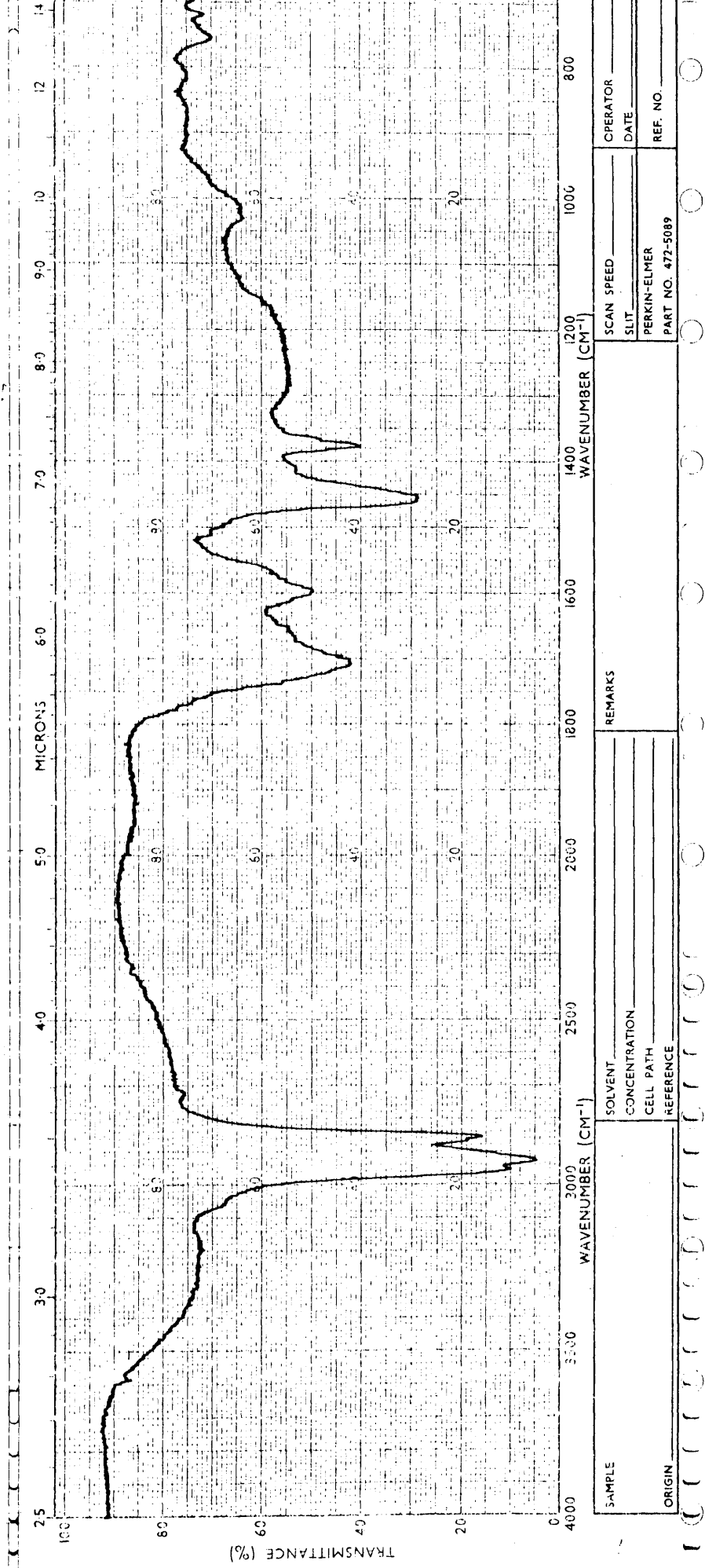


SAMPLE	SOLVENT	SCAN SPEED
ORIGIN	CONCENTRATION	SUIT
	CELL PATH	PERKIN-ELMER
	REFERENCE	PART No. 457-5001
REMARKS		

Gráfica 10. Fracciones de parafinas lineales (1) y parafinas ramificadas y cíclicas (2) obtenidas por formación de aductos con urea.



Gráfica 11. Fracción aromática de la sexta columna.



SAMPLE	SOLVENT	SCAN SPEED	OPERATOR
	CONCENTRATION	SLIT	DATE
ORIGIN	CELL PATH	PERKIN-ELMER	REF. NO.
	REFERENCE	PART NO. 472-5089	
REMARKS			

Gráfica 12. Fracción residual de la sexta columna.

pondientes a este fraccionamiento.

En la tabla LVII se destacan las longitudes de onda de las bandas diferentes en los espectros correspondientes a la separación de las parafinas obtenidas de la 6ª columna. Los otros espectros, aunque no se comentan por tratarse de pruebas previas, muestran las mismas diferencias.

NUMEROS DE ONDA (cm^{-1}) DE LAS BANDAS DIFERENTES EN LOS ESPECTROS CORRESPONDIENTES A PARAFINAS LINEALES Y PARAFINAS RAMIFICADAS Y CICLICAS.

TABLA LVII

Nº de Onda	Parafinas lineales	Parafinas ramificadas y cíclicas
720	Aumenta	Disminuye
815	Desaparece	Aumenta
845	Casi desaparece	Aumenta
885	Aumenta	Disminuye
915	Desaparece	Aumenta
935	Desaparece	Aumenta
960 - 70	Desaparece - la de 970	Desaparece la de 960 y aumenta a 970
1075	Aumenta	Casi desaparece
1150	Casi desaparece	Aumenta
1165	Casi desaparece	Aumenta
1205	Desaparece	Aumenta
1365	Disminuye	Aumenta
1375	Disminuye	Aumenta
2670	Aumenta	Disminuye
2730	Disminuye	Aumenta

Análisis elemental de las fracciones obtenidas por cromatografía		
Fracción parafínica	Fracción aromática	Fracción residual
C : 85,17	C : 87,16	C : 80,20
H : 13,72	H : 8,32	H : 12,03
N : 00,00	N : 00,00	N : 00,00

4.5.1. Asignación de bandas

Teniendo en cuenta los datos obtenidos de los espec--

tros infrarrojos de las fracciones anteriores así como los -- del análisis elemental de las mismas y del gas-oil completo, haremos una asignación de las bandas principales. Para ello -- se han considerado algunas obras de caracter general (Bellamy, 1954; Simon y Clrec, 1970; Morcillo, 1962; Szymanski, 1964; etc.) así como colecciones de espectros de compuestos -- puros (sobre todo las del A.P.I.).

La distribución de las diferentes bandas del espectro del gas-oil completo en los de las distintas fracciones ha -- contribuido considerablemente a facilitar la asignación.

A continuación se expone una breve discursión de cada banda:

Región 710-690 cm^{-1} . - Solo aparecen bandas "identificables" en la fracción aromática. En el espectro del gas-oil completo no queda suficientemente diferenciada esa zona.

Se pueden asignar como debidas a vibraciones de deformación fuera del plano del CH en anillos aromáticos sustituidos. Sobre el tipo de sustituciones predominantes no podemos decir nada con la sola ayuda del espectro infrarrojo.

Banda a 720 cm^{-1} . - Vibraciones de deformación (rocking) de cadenas lineales con cuatro o más grupos CH_2 . La intensidad de esta banda varía de unos espectros a otros, siendo máxima en las fracciones parafínicas y casi ausente en la fracción residual. Su intensidad para la fracción de aromáticos es difícil de calcular, debido al posible arrastre de la banda a 750 cm^{-1} .

Es de destacar la variación de intensidad de esta banda en los espectros de parafinas lineales, donde sufre un --- aumento muy considerable, en relación con los de parafinas ramificadas y cíclicas, donde se reduce.

En cuanto a la fracción residual (fracción propanol-2) esta banda nos permite asegurar que, a pesar de la presencia de abundantes grupos CH_3 y CH_2 , estos no forman cadenas largas.

Región 740-880 cm^{-1} . - En esta región destacan tres -- bandas muy fuertes en los espectros de aromáticos y de gas-oil completo, situadas a 745, 805 y 875 cm^{-1} y otras de menor intensidad a 785, 830 y 850.

La intensidad de estas bandas en la fracción aromática nos inclina a asignarlas como correspondiente a vibraciones de deformación fuera del plano del CH en anillos aromáticos con abundantes sustituciones.

La presencia de condensaciones de anillos aromáticos, tal vez, unidos por cadenas parafínicas cortas (banda a --- 745 cm^{-1}) reforzaría la intensidad de absorción en esta zona.

Banda 840 cm^{-1} . - Relacionada con las bandas a 1150 y 1175 (ver más adelante).

Banda 885 cm^{-1} . - Aunque no hemos encontrado la asignación, probablemente porque no se trata de una banda característica, aparece invariablemente en espectros de parafinas de cadena larga, siendo más intensa cuando esta cadena es lineal. Se observa la presencia de esta banda en los espectros de las fracciones parafínicas particularmente en el de las lineales. Se tratará de algún armónico o combinación.

Región 915-1100 cm^{-1} . - En los espectros de fracciones aromáticas, se caracteriza por la presencia de una banda fuerte a 1030 cm^{-1} debida a vibraciones de flexión (Bending) en el plano, de los grupos CH en anillos aromáticos. Otras bandas en esta región pueden ser asignadas al mismo tipo de vibración, cuando hay sustituciones.

La banda intensa a 960-940 cm^{-1} (en realidad parecen ser dos bandas) es de más difícil asignación, y quizás intervengan en ella estructuras aromáticas oxidadas (sobre todo teniendo en cuenta que el análisis elemental de la fracción aromática presenta un contenido en oxígeno relativamente alto, 4, 52%).

En las fracciones parafínicas, aparecen dos bandas -- que se intensifican en la fracción de parafinas ramificadas y cíclicas, a 935 y 970 cm^{-1} que tal vez puedan explicarse por la presencia de condensaciones de anillos saturados de 5 ó 6 átomos de carbono en cadenas parafínicas (Valero e Hidalgo, 1967).

En las fracciones lineales destacan las bandas a 960 y 1075 cm^{-1} , de las que solo podemos decir como de la banda a 885 cm^{-1} que están presentes en los espectros de parafinas de cadena larga, pero no han sido asignadas.

En cuanto a la fracción propanol-2, las bandas en estas zonas se estudiarán más adelante.

Bandas a 1150, 1165 y 1205 cm^{-1} . - Son bandas que casi llegan a desaparecer por completo en el espectro de parafinas lineales, acentuándose en el de las ramificadas. No aparecen en espectros aromáticos.

Las dos primeras se pueden asignar a vibraciones de de formación (de esqueleto) en grupos isopropilo C (CH₃)₂. La presencia de la banda más débil a 840 cm^{-1} ya citada, serviría para confirmar esta hipótesis.

La de 1205 cm^{-1} podría ser atribuida al mismo tipo de vibraciones en presencia de grupos terciobutilo, aunque esta asignación no es ni mucho menos tan evidente.

Estas bandas, cuya disminución de densidad puede apreciarse a lo largo de los sucesivos intentos de separación de parafinas lineales y ramificadas (gráficos 9, 10 y 11,12) nos sirve para valorar la calidad de dicha separación, que en ningún caso fue absoluta.

Bandas a 1160 , 1190 y 1240 cm^{-1} ..- Estas bandas en los espectros aromáticos, son de difícil asignación. Por un lado podrían corresponder a la presencia de compuestos oxidados (ésteres ó éteres aromáticos) que suponen debe haber en estas fracciones.

Sin embargo, teniendo en cuenta la proporción de oxígeno en el análisis elemental (obsérvese también la relativamente pequeña absorción en la región $1700-1800$, donde las bandas correspondientes a grupos $C=O$ tienen máxima densidad) podemos considerar estas bandas relacionadas con vibraciones de deformación (bending) en grupos CH de anillos aromáticos sustituidos.

Región $1300-1460\text{ cm}^{-1}$..- Muy similar en todos los espectros; aparecen las siguientes bandas diferenciadas:

1) Banda a 1300 cm^{-1} : Corresponde a vibraciones de deformaciones (wagging) de grupos CH_2 . Obsérvese la menor intensidad de esta banda en las fracciones de parafinas ramificadas comparada con la de las lineales.

En los espectros aromáticos, puede sumarse además la absorción debida a vibraciones de valencia $C=C$.

2) Bandas a 1365 y 1375 cm^{-1} : Corresponden a vibraciones de flexión simétrica de grupos CH_3 . La banda realmente intensa es la segunda; la presencia del doblete se debe a grupos isopropilo, que se manifiestan además en otras bandas ya descritas.

Se puede observar, con relación a estas dos bandas lo siguiente: a) la disminución de intensidad de la segunda, y seguramente de la primera, en los espectros de parafinas lineales en relación con los de parafinas totales y ramificadas. b) Menor intensidad también en espectros de aromáticos, donde aparece aunque débil la de 1365 , confirmando ambas bandas la presencia de sustituciones abundantes en los anillos.

3) Banda a 1460 cm^{-1} : De gran intensidad en todos los registros, incluye vibraciones de deformación (scissoring) de grupo CH_2 y de deformación asimétrica del CH_3 . En los espec---

tros de fracciones aromáticas, se unen además las vibraciones de valencia C=C del anillo, que aunque suelen aparecer a números de onda más altos (1490 que también aparece en nuestros espectros) pueden llegar hasta 1430 cm^{-1} .

Región $1460-1650\text{ cm}^{-1}$.- Solamente muestra bandas en los espectros aromáticos, por lo que la hemos utilizado como referencia en los fraccionamientos en columna (particularmente la banda a 1600 cm^{-1}).

La principal es precisamente la citada a 1600 cm^{-1} , observándose también absorción hacia $1500-1480$. Se debe a vibraciones en el plano de anillos aromáticos. La ausencia de absorción hacia 1580 , donde se sitúan estas vibraciones en casos de anillos conjugados, nos hace suponer que este tipo de moléculas son escasas.

Región $1650-2000\text{ cm}^{-1}$.- En las fracciones parafínicas, no existen bandas en esta región lo que concuerda con la débil proporción de oxígeno que aparece en los análisis elementales.

En cuanto a las fracciones aromáticas, se suman aquí probablemente dos tipos de bandas. Por una parte las armónicas o combinaciones que se dan típicamente en esta zona cuando hay anillos aromáticos sustituidos (1905 fuerte y hacia 1850 , 1760 y 1730 cm^{-1}) y por otra, las correspondientes a vibración de tensión de grupos C=O (1710 cm^{-1}).

Aunque la interacción entre estas bandas nos impide de cidir sobre unas y otras la intensidad de la banda a 1915 parece que nos permitiría suponer que hay predominio de disustituciones en los anillos.

Región $2000-3100\text{ cm}^{-1}$.- Aparte de las bandas correspondientes a armónicos o combinaciones, entre las cuales las más interesantes serían las de 2675 y 2730 cm^{-1} por la variación de sus intensidades respectivas en los espectros de parafinas lineales y ramificadas, destacan en esta región una serie de bandas de intensidad máxima. Son las siguientes:

- 1) Banda a 2855 cm^{-1} : Corresponde a vibraciones de tensión simétrica de enlaces CH en grupos CH_2 .
- 2) Banda a 2870 cm^{-1} : Vibraciones de tensión simétrica del enlace CH en grupos CH_3 .
- 3) Banda a 2925 cm^{-1} : Vibraciones de tensión asimétrica del enlace CH en grupos CH_2 .
- 4) Banda a 2960 cm^{-1} : Vibraciones de tensión asimétrica del enlace CH en grupos CH_3 .

Estas bandas pueden ser utilizadas para calcular la relación entre la proporción de metilo y metileno en las distintas fracciones utilizando las absorbancias de las mismas ($\log I_0/I$). Los valores de I_0 y de I se calculan tomando como línea base la de máxima transmisión en el espectro (hacia 2000 cm^{-1}) (Hasting, 1952) (Francis, 1953) (Valero e Hidalgo, 1967).

En las fracciones aromáticas, aparecen además bandas por encima de 3000 cm^{-1} (3050 aproximadamente) correspondiente a vibraciones de tensión de enlaces CH en anillos aromáticos.

Región $3100-4000 \text{ cm}^{-1}$..- Las bandas en esta zona en espectros aromáticos se deben a vibraciones de tensión de enlaces O-H.

4.6. - Resultados de los cultivos en las diferentes fracciones.

4.6.1. - Pruebas en pentadecano y 2,6,10,14 - tetrametilpentadecano (pristano).

Se utilizaron estos dos hidrocarburos en una serie de pruebas simultáneas con el cultivo en las fracciones parafínicas, como dos ejemplos de parafinas lineales y ramificadas, con el objeto de comparar los resultados y facilitar el análisis de los mismos.

El pristano, por ser un producto abundantemente extendido en la naturaleza, y particularmente en el suelo, por acumulación de restos vegetales donde se encuentra, pensamos que sería más fácilmente utilizado por nuestras bacterias del suelo. Los resultados confirman nuestras hipótesis. A pesar de ser una parafina ramificada el crecimiento fue abundante para la mayor parte de las estirpes ensayadas.

En cuanto al pentadecano, su elección corresponde más bien a su punto de fusión, pues las parafinas sólidas son mal utilizadas en los cultivos si no se emplea un disolvente. Sin embargo, el hecho de ser una cadena de número impar de átomos de carbono, es probable que haya influido negativamente en el crecimiento, pues éste, en general, ha sido menor de lo que cabía esperar.

Describiremos a continuación brevemente los espectros controles de estos dos productos, espectros representados en las gráficas 13 y 14.

Las bandas que podemos considerar como más características en dichos espectros son las siguientes:

A) Pentadecano.

Región 3000-2800 cm^{-1} : Procede de la conjunción de cuatro bandas superpuestas muy fuertes, que no se separan en el espectro realizado con -- una célula demasiado gruesa. Serían las siguientes:

2960 cm^{-1} : Vibraciones de valencia simétrica en -- grupos CH_3 .

2925 cm^{-1} : Vibraciones de valencia asimétrica en - grupos CH_2 .

2870 cm^{-1} : Vibraciones de valencia asimétrica en - grupos CH_3 .

2855 cm^{-1} : Vibraciones de valencia simétrica en -- grupos CH_2 .

Región 1475-1445 cm^{-1} : Corresponde a vibraciones de deforma--- ción "scissoring" de grupos CH_2 (1470 cm^{-1}).

Banda a 1380 cm^{-1} : Vibraciones de flexión simétrica de gru-- pos CH_3 .

Banda a 1300 cm^{-1} : Vibraciones de deformación "waggin" de grupos CH_2 .

Banda a 720 cm^{-1} : Vibraciones de deformación "rocking" en cadenas lineales de 4 o más grupos CH_2 .

B) 2, 6, 10, 14 - tetrametilpentadecano.

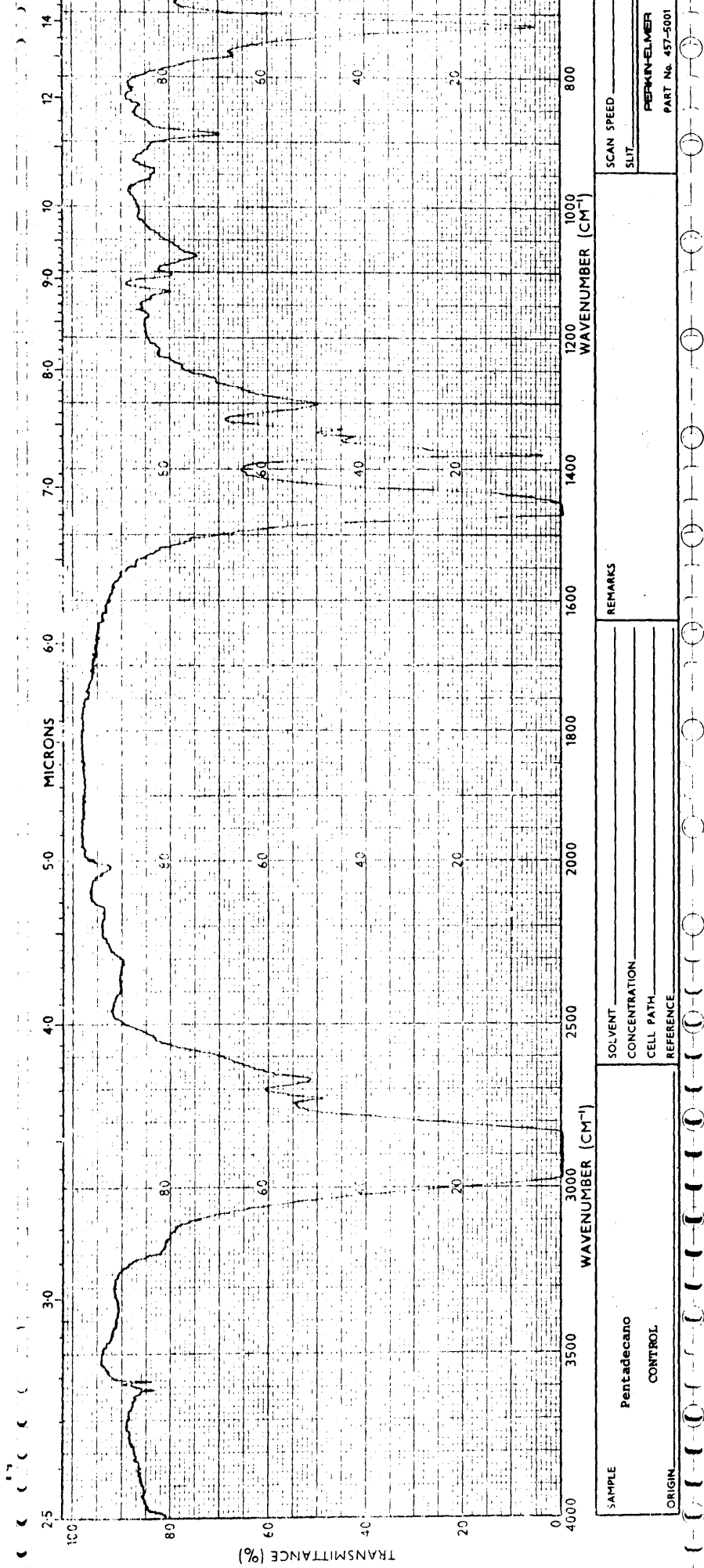
Asignamos sólo las bandas que diferencian este espectro del anterior, limitándonos a mencionar las que han sido ya descritas.

Región 3000-2800 cm^{-1} :

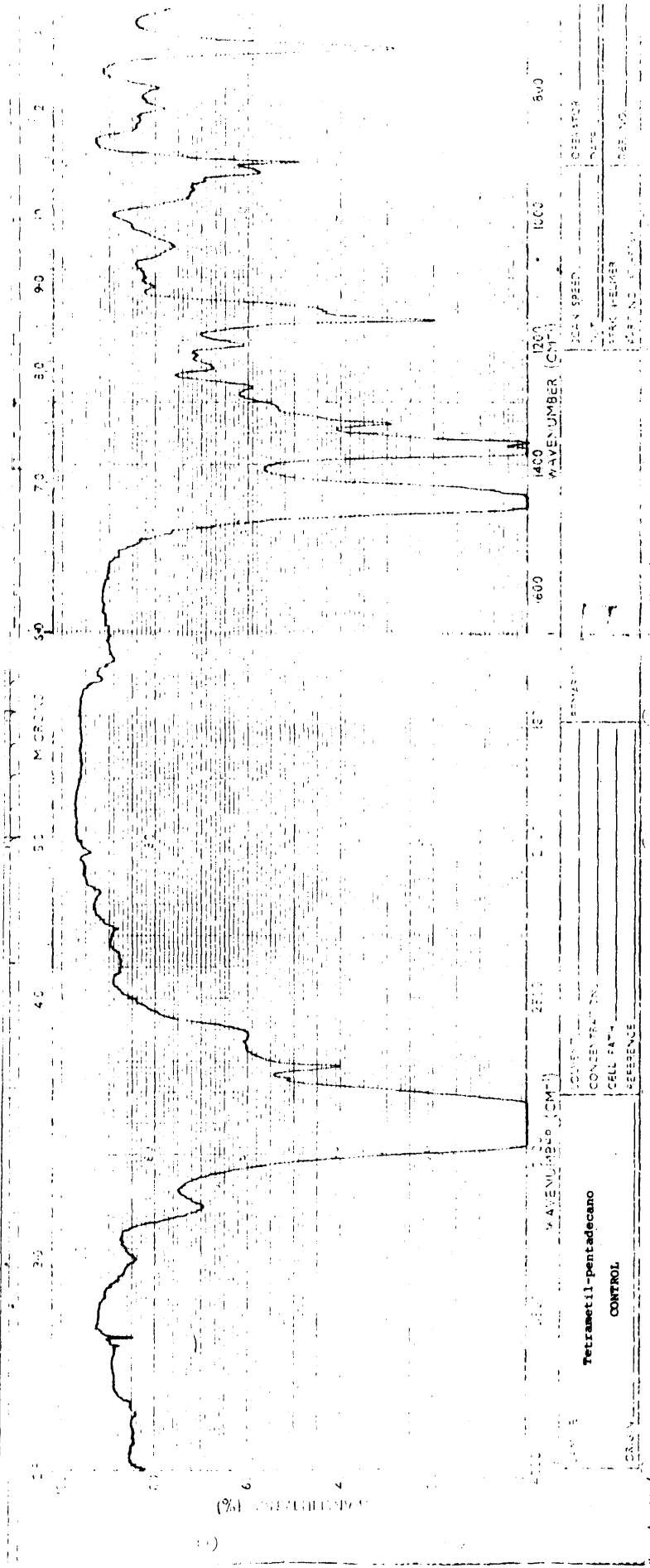
Región 1475-1445 cm^{-1} :

Bandas a 1380 y 1365 cm^{-1} : Constituyen un doblete en tetrame-- tilpentadecano. La primera corres-- ponde a vibraciones de deformación simétrica del enlace C-H en grupos CH_3 . La segunda a vibraciones de va-- lencia simétrica en grupos CH_3 de -- restos isopropilo.

Bandas a 1170 y 1150 cm^{-1} : Doblete debido a vibraciones de de-- formación de esqueleto de grupos -- isopropilo en cadenas parafínicas.



Gráfica 13. Espectro IR del pentadecano. CONTROL.



Gráfica 14. Espectro IR del 2, 6, 10, 14 - tetrametilpentadecano. CONTROL.

Banda a 735 cm^{-1} : Corresponde a vibraciones de deformación "rocking" de cadenas lineales con menos de cuatro grupos CH_2 seguidos.

4.6.2. - Estudio comparado de los espectros infrarrojos de extractos de los cultivos.

Para hacer este estudio se ordenan las estirpes por géneros y familias, siguiendo el orden que hemos establecido al hacer el estudio sistemático. Para cada especie se dan los espectros correspondientes a sus cultivos en: 1) Parafinas totales, 2) parafinas lineales, 3) parafinas ramificadas y cíclicas, 4) pentadecano, 5) tetrametilpentadecano y 6) aromáticos. Los espectros no representados son de estirpes que, o bien no crecieron en una determinada fracción, o no han sido cultivadas en ella, especificándose en cada caso la causa.

La intensidad del crecimiento para cada estirpe y cada fracción está recogida en tablas donde se reúnen todas las de las especies de cada género. Como ya se ha indicado, son valores que corresponden a las respectivas medidas de turbidez y, por tanto, tienen tan sólo un valor comparativo.

Las variaciones que aparecen en los espectros de cada fracción como consecuencia del cultivo, están recogidas en tablas en las que, además, se anota si se trata de bandas nuevas o no, y si son fuertes (f), de mediana intensidad (m) o débiles (d). Estas tablas están también ordenadas conforme al criterio sistemático señalado anteriormente. Al final de cada grupo se hace una asignación de bandas y una pequeña discusión.

4.6.2.1. - Resultado de los cultivos de las especies de los géneros Corynebacterium y Arthrobacter.

Los valores de crecimiento y pH final de estos cultivos se dan en la tabla LVIII.

En este grupo se incluyen las estirpes P-1, P-2, P-3, K-21 y P-36. Los espectros de los extractos de cultivos de estas estirpes están representados en las gráficas 15 a 33.

Las bandas diferenciales de estos espectros respecto de los controles se recogen en la tabla LIX.

Asignación de bandas y discusión

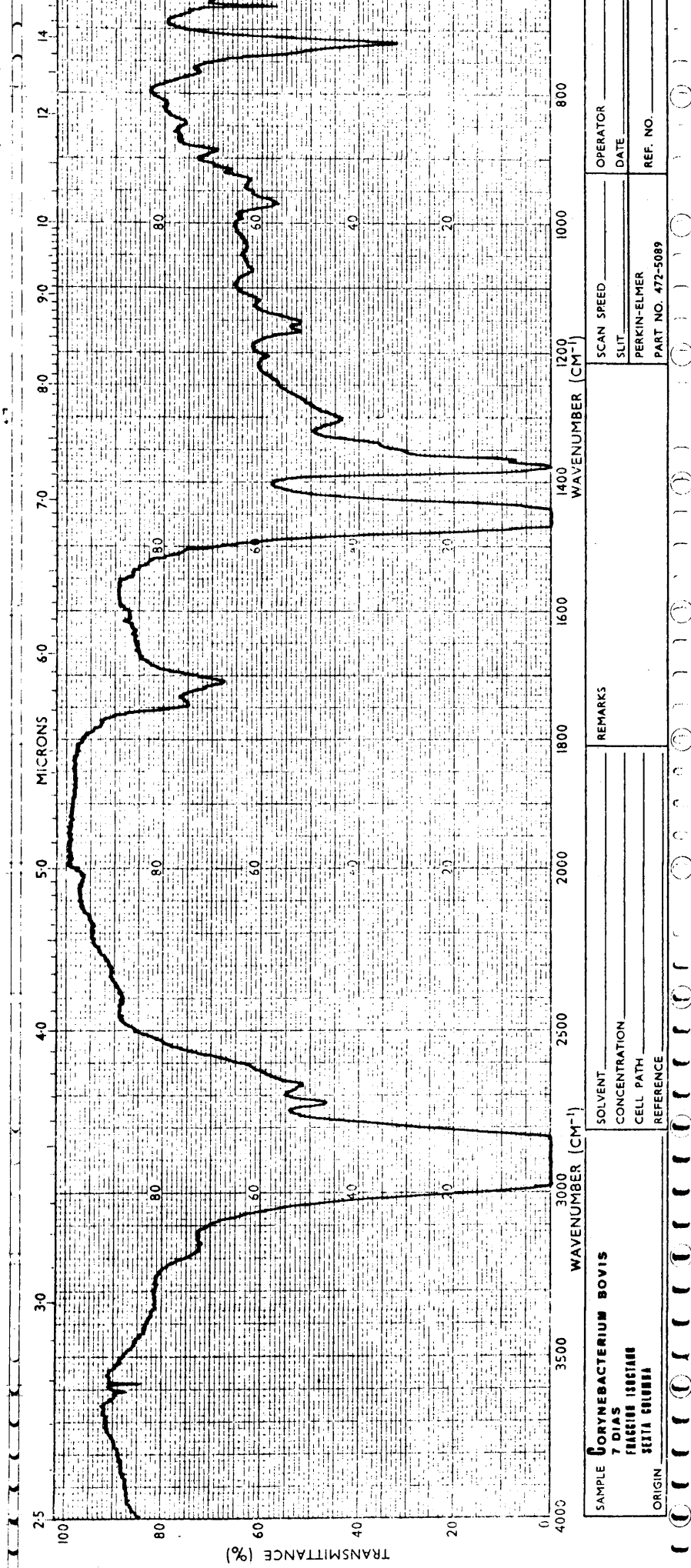
A continuación se estudian las distintas bandas que -- aparecen nuevas o se modifican como consecuencia de los cultivos, relacionándolas en la medida de lo posible, con las variaciones producidas con las distintas estirpes en el sustrato hidrocarburo.

Tabla LVIII.- Valores de crecimiento y pH final de los cultivos de estirpes de los géneros Corynebacterium y Arthrobacter.

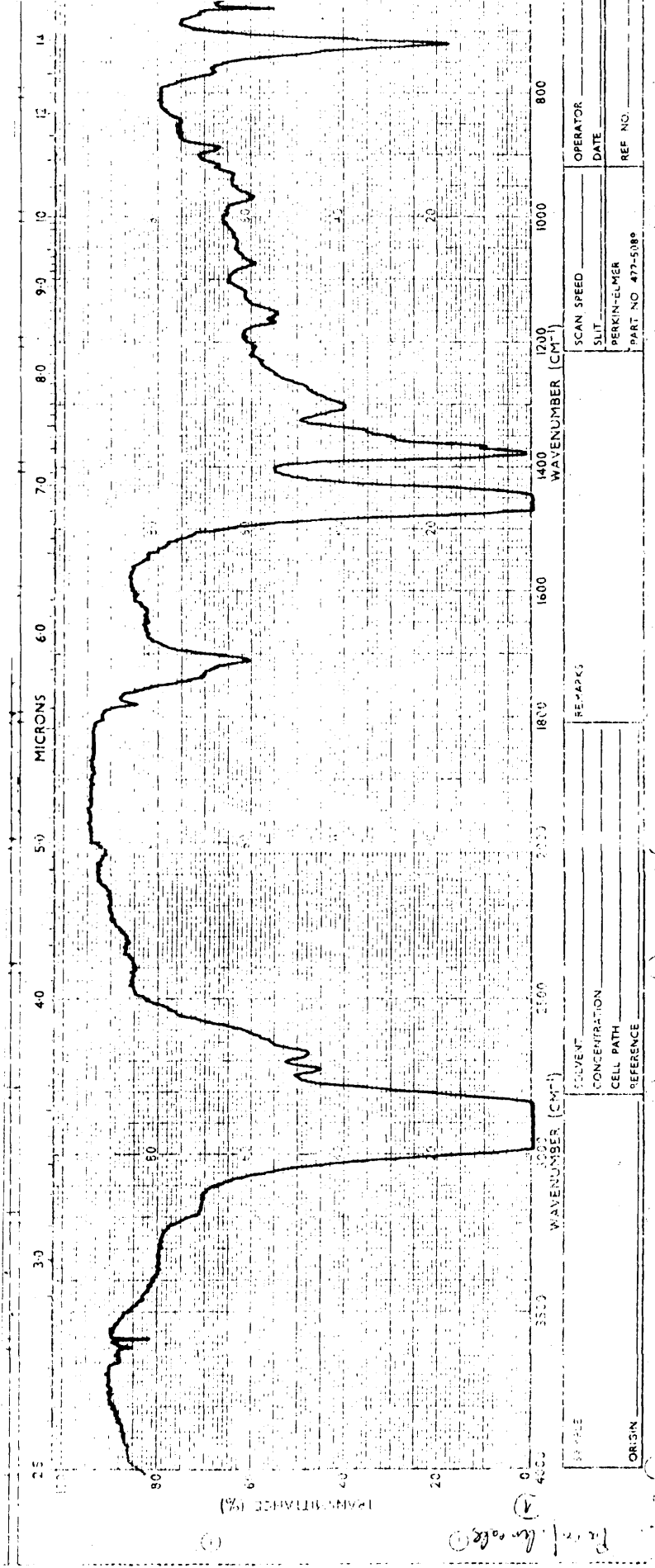
Estirpe	Parafinas totales		Parafinas lineales		Parafinas ramificadas		Pentadecano		Tetrametil-Pentadecano		Aromáticos	
	Crecimiento	pH. final	Crecimiento	pH. final	Crecimiento	pH. final	Crecimiento	pH. final	Crecimiento	pH. final	Crecimiento	pH. final
P-1	0,045	5,5	0,070	6	-	-	0,070	6	0,160	5,5	0,010	7
P-2	0,020	6,5	-	-	0,025	6,5	-	-	-	-	0,030	7
P-3	0,015	6,5	-	-	-	-	0,010	6	-	-	0,020	6,5
K-21	0,030	7	0,140	5,5	0,070	5,5	-	-	-	-	0,120	6
P-36	0,035	6	0,010	7	0,010	7	-	-	-	-	0,060	6,5

Tabla LIX.- Géneros Corynebacterium y Arthrobacter. Bandas diferenciales entre los espectros de cultivos y sus respectivos controles.

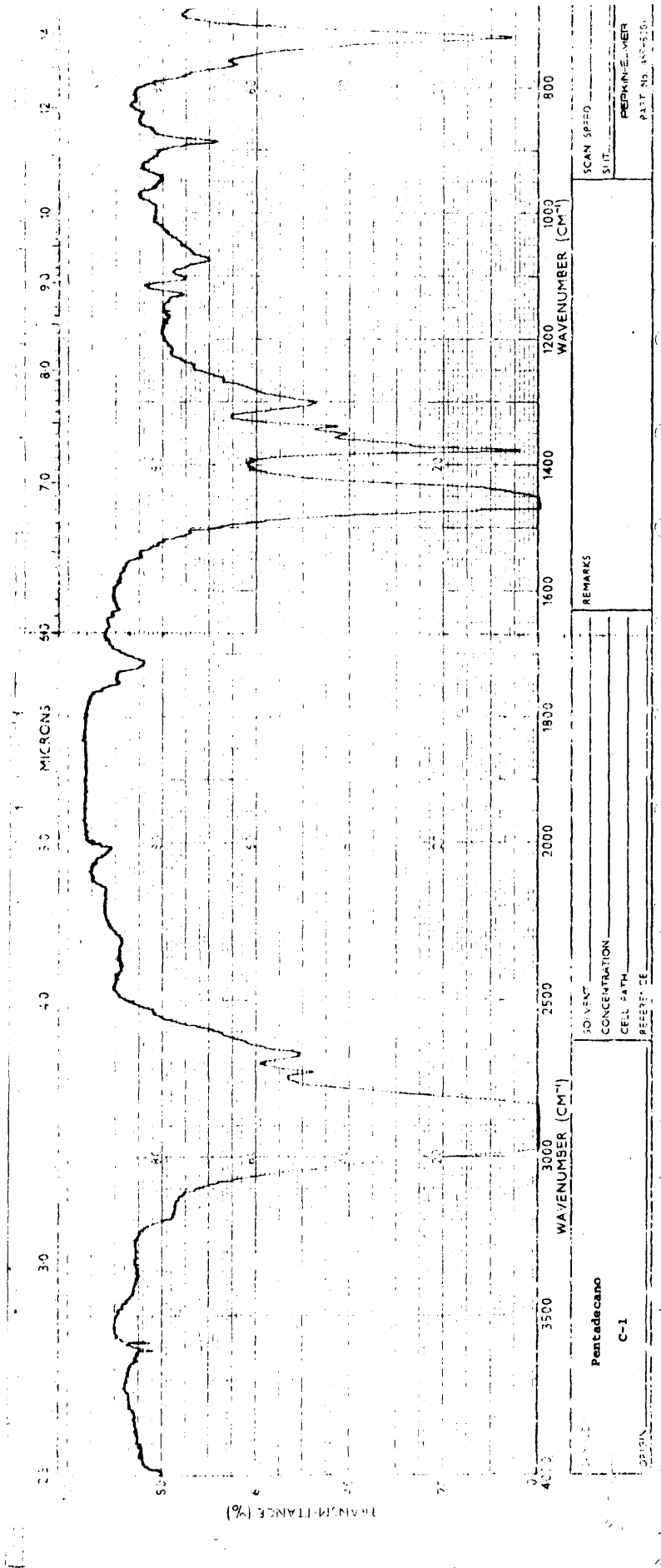
Estirpe	Parafinas totales	Parafinas lineales	Parafinas ramificadas	Pentadecano	Tetrametilpentadecano	Aromáticos
P-1	3500-3300 (m)	3500-3300 (m)		3500-3300 (d)	1745 (d)	3500-3100(d)
	1745 (f)	2500-2700 (d)		1745 (d)	1710 (d)	1710 (d)
	1710 (f)	1770 (d)		1715 (m)		
		1745 (f)		1630 (d)		
		1710 (f)				
	1150 (aumenta)	1260 (d)	No crece	1100- 800(aumenta)		
	1170 (aumenta)	1120* (d)		720 (disminuye)		
	1120* (d)	1100-800 (aumenta)				
	970 (aumenta)	720 (disminuye)				
	930 (d)					
720 (disminuye)						
P-2	1710 (m)		3500-3300 (d)			3400-3100(f)
			1705 (m)			1710 (f)
			1120* (d)			1260 (d)
		No crece		No crece	No crece	1020 (m)
						1000 (m)
P-3	1710 (m)			1710 (d)		3400-3100(m)
	1120* (d)			720 (disminuye)		1710 (f)
	720	No crece	No crece		No crece	1300- 900 (aumenta)
K-21	3600-3200 (f)	3600-3100 (m)	3600-3100 (f)			3400-3100(m)
	1740 (d)	1750 (f)	1740 (hombro,d)			1710 (f)
	1710 (f)	1710 (f)	1710 (f)			1300- 900 (aumenta)
	1120* (f)	265 (disminuye)	1300- 800(aumenta)	No estudiado	No estudiado	
	720 (disminuye)	1300- 800(aumenta)	1060 (d)			
		720 (disminuye)	1025-1035 (d)			
		935 (f)				
P-36	3600-3100 (f)	3500-3100 (d)	1750 (f)			3400-3100(f)
	1745 (f)	1730 (d)(ancha)	1710 (m)			1710 (f)
	1710 (f)		1605 (m)			1300- 900 (aumenta)
	1235 (d)		1075 (aumenta)			
	1120* (f)		1025 (d)	No crece	No crece	
	1150 (d)		770 (disminuye)			
	940 (d)		725 (f)			
720 (disminuye)		690 (f)				



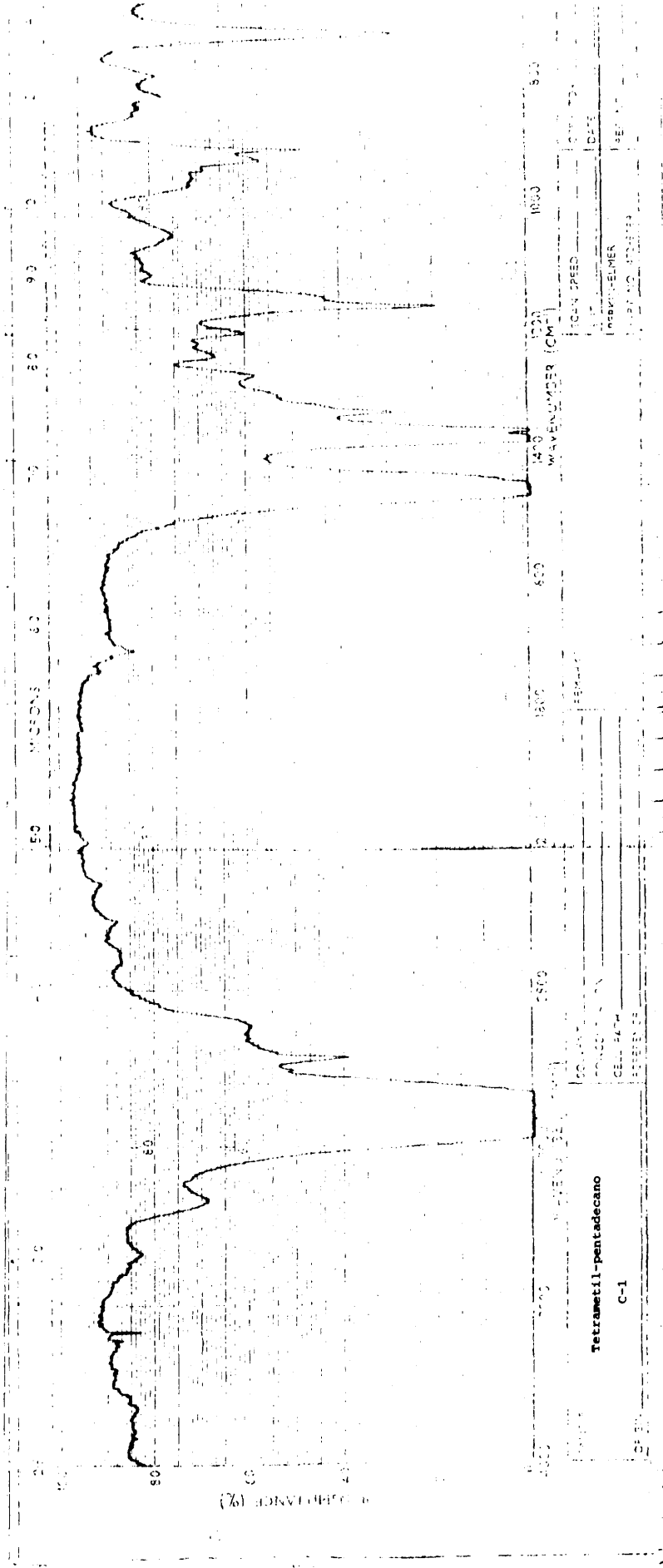
Gráfica 15. Estirpe P-1. Cultivo sobre parafinas totales.



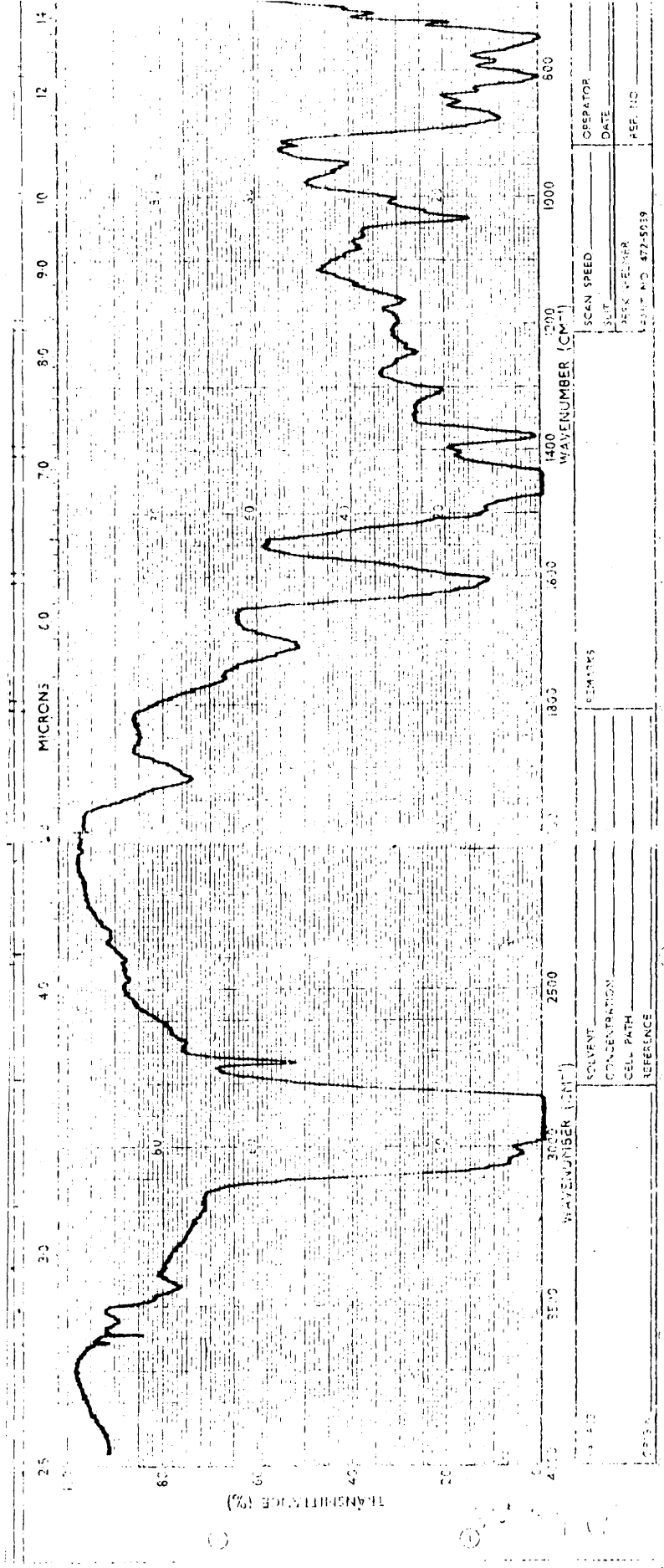
Gráfica 16. Estirpe P-1. Cultivo sobre parafinas lineales. (Control:Gráfica 10)



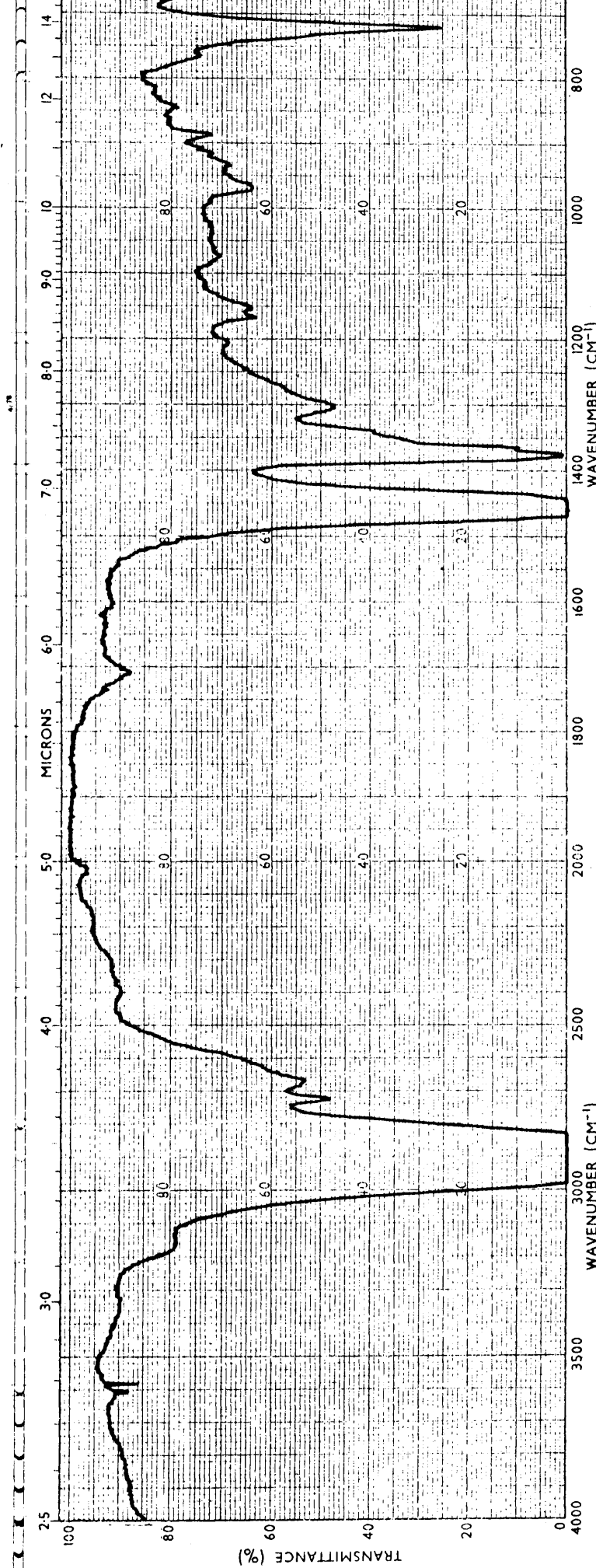
Gráfica 17. Estirpe P-1. Cultivo sobre pentadecano.



Gráfica 18. Estirpe P-1. Cultivo sobre tetrametilpentadecano.

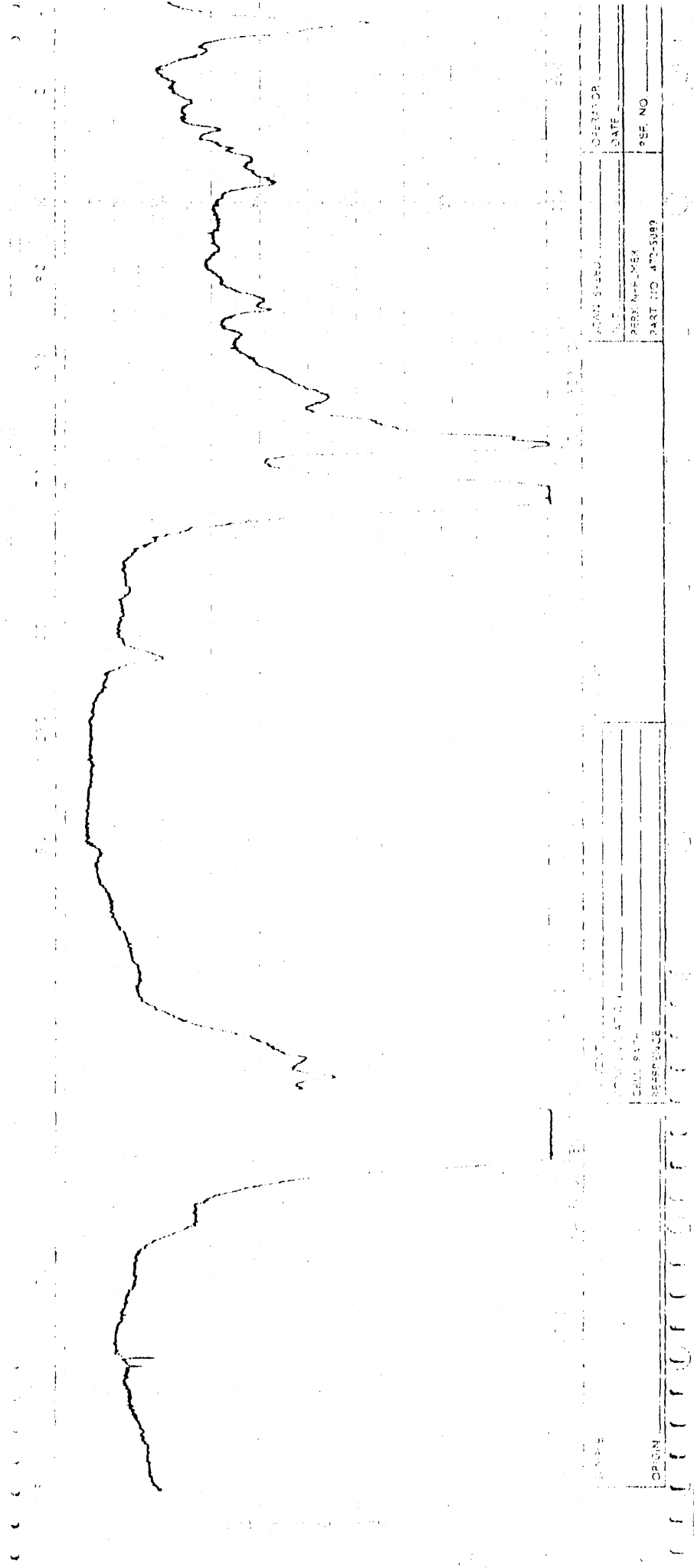


Gráfica 19. Estirpe P-1. Cultivo sobre aromáticos.



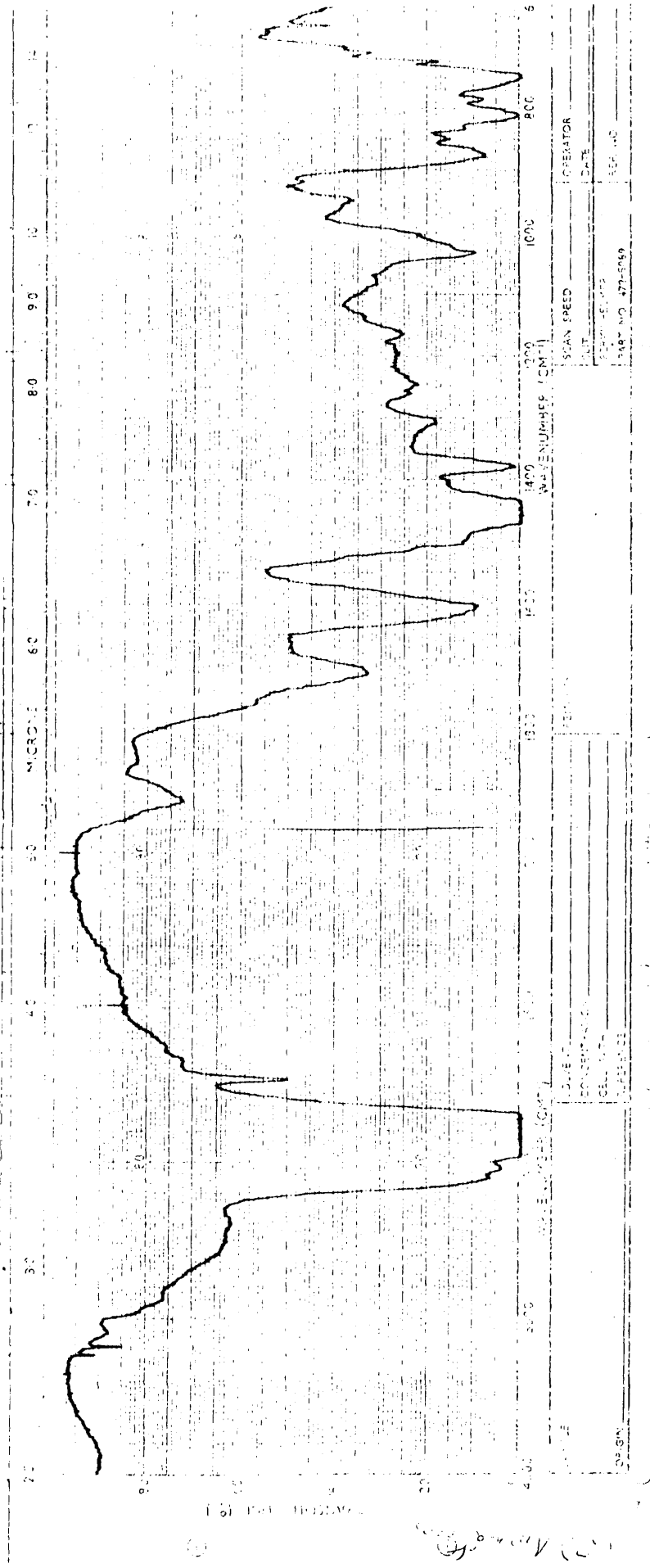
SAMPLE ARTHROBACTER SIMPLEX 7 DIAS FRACCION BROTH SETA COLONIA		SOLVENT _____ CONCENTRATION _____ CELL PATH _____ REFERENCE _____		REMARKS _____ _____ _____	
ORIGIN _____		SCAN SPEED _____ SLIT _____ PERKIN-ELMER PART NO. 472-5089		OPERATOR _____ DATE _____ REF. NO. _____	

Gráfica 20. Estirpe P-2. Cultivo sobre parafinas totales.

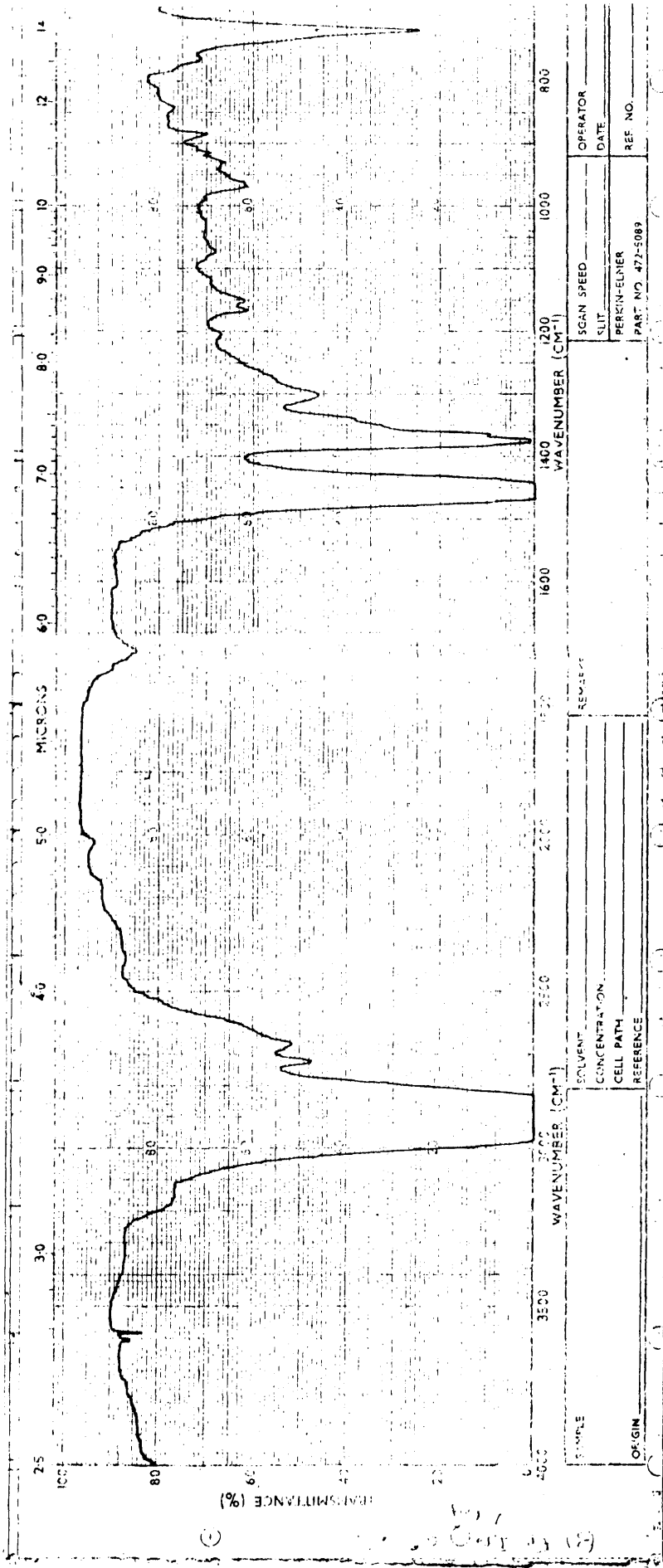


DATE	OPERATOR
TIME	DATE
PERFORMER	PERFORMER
PART NO. 472-5189	PSE. NO.

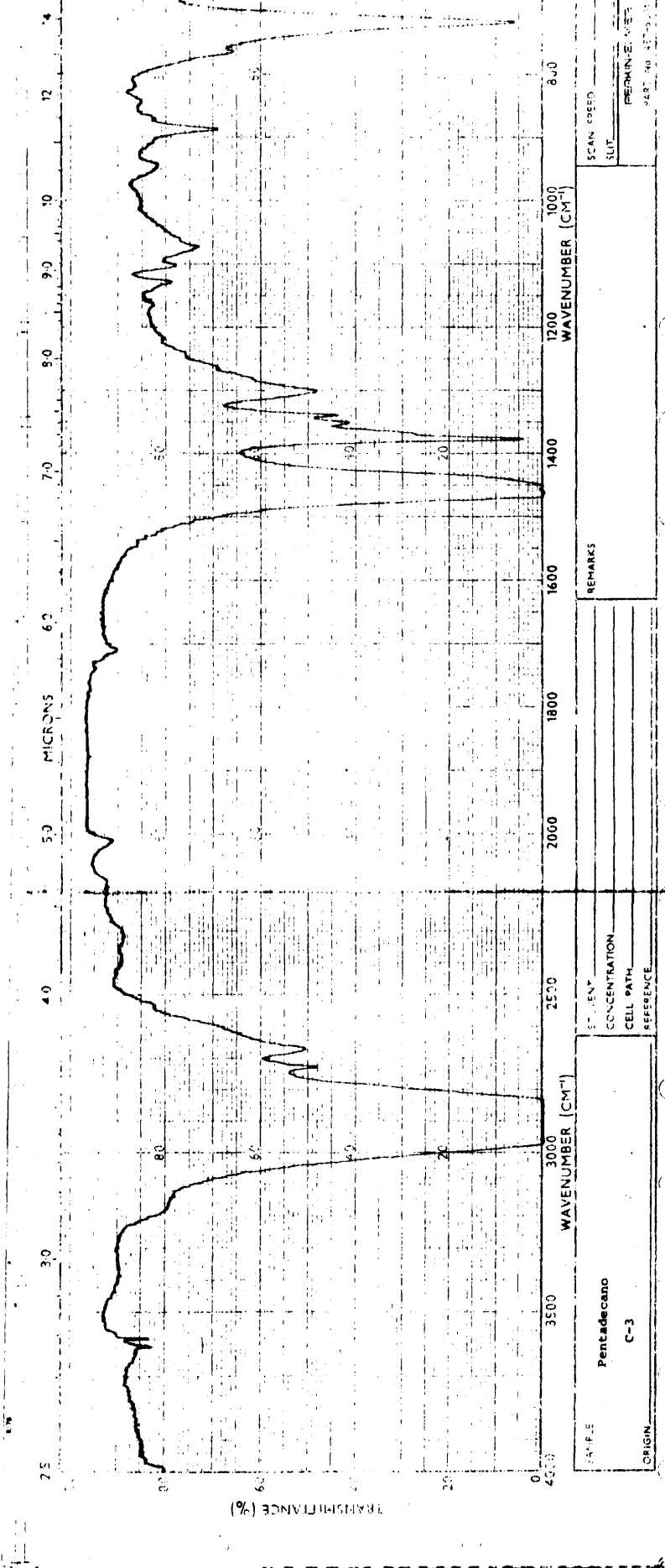
Gráfica 21. Estirpe P-2. Cultivo sobre parafinas ramificadas.
 (Control:Gráfica 9)



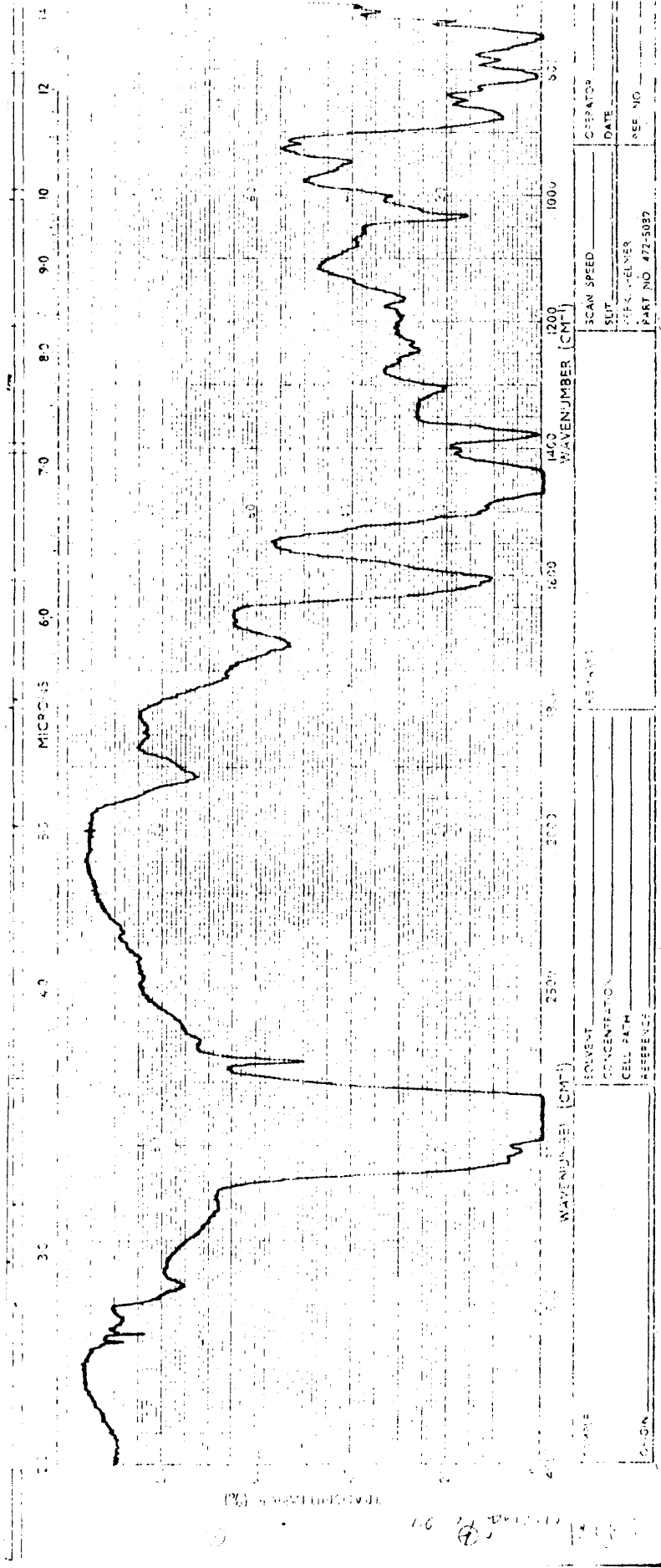
Gráfica 22. Estirpe P-2. Cultivo sobre aromáticos.



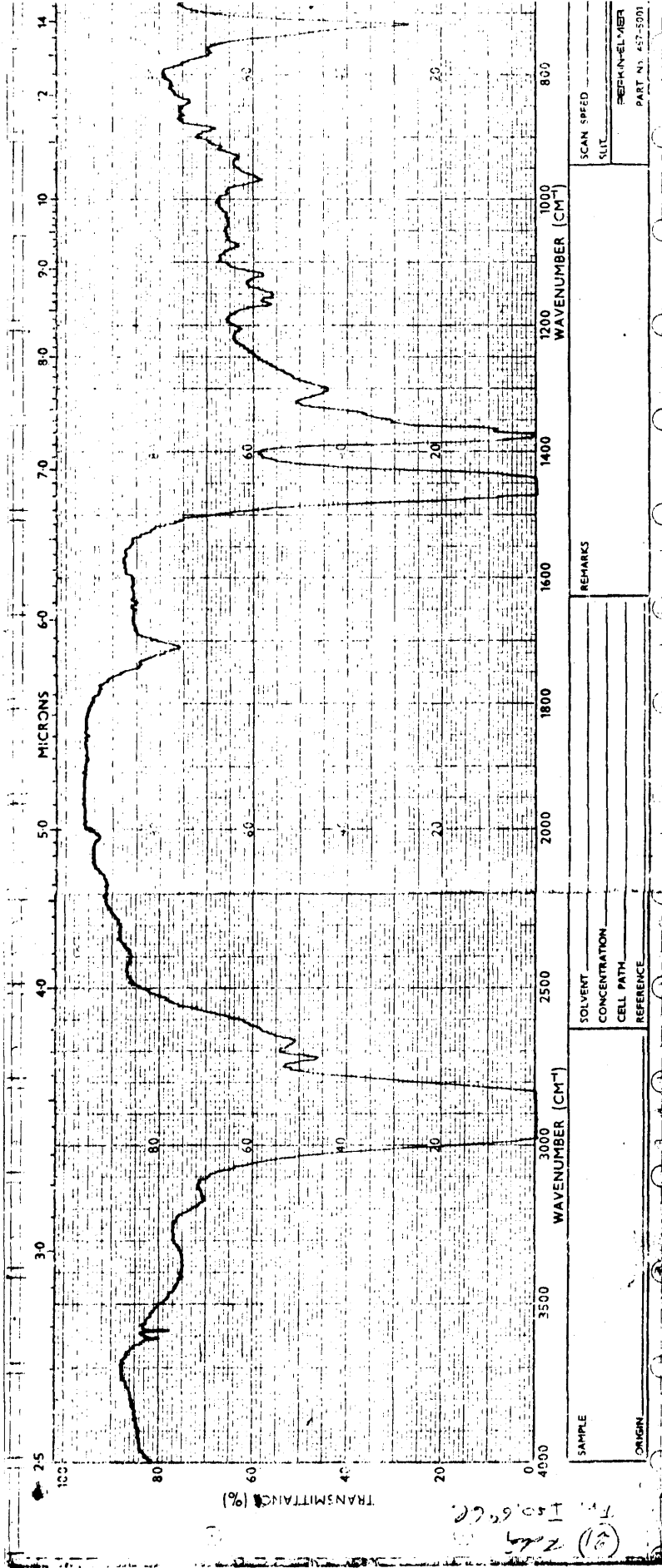
Gráfica 23. Estirpe P-3. Cultivo sobre parafinas totales.



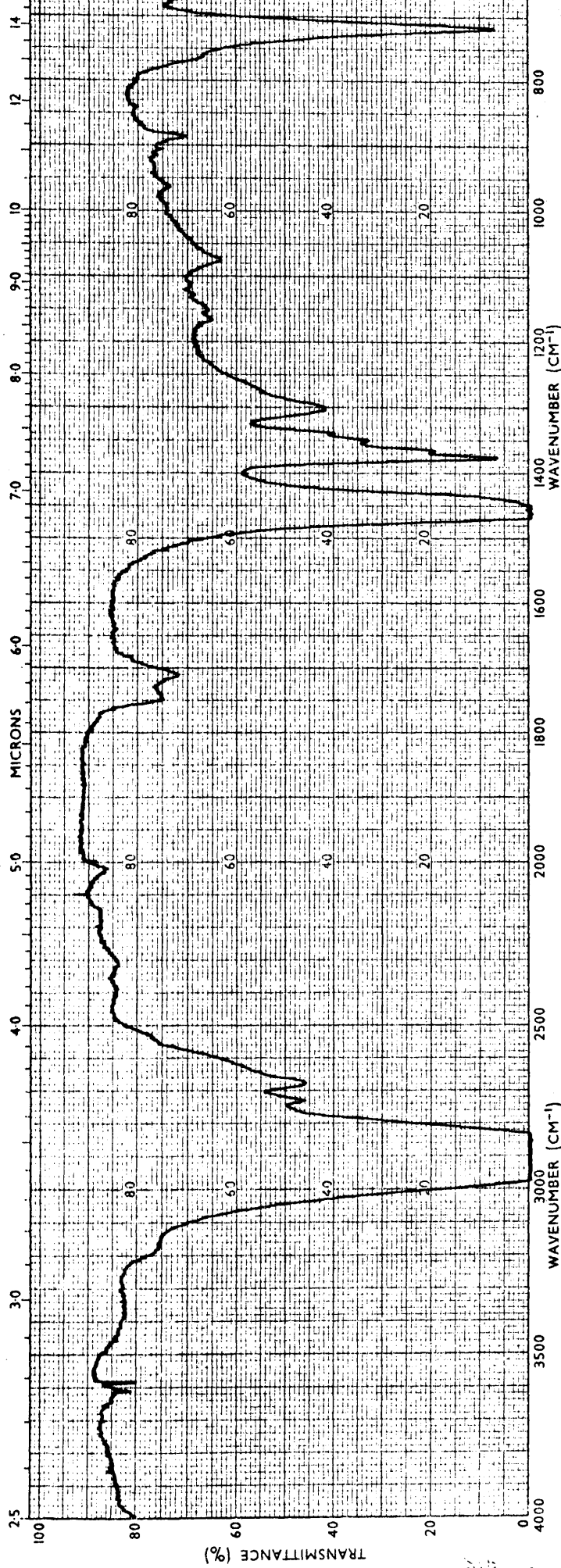
Gráfica 24. Estirpe P-3. Cultivo sobre pentadecano.



Gráfica 25. Estirpe P-3. Cultivo sobre aromáticos.

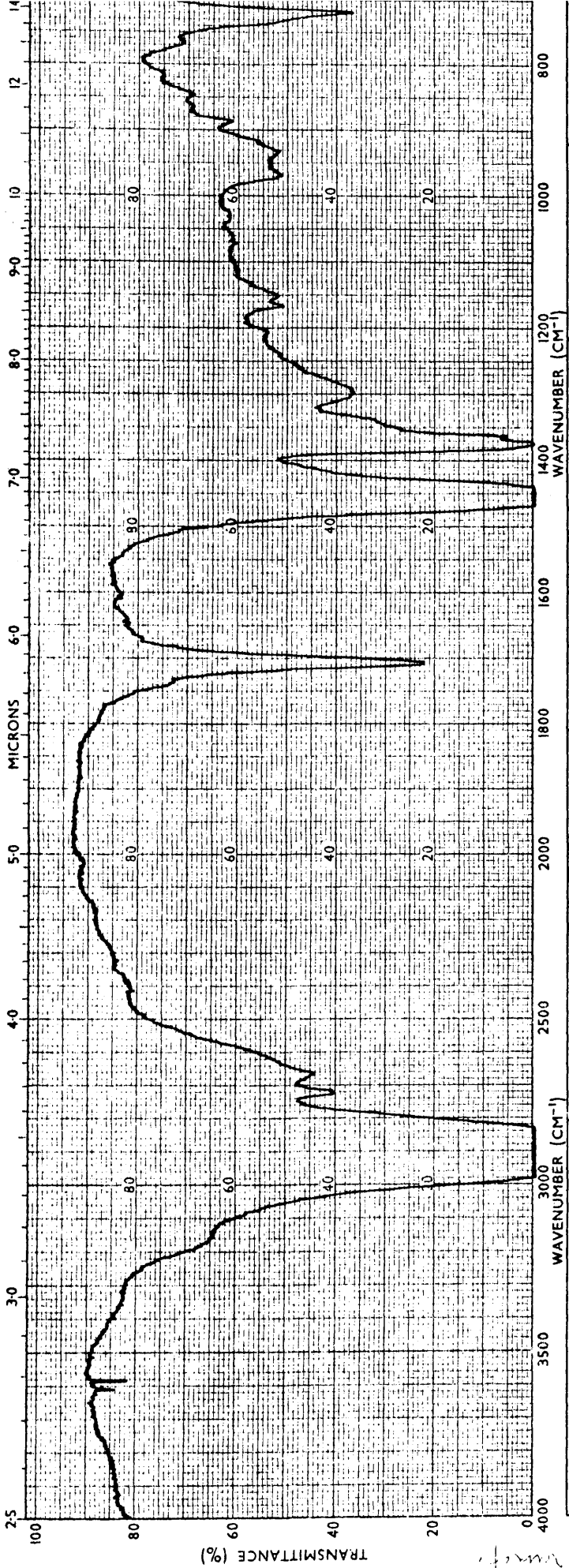


Gráfica 26. Estirpe K-21. Cultivo sobre parafinas totales.



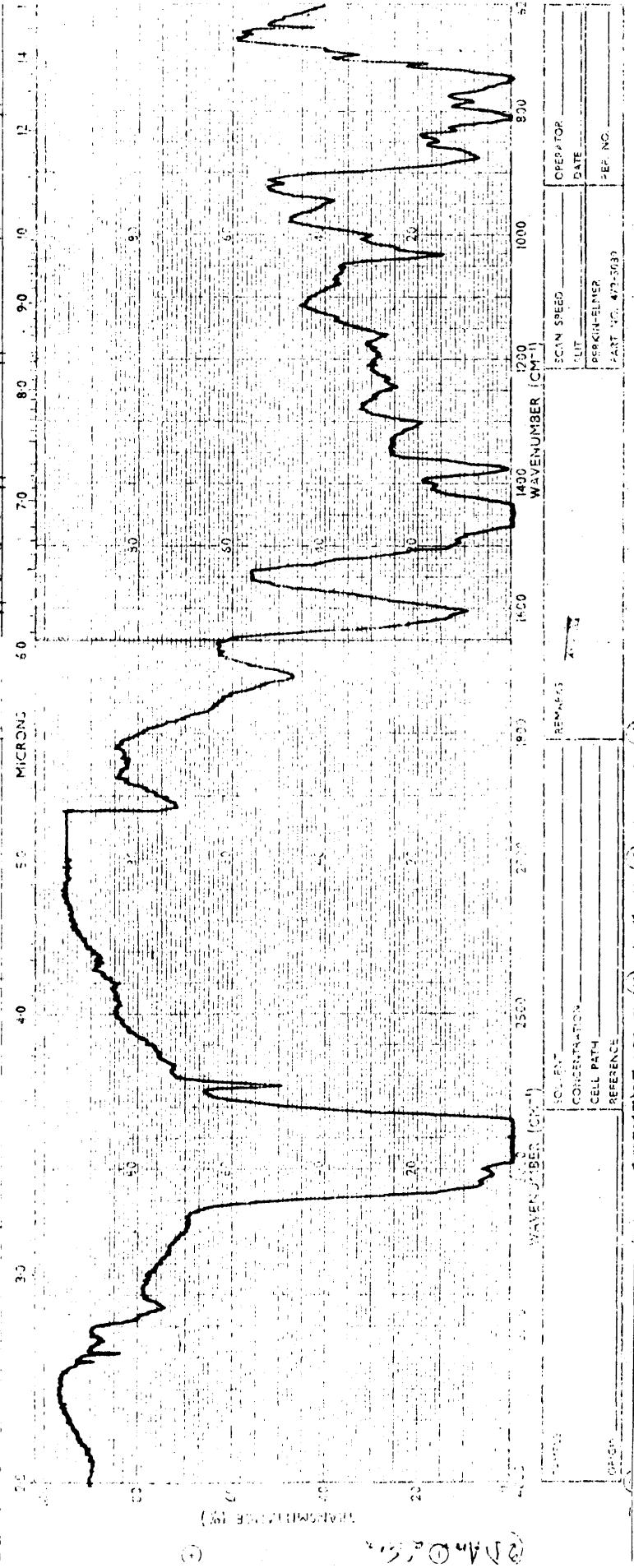
SAMPLE		REMARKS	
CONCENTRATION		SCAN SPEED	
CELL PATH		SLIT	
REFERENCE		PERKIN-ELMER	
		PART NO. 472-5089	
		OPERATOR	
		DATE	
		REF. NO.	

Gráfica 27. Estirpe K-21. Cultivo sobre parafinas lineales.
Control: Gráfica 9).



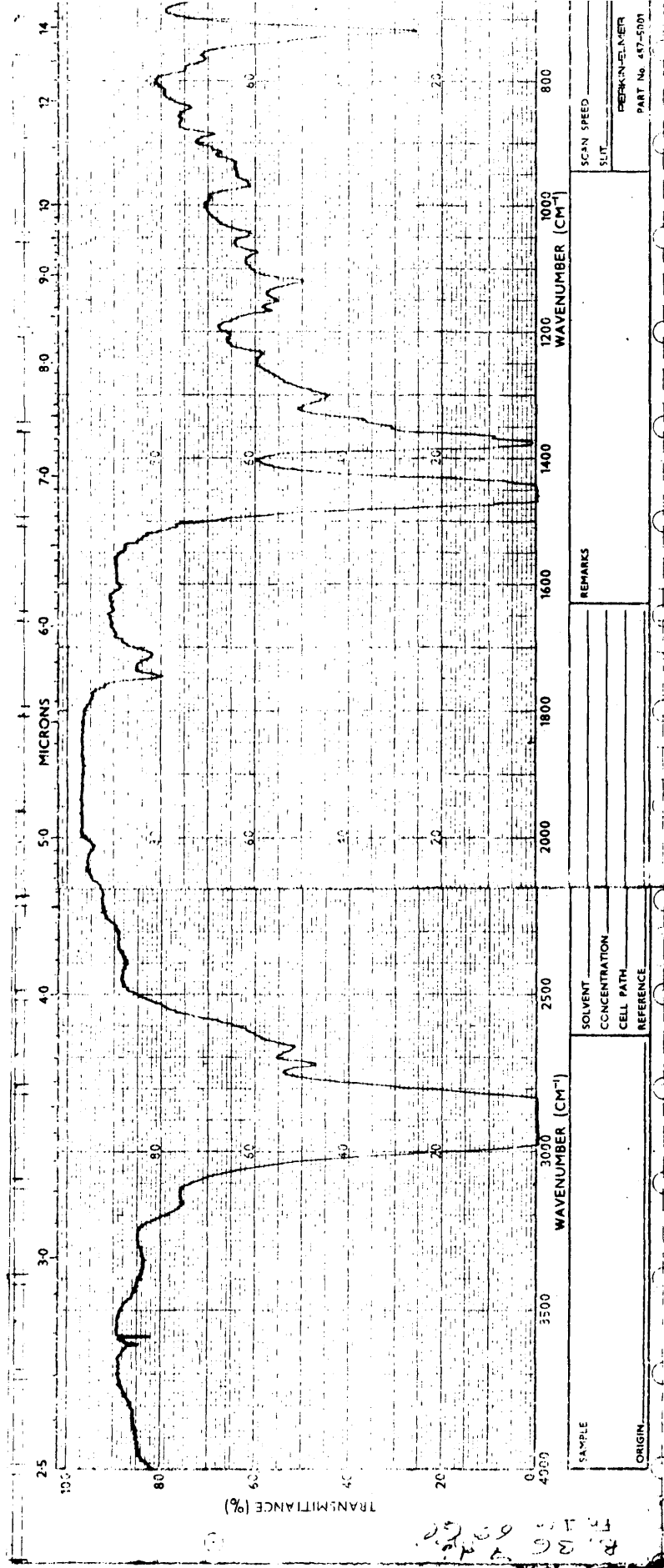
SAMPLE		SOLVENT		REMARKS		OPERATOR	
ORIGIN		CONCENTRATION		SCAN SPEED		DATE	
		CELL PATH		SLIT		REF. NO.	
		REFERENCE		PERKIN-ELMER			
				PART NO. 472-5089			

Gráfica 28. Estirpe K-21. Cultivo sobre parafinas ramificadas.
(Control:Gráfica 9).

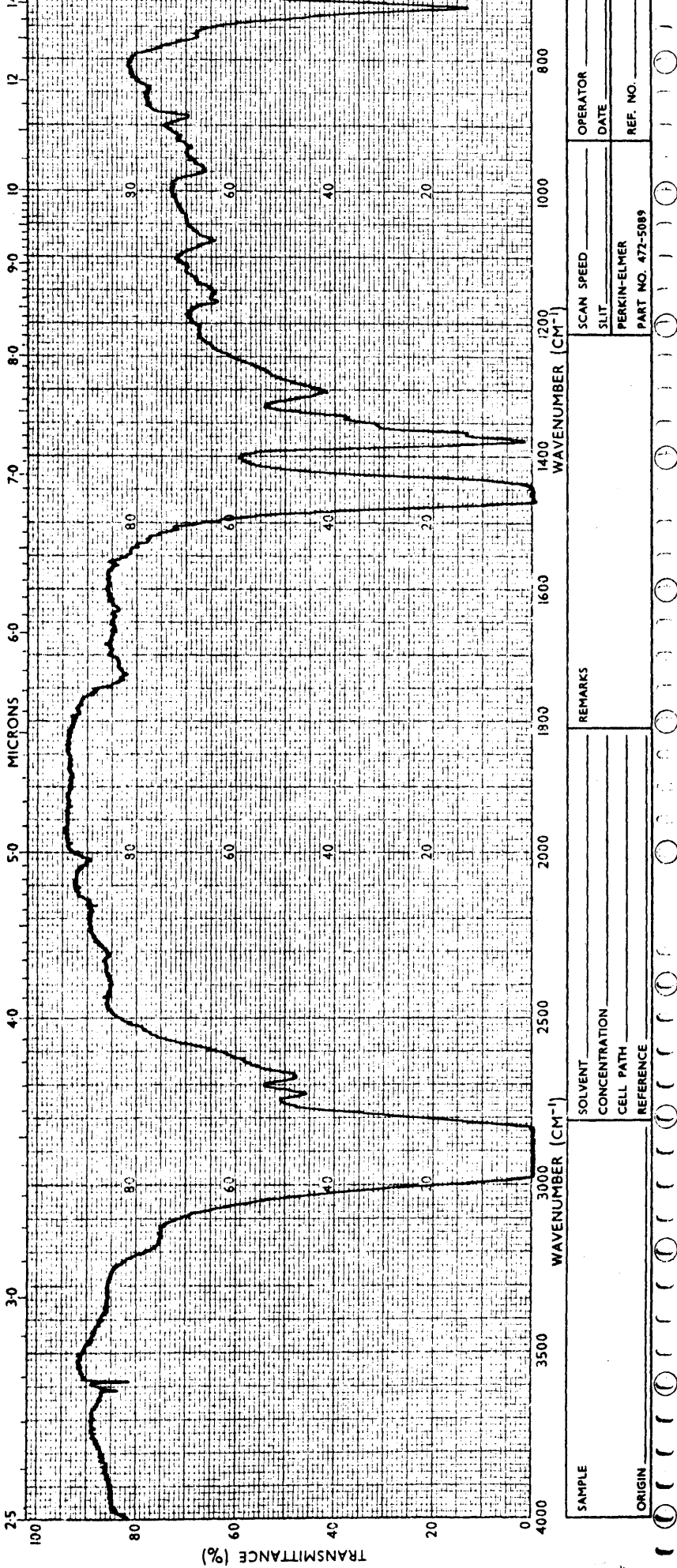


SCIENTIST	OPERATOR
CONCENTRATION	DATE
CELL PATH	PERKIN-ELMER
REFERENCE	PART NO. 479-5633
REMARKS	SCAN SPEED
	SLIT

Gráfica 29. Estirpe K-21. Cultivo sobre aromáticos.

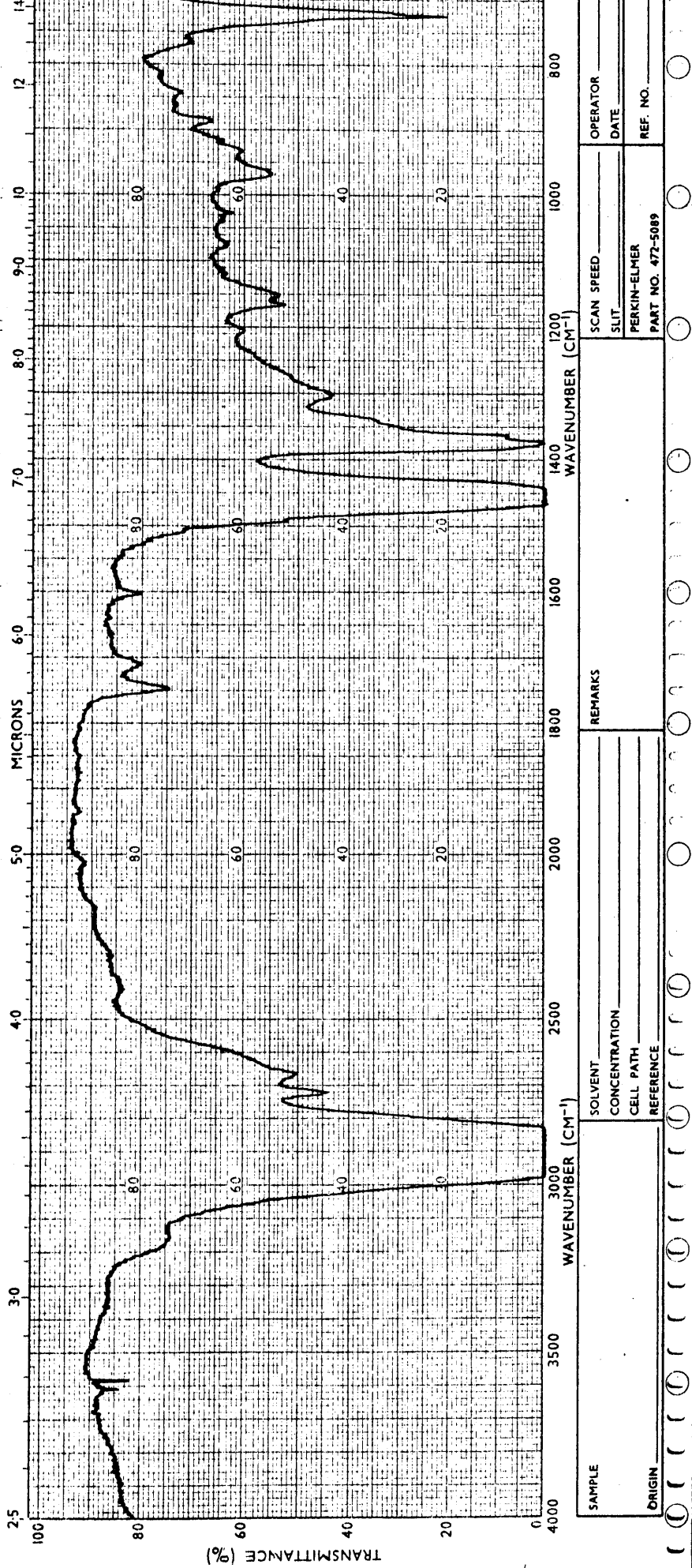


Gráfica 30. Estirpe P-36. Cultivo sobre parafinas totales.



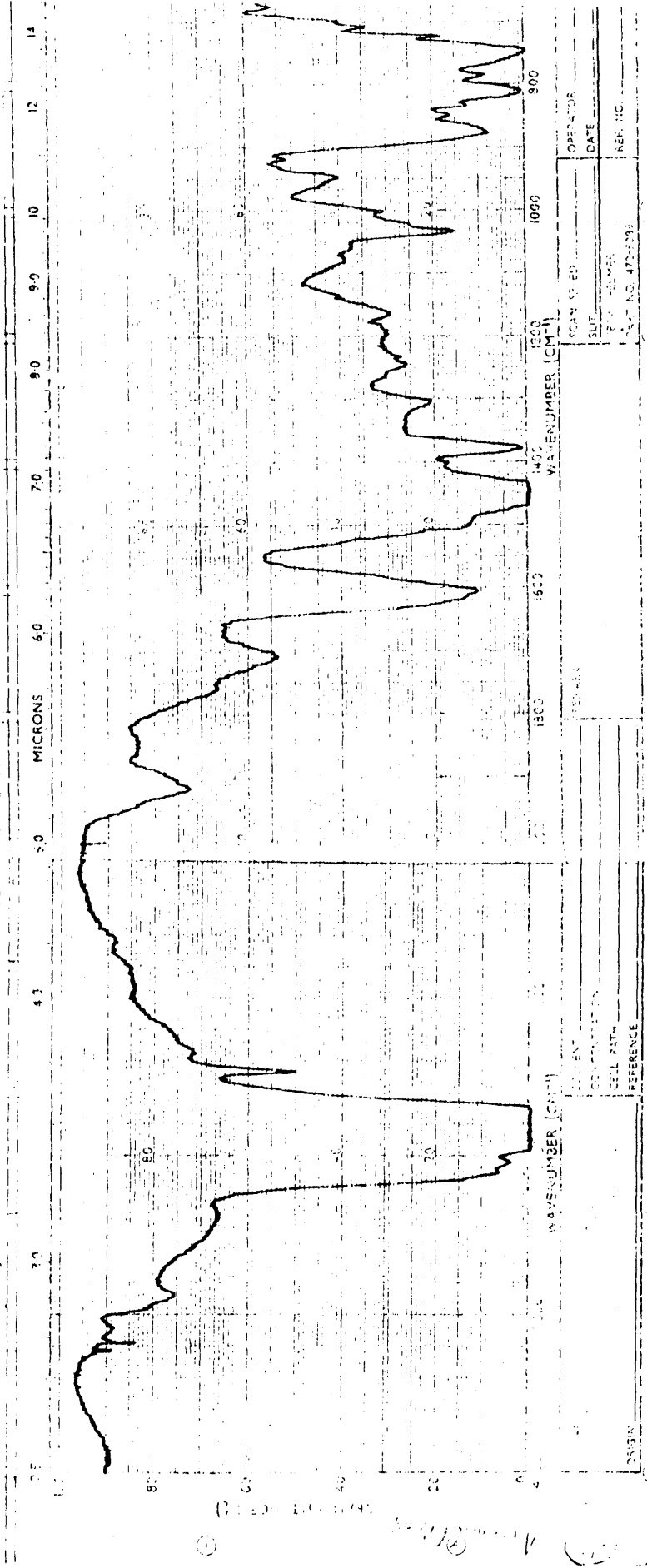
SAMPLE	SOLVENT	REMARKS	OPERATOR
ORIGIN	CONCENTRATION		DATE
	CELL PATH		REF. NO.
	REFERENCE		
		SCAN SPEED	
		SLIT	
		PERKIN-ELMER	
		PART NO. 472-5089	

Gráfica 31. Estirpe P-36. Cultivo sobre parafinas lineales.
Control:Gráfica 9).



SAMPLE	SOLVENT	SCAN SPEED	OPERATOR
	CONCENTRATION		DATE
ORIGIN	CELL PATH	SLIT	PERKIN-ELMER
	REFERENCE	PART NO. 472-5089	REF. NO.
REMARKS			

Gráfica 32. Estirpe P-36. Cultivo sobre parafinas ramificadas.
Control:Gráfica 9).



Gráfica 33. Estirpe P-36. Cultivo sobre aromáticos.

Para abreviar, se hace conjuntamente la asignación de todas las bandas de este grupo de cultivos y además se colocan por regiones puesto que, normalmente, las bandas que responden a un tipo de vibración determinado suelen aparecer en una determinada región.

Región 3600-3100: Aparece en esta región una sola banda en todos los espectros. Banda ancha de difícil localización, y, generalmente, de poca intensidad. Se debe a vibraciones de tensión de enlaces O-H. La posición y la anchura de esta banda parece indicar que se trata de OH asociado intermolecularmente. Corresponde, pues, a la presencia de grupos alcohólicos o fenólicos (sin embargo, la consideración de otras bandas permite eliminar esta segunda posibilidad).

Región 3500-2300: La banda ancha que se insinúa en la mayoría de los espectros, corresponde a vibraciones de tensión de enlaces O-H en grupos carboxílicos. Es una banda de poco valor indicativo, y muy débil siempre.

Región 1800-1600: En esta región aparecen las bandas más significativas en todos los espectros. Entre 1800 y 1700 cm^{-1} son debidas a vibraciones de tensión de enlace C=O. En cambio, por debajo de 1700 creemos que se deberán a vibraciones de tensión de enlaces C=C, pues aunque pueden aparecer bandas carbonílicas en esta zona, estas -- bandas son claramente más intensas que las debidas a dobles enlaces y, por otra parte, sólo aparecen cuando hay una fuerte conjugación y en cualquier caso por encima de 1650 cm^{-1} .

Dentro de la región en que aparecen las bandas de vibración de grupos carbonilos, por encima de -- 1730 cm^{-1} se pueden atribuir a la presencia de ésteres o aldehidos. En estos grupos la posición de la banda carbonílica nunca baja de --- 1720 cm^{-1} incluso cuando el doble enlace aparece conjugado. La consideración de bandas en la región --- 1250-1180 nos permite suponer que se trata mas bien de la segunda posibilidad, es decir, el C=O de aldehidos, pues los ésteres dan en esta región una banda de gran intensidad. Si se observan espectros de ésteres, se llega a la conclusión de que esta segunda banda tiene una intensi-

dad del orden de un 70% de la de --
 1730 cm^{-1} . Desde luego no se puede
 negar absolutamente la presencia de
 ésteres, pero se puede asegurar que
 estarán en pequeña proporción en el
 caso de que los haya.

Por otra parte se podría ob-
 jetar la ausencia de absorción en-
 tre 2750 y 2700 cm^{-1} donde dan ban-
 das de vibraciones de tensión del -
 CH los aldehidos. Sin embargo, aun-
 que estas bandas son muy caracterís-
 ticas, tienen muy poca intensidad y
 estarían enmascaradas por las bandas
 parafínicas de esta misma región --
 que aparecen en los controles.

Para las bandas por debajo
 de 1730 cm^{-1} la asignación resulta
 más difícil. Pueden ser debidas a -
 carbonilos cetónicos en cetonas aci-
 clicas y saturadas (las insaturacio-
 nes rebajarían la posición a números
 de onda menores que los que presen-
 tan estas bandas) o bien a carboni-
 los de ácidos carboxílicos satura-
 dos o no (aquí la conjugación reba-
 ja la posición también pero dentro
 de los límites en que aparecen en -
 nuestros espectros). La absorción -
 entre 3500 y 2300 cm^{-1} que se insi-
 núa en la mayoría de los espectros
 indicaría que se trata de la segun-
 da posibilidad, pero esta banda, co-
 mo ya hemos hecho notar, es poco de-
 cisiva por su débil intensidad. Lo
 más que podemos afirmar es que es-
 tas bandas (1715, 1710 y 1705) se-
 rán debidas, al menos en parte, a -
 la presencia de ácidos carboxílicos.

En cuanto a las bandas a --
 1630 y 1605 cm^{-1} creemos que se pue-
 den asignar sin duda a vibraciones
 de tensión de enlaces C=C. En ningún
 caso los carbonilos dan bandas en -
 posiciones tan bajas y, los anillos
 aromáticos presentan más de una ban-
 da en esta región (y a números de -
 onda más bajos).

La conjugación rebaja tam-
 bién la posición de estas bandas, -
 por lo que la asignación de la de -
 1605 cm^{-1} no ofrece lugar a dudas.
 Se trata de dobles enlaces conjuga-
 dos bien sea con el carbonilo a ---
 1710 o en anillos aromáticos si se
 dan otras bandas.

La de 1630 cm^{-1} podría suponerse debida a un doble enlace conjugado o no. La presencia de una banda a 890 cm^{-1} y otra generalmente a 790 cm^{-1} confirmaría en ciertos casos en que aparecen estas bandas asociadas, que el doble enlace no está conjugado. La ausencia de las bandas citadas en otros espectros, indica que en ellos no está conjugado, por su baja posición.

Hay que tener siempre en cuenta, que la asignación de estas bandas está facilitada por la relativa sencillez de los espectros de tipo parafínico, donde se puede excluir la presencia de compuestos ternarios (los análisis elementales hechos en algunas muestras lo confirmaron siempre) y de anillos aromáticos. Todo ello elimina muchas posibilidades no tratadas aquí.

Región 1400-800:

En primer lugar se nota en toda la región un aumento considerable de absorción como consecuencia de los cultivos. Suponemos que es debido a polimerizaciones, además de la absorción fuerte de los compuestos oxidados.

Las bandas que aparecen en esta región, si tenemos en cuenta asignaciones anteriores, deben ser atribuidas a vibraciones de tensión de enlaces C-O y de flexión de enlaces O-H. Desgraciadamente la intensidad de estas bandas y su posición no es de gran valor diagnóstico.

Sin embargo podemos asegurar que estas bandas ocupan posiciones de mayores números de onda en los casos de ésteres que en los de ácidos carboxílicos; así en los primeros no debe bajar de 1180 y en los segundos se sitúa hacia $1165-1155$ por efecto inductivo. Los ácidos carboxílicos dan además bandas de relativa intensidad hacia 1290 de combinación de tensión del CO y flexión del OH y estas últimas vibraciones fuera del plano dan una banda poco intensa a 940 cm^{-1} que se estudia más adelante.

Por otra parte las bandas fuertes entre 1365 y 1500 cm^{-1} restan posibilidades de interpretación

porque podrían enmascarar otras bandas en esta zona.

Por debajo de 1100 cm^{-1} los alcoholes primarios dan bandas de flexión de enlaces OH, que quizás podrían explicar algunas de las que aparecen en nuestros espectros.

Pasaremos revista a algunas bandas que pueden ser interpretadas con mas seguridad.

Bandas a 1170 y 1150 cm^{-1} . La variación de intensidad de estas bandas respecto de los controles, puede su poner una variación en el mismo sen tido de la concentración de parafinas ramificadas (vease la asigna--- ción de estas dos bandas en el estu dio de los controles).

Lo mismo podemos decir para las bandas hacia 970 cm^{-1} y, con me nos claridad, la de 840 cm^{-1} .

La observación de los espec tros de parafinas lineales y parafi nas ramificadas (creemos que en --- nuestro gas-oil o no existe o son - muy escasas las cicloparafinas) con firman la asignación anterior.

Bandas hacia 940 cm^{-1} : La absorción en esta zona, se debe a vibraciones de flexión del OH fuera del plano - en grupos ácidos carboxílicos. Esta banda es sin embargo de poca inten sidad y por tanto es difícil recono cerla en nuestros espectros.

Región $800-625\text{ cm}^{-1}$: La banda de mayor interés en esta - región es la de 720 cm^{-1} , (ya estu diada en la asignación de las bandas de los espectros controles) cuya va riación de intensidad es de gran va lor para decidir la proporción de - parafinas lineales utilizadas en el metabolismo (ver más adelante).

La aparición de un hombro - mejor marcado que en los controles hacia 730 cm^{-1} , no hace sino confir mar la concentración de parafinas - ramificadas, cuyos esqueletos linea les por ser de más corta cadena --- aumentan el número de onda de esta banda. La observación de los espec tros de parafinas lineales y penta decano, donde no existe esta posibi

lidad y efectivamente no aparece dicho hombro tras el cultivo, es un dato confirmativo más. Finalmente si se consideran juntos varios espectros de cultivos sobre parafinas totales, se observa que el hombro es más pronunciado cuanto más se acorta la banda a 720 cm^{-1} , lo cual de nuevo apoya nuestra hipótesis.

Respecto de las bandas a 725 y 690 cm^{-1} que aparecen en el espectro de parafinas ramificadas del cultivo P-36 (y en los cultivos de otras estirpes), se deben evidentemente a compuestos de tipo aromático, aunque no se aprecian bandas hacia 1500 cm^{-1} que pueden quedar enmascaradas por la de 1460 de gran intensidad. Sin embargo, sobre el tipo de compuestos de que se trata no se puede decidir nada con la sola consideración del espectro IR.

Revisión de los espectros.-

Destacaremos aquí los rasgos más significativos de los espectros cuyas variaciones respecto de los controles sea intensa, así como las características que creamos interesantes en el crecimiento de algunas estirpes.

La estirpe P-I se caracteriza por utilizar casi exclusivamente las parafinas lineales y en todos los casos presenta dos bandas de grupos carbonilos. La oxidación que produce en estas fracciones es intensa, por lo que ha sido estudiada con más detalle en otras experiencias (ver más adelante).

El resto de las estirpes de este grupo oxidan mejor -- las parafinas ramificadas, caso insólito y que nos parece de -- gran interés por no haber sido citado en la bibliografía. Sin embargo cabe destacar que la mayoría de ellas no crece en tetrametilpentadecano. Destaca particularmente la estirpe P-2, que en parafinas totales aumenta la intensidad de la banda a 720 cm^{-1} , es decir, selecciona en presencia de los dos tipos de moléculas, las ramificadas. Para las otras estirpes, particularmente la K-21, hay a pesar de todo una disminución de esta banda.

Es preciso hacer notar, la enorme intensidad de la banda a 1710 cm^{-1} en el cultivo de K-21 sobre la fracción de parafinas ramificadas. Esta banda tan intensa solo va acompañada de una banda, destacable pero débil a 935 cm^{-1} por lo que debemos atribuirle a grupos C=O en ácidos carboxílicos (además obsérvese la disminución de pH en el medio). Finalmente, entre los cultivos sobre hidrocarburos aromáticos en los que, a pesar de que el crecimiento fue más alto de lo que cabía esperar, es mucho -

más difícil sacar conclusiones por la poca "claridad" del espectro, destaca el crecimiento de la estirpe P-2, que dió los valores más altos de todos los cultivos de las 40 estirpes ensayadas. En general son espectros de poco interés, porque la intensidad de las bandas aromáticas y de sustituciones enmascaran otras que aclararían el tipo de oxidación.

4.6.2.2. - Resultado de los cultivos de las especies del género Brevibacterium.

Los valores de crecimiento y pH final de estos cultivos se dan en la tabla LX.

Se incluyen en este grupo las estirpes P-8, G-27 y G-32. Los espectros correspondientes están representados en los gráficos 34 a 46.

Las bandas diferenciales de estos espectros respecto de los controles se recogen en la tabla LXI.

Asignación de bandas y discusión.

Región 3600-3100: Como ya se ha indicado, aparecen en esta región una banda ancha de vibraciones de tensión de enlaces O-H. El aspecto de esta banda indica que los OH no están libres sino asociados intermolecularmente.

Región 3500-2300: Aunque no se han señalado bandas en esta región, considerando la forma del espectro entre 3500 y 2300 cm^{-1} , se puede deducir que existen aunque son débiles; especialmente en los tres primeros cultivos de las estirpes G-27 y G-32. Por otra parte se debe insistir en que estas bandas nunca aparecen bien marcadas.

Región 1800-1600: En la mayor parte de los espectros solo hay una banda fuerte en esta región, situada a 1710 cm^{-1} . Las bandas correspondientes a carbonilos de ésteres o aldehidos no aparecen nunca en cultivos sobre parafinas ramificadas y solo se ven hombros débiles en las lineales.

En cuanto a las vibraciones de tensión de enlaces C=C en moléculas insaturadas, las bandas aparecen con bastante regularidad asociadas a las de grupos carbonilos y con una intensidad normal. La presencia de dos bandas (1710 y 1600 aproximadamente) creemos que no ofrece lugar a dudas respecto a la conjugación del carbonilo y el doble enlace.

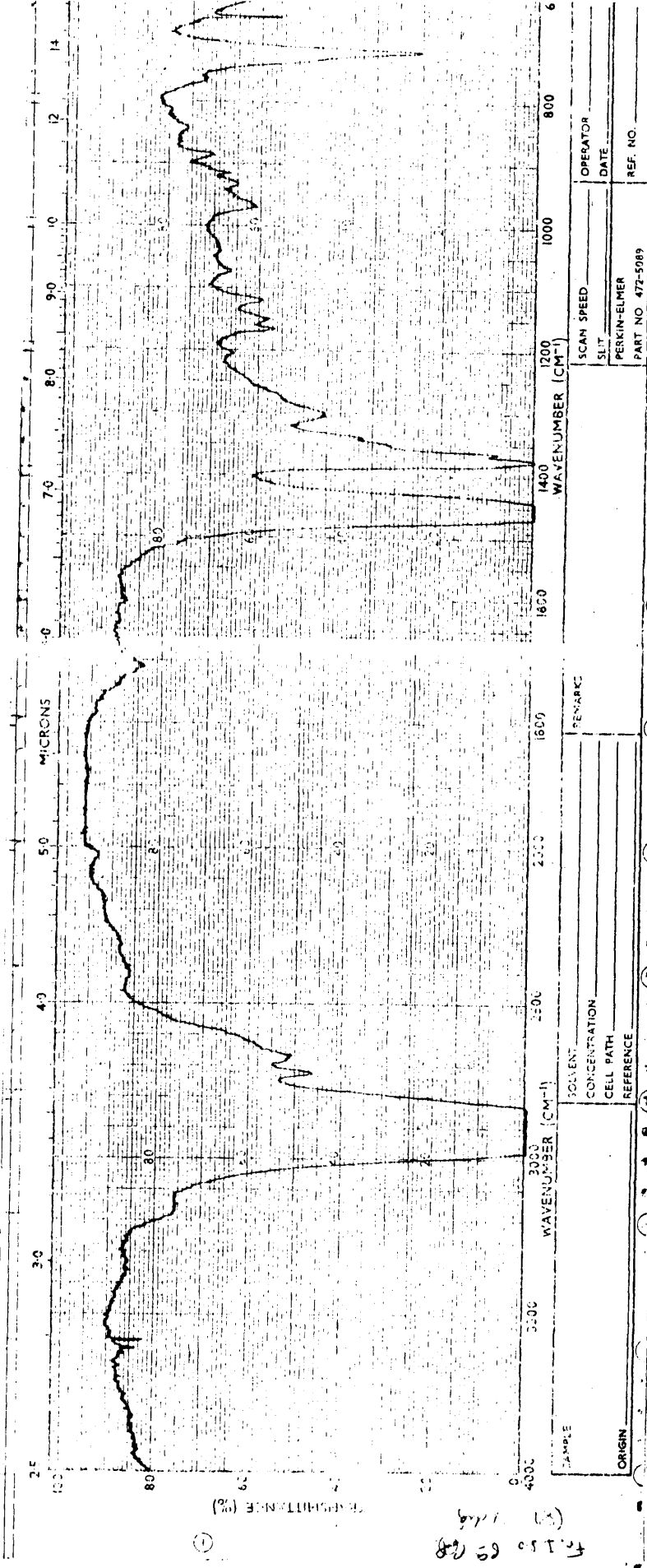
Región 1400-800: Las bandas a 1375 y 1365 cm^{-1} se deben a vibraciones de flexión simétrica de grupos ---CH_3 . Su aumento de intensidad responde a un aumento paralelo en la concentración de parafinas ramificadas (lo que se puede comprobar comparando los espectros de parafinas lineales y ramificadas).

TABLA LX: Valores de crecimiento y pH final de los cultivos de estirpes del género Brevibacterium.

Estirpe	Parafinas totales		Parafinas lineales		Parafinas ramificadas		Pentadecano		Tetrametil-pentadecano		Aromáticos	
	Crecimiento	PH. final	Crecimiento	PH. final	Crecimiento	PH. final	Crecimiento	PH. final	Crecimiento	PH. final	Crecimiento	PH. final
P-8	0,015	7	-	-	-	-	-	-	-	-	0,020	7
G-27	0,035	5,5	0,030	6,5	0,020	5,5	0,030	6,5	0,035	6,5	0,030	6,5
G-32	0,045	6,5	0,250	6	0,150	7	0,075	6	0,065	5	0,025	6,5

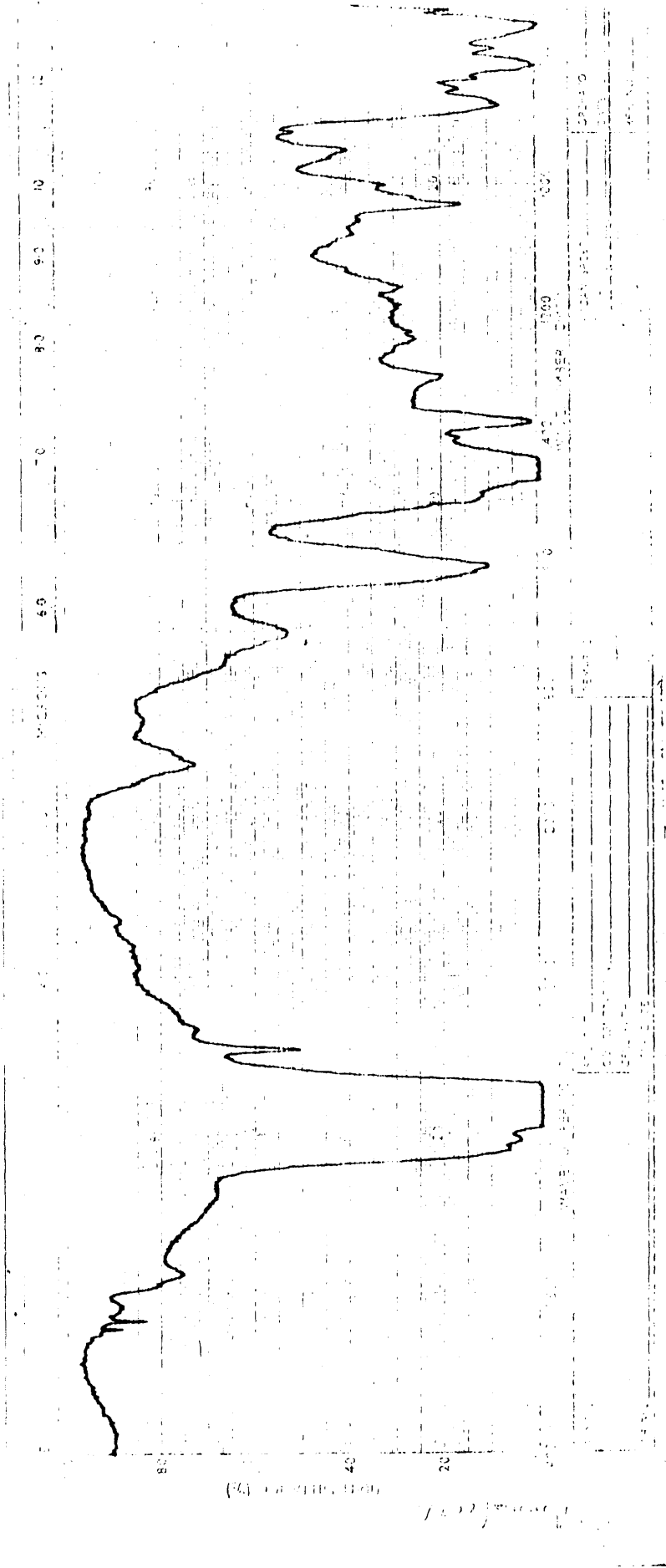
Tabla LXI: Género Brevibacterium. Bandas diferenciales entre - los espectros de cultivos y sus respectivos controles.

Estirpe	Parafinas totales	Parafinas lineales	Parafinas ramificadas	Pentadecano	Tetrametilpentadecano	Aromáticos
P-8	1710 (m) 720 (disminuye)	No crece	No crece	No crece	No crece	3400-3100 (f) 1705-1710 (f) 1300- 900 (aumenta)
G-27	1740 (d) 1710 (f) 1805 (d) 720 (disminuye)	3500-3100 (d) 1740-1710 (m) 1630 (d)	1710 (d) 1605 (d) 1030 (d)	1710 (d)	Sin variaciones	3400-3100 (f) 1710 (f) 1260 (d)
G-32	3500-3100 (m) 1710 (f) 1600 (d) 1375 (aumenta) 1365 (aumenta) 1120* (d) 720 (disminuye)	3500-3100 (m) 1735 (m) 1710 (f) 720 (disminuye)	1710 (m) 720 (aumenta)	3350 (f) 1745 (m) 1710 (d) 1300-900(aumenta) 720 (disminuye)	3500-3100 (d) 1710 (m)	3400-3100 (f) 1710 (f) 1120* (m)

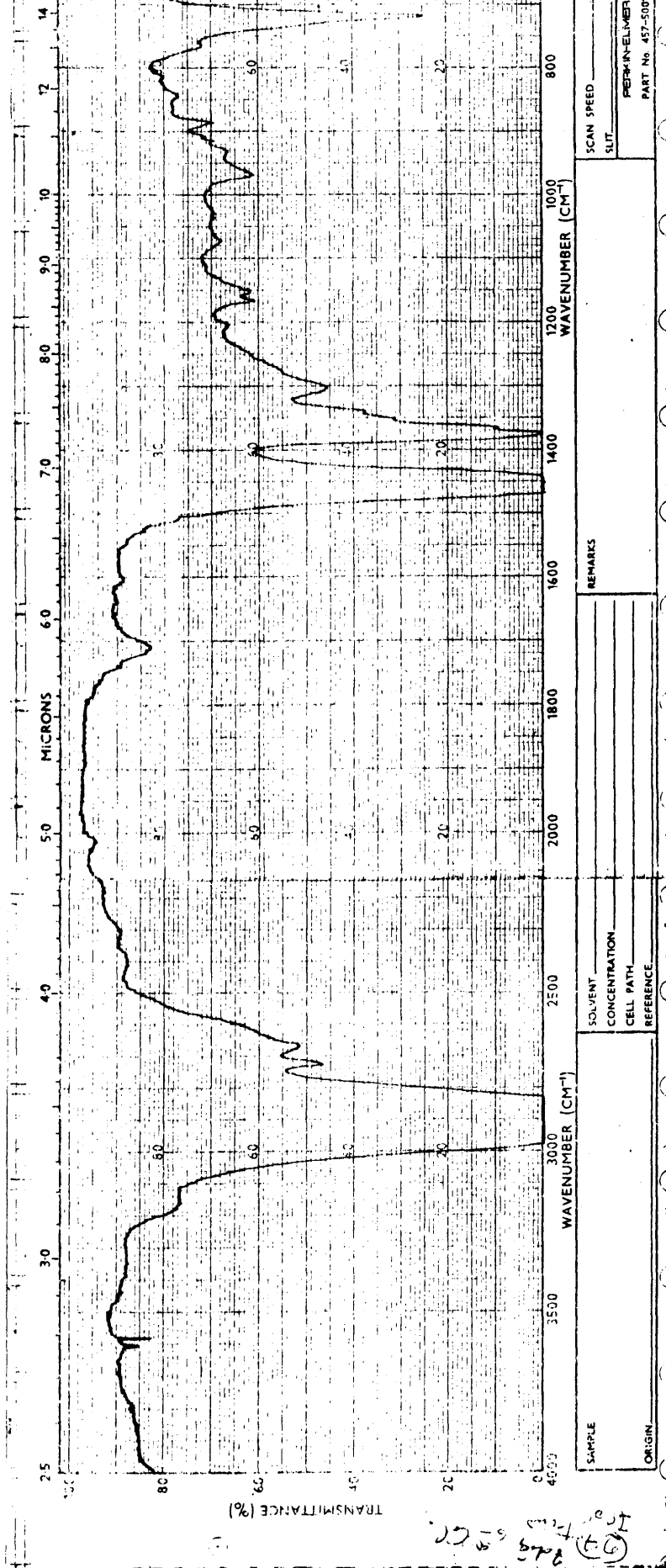


Gráfica 34. Estirpe P-8. Cultivo sobre parafinas totales.

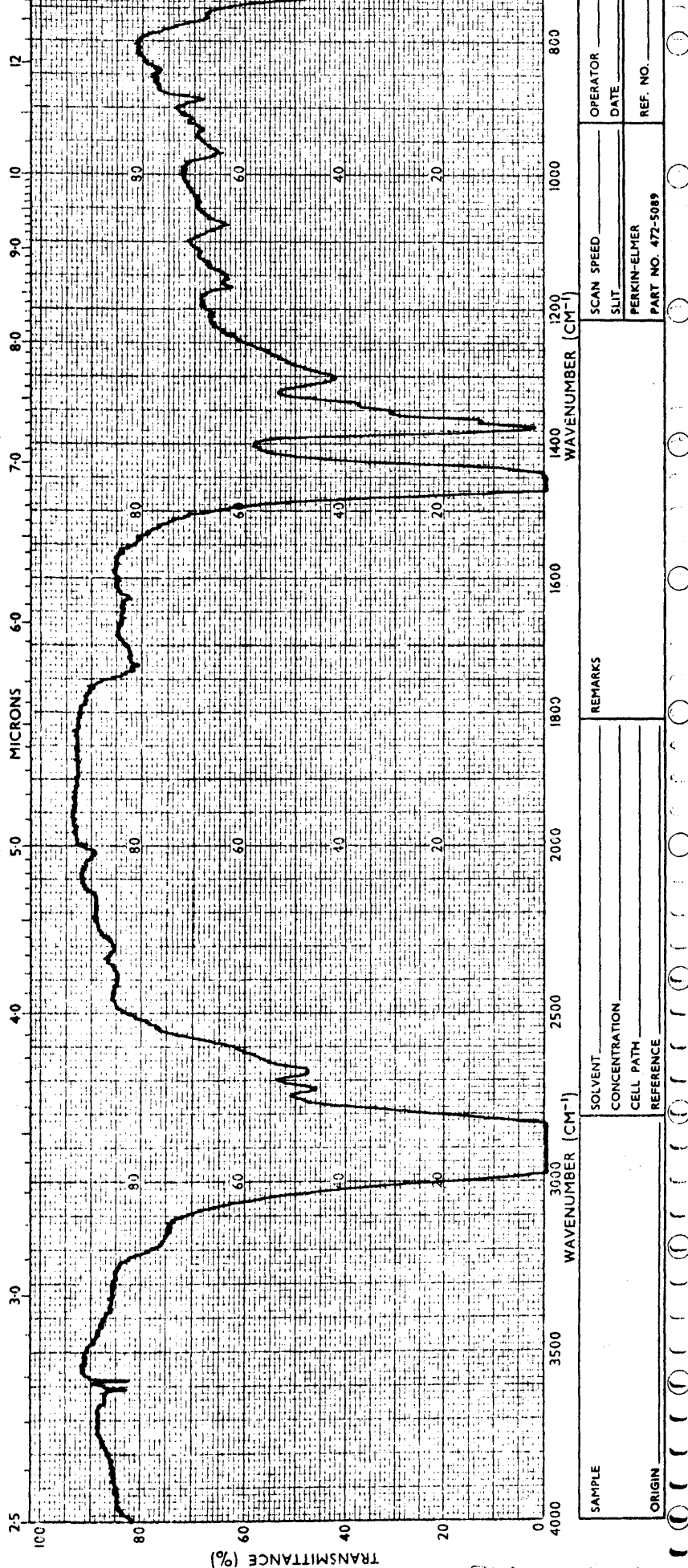
SAMPLE		SCAN SPEED		OPERATOR	
ORIGIN		SLIT		DATE	
CONCENTRATION		PERKIN-ELMER		REF. NO.	
CELL PATH		PART NO 472-5089			
REFERENCE					
REMARKS					



Gráfica 35. Estirpe P-8. Cultivo sobre aromáticos.



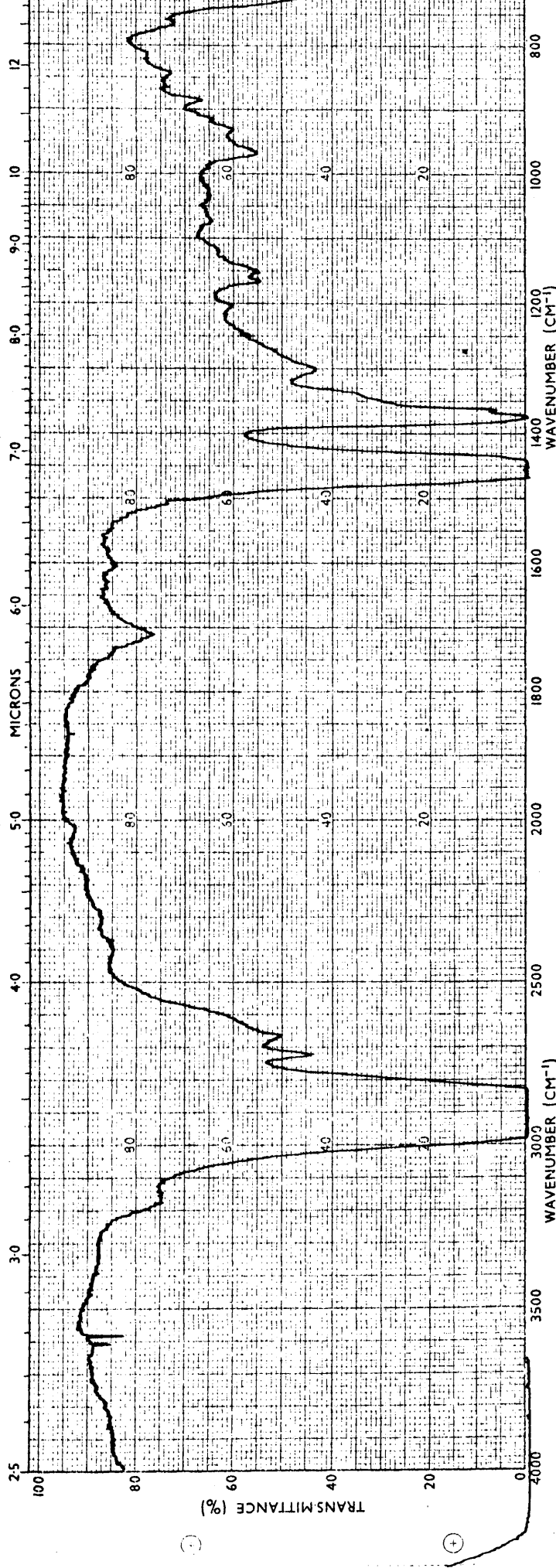
Gráfica 36. Estirpe G-27. Cultivo sobre parafinas totales.



SAMPLE	SOLVENT	REMARKS	SCAN SPEED	OPERATOR
	CONCENTRATION		SLIT	DATE
ORIGIN	CELL PATH	PERKIN-ELMER	PART NO. 472-5089	REF. NO.
	REFERENCE			

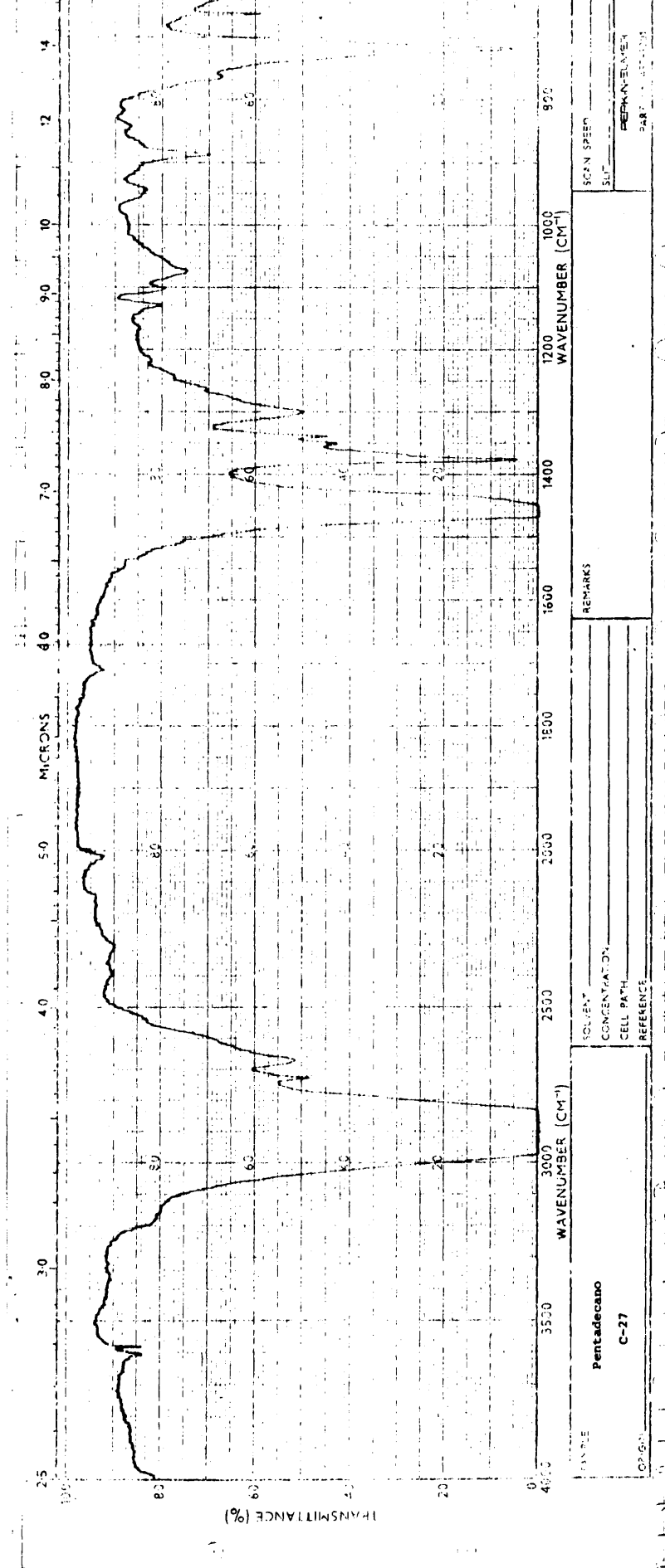
Gráfica 37. Estirpe G-27. Cultivo sobre parafinas lineales.
 (Control:Gráfica 10).

Fig 37 (2)



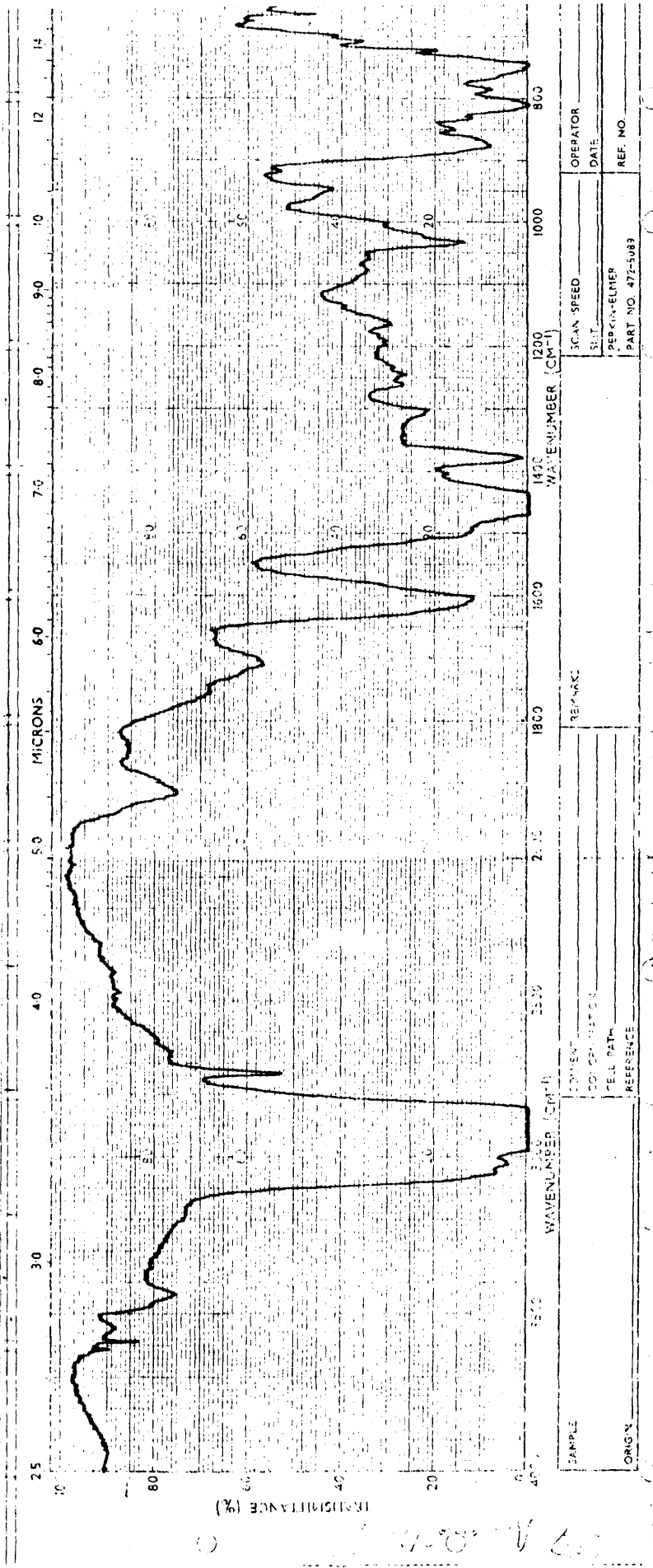
SAMPLE	SOLVENT	CONCENTRATION	CELL PATH	REFERENCE	REMARKS	SCAN SPEED	OPERATOR
						SPLIT	DATE
ORIGIN						PERKIN-ELMER	REF. NO.
						PART NO. 472-5089	

Gráfica 38. Estirpe G-27. Cultivo sobre parafinas ramificadas.
 (Control:Gráfica 9).

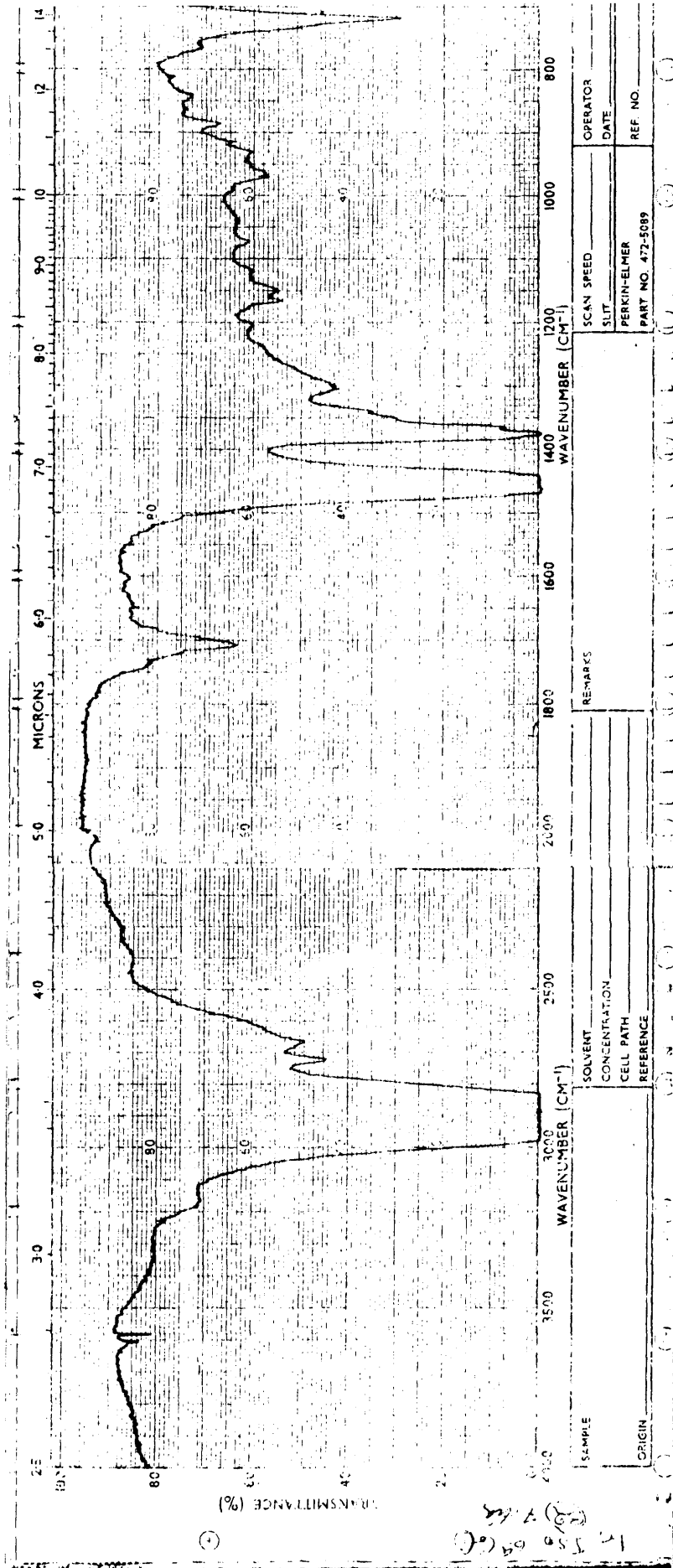


Gráfica 39. Estirpe G-27. Cultivo sobre pentadecano.

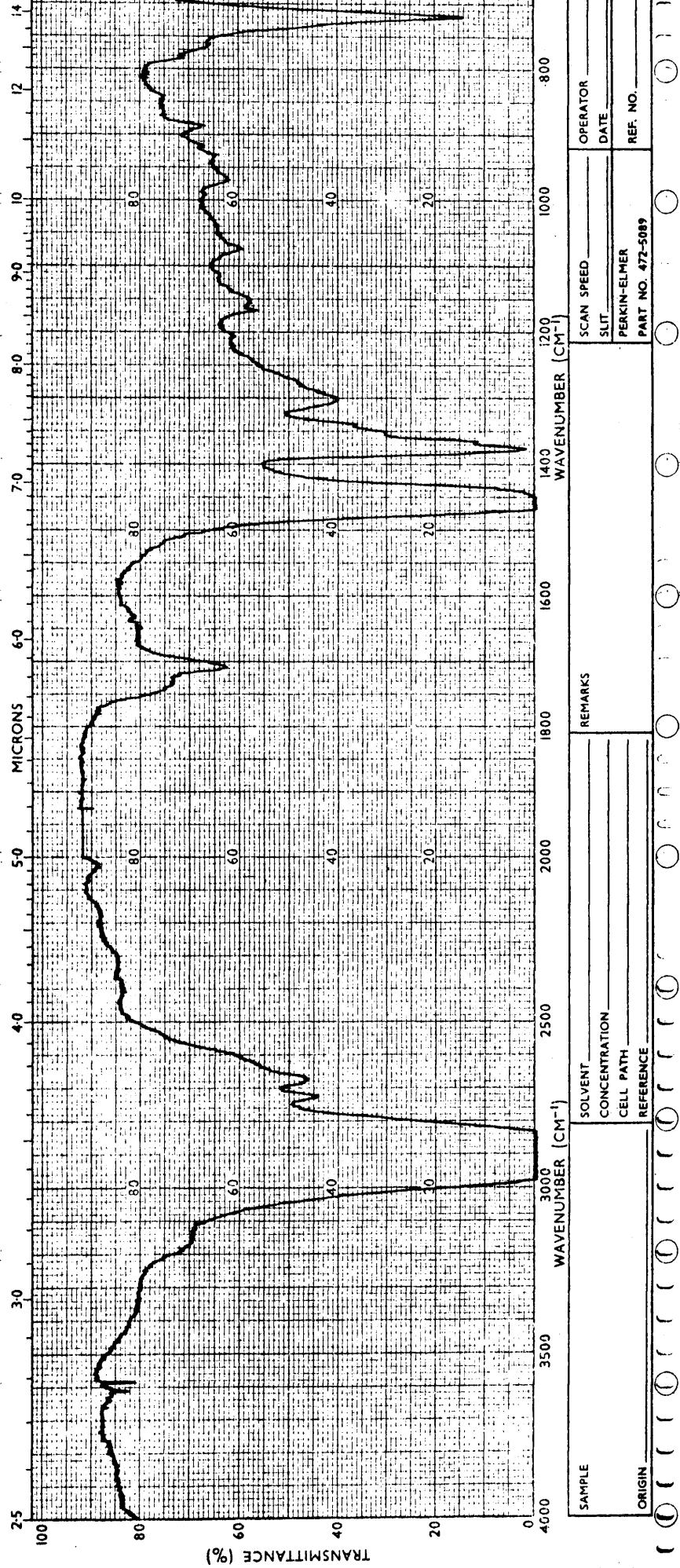
SAMPLE Pentadecano C-27	SOLVENT CONCENTRATION CELL PATH REFERENCE	REMARKS
ORIGINAL	PERKIN-ELMER PAR. 521-1000	SCAN SPEED 50"



Gráfica 40. Estirpe G-27. Cultivo sobre aromáticos.

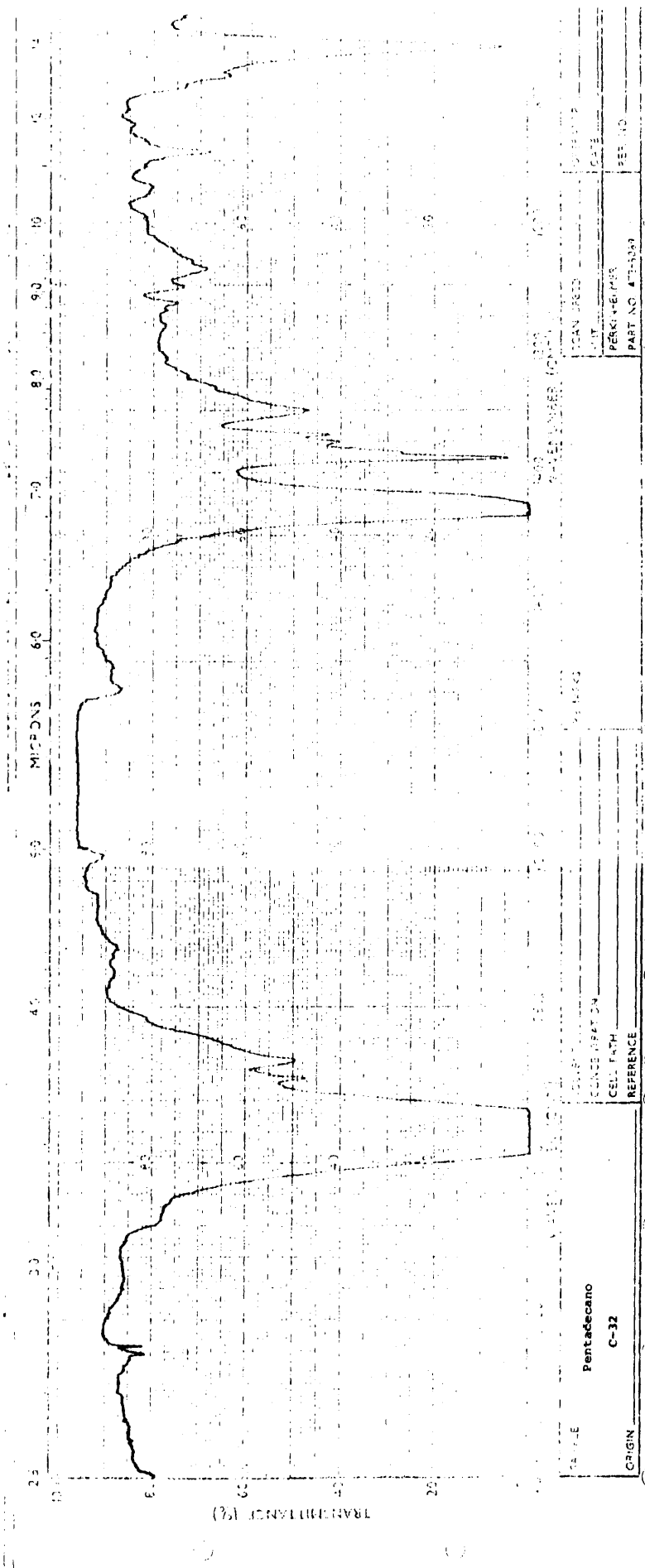


Gráfica 41. Estirpe G-32. Cultivo sobre parafinas totales.

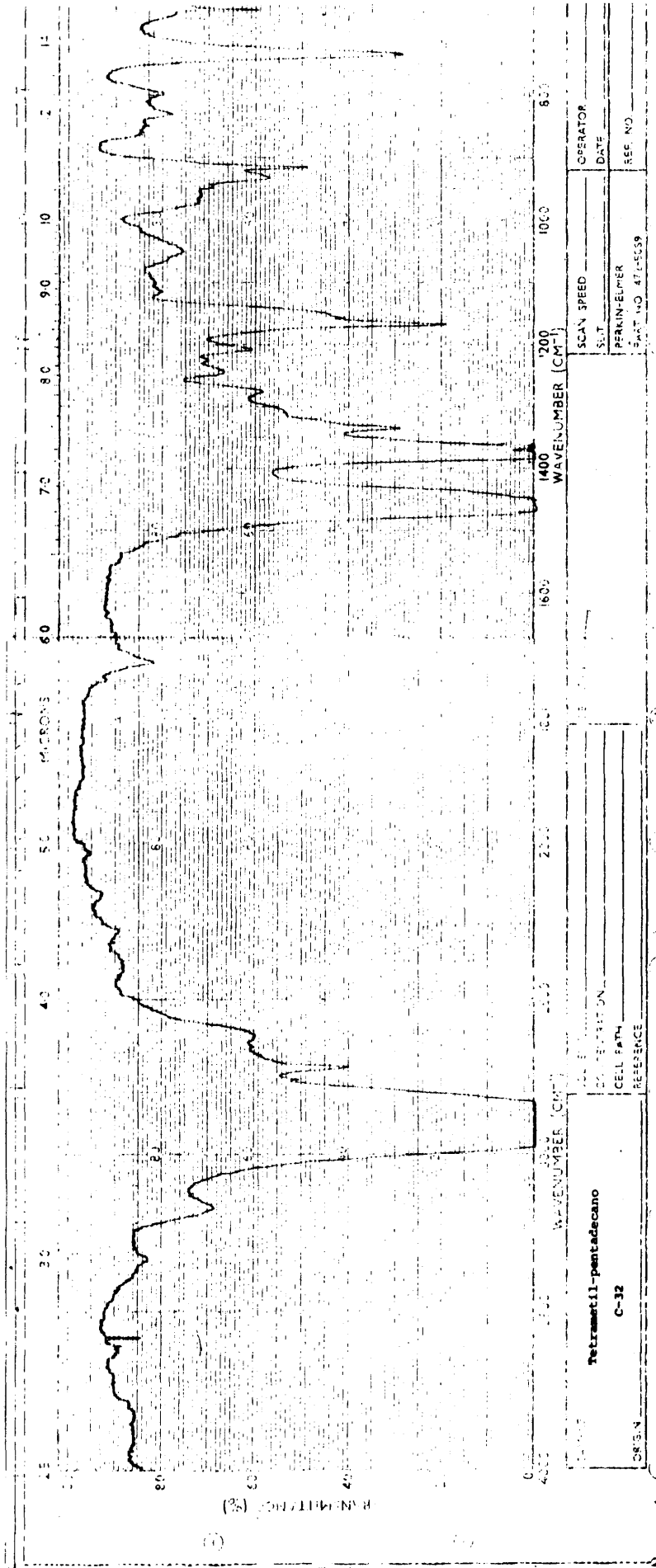


SAMPLE	SOLVENT	CONCENTRATION	CELL PATH	REFERENCE	REMARKS	SCAN SPEED	OPERATOR
						SLIT	DATE
ORIGIN						PERKIN-ELMER	REF. NO.
						PART NO. 472-5089	

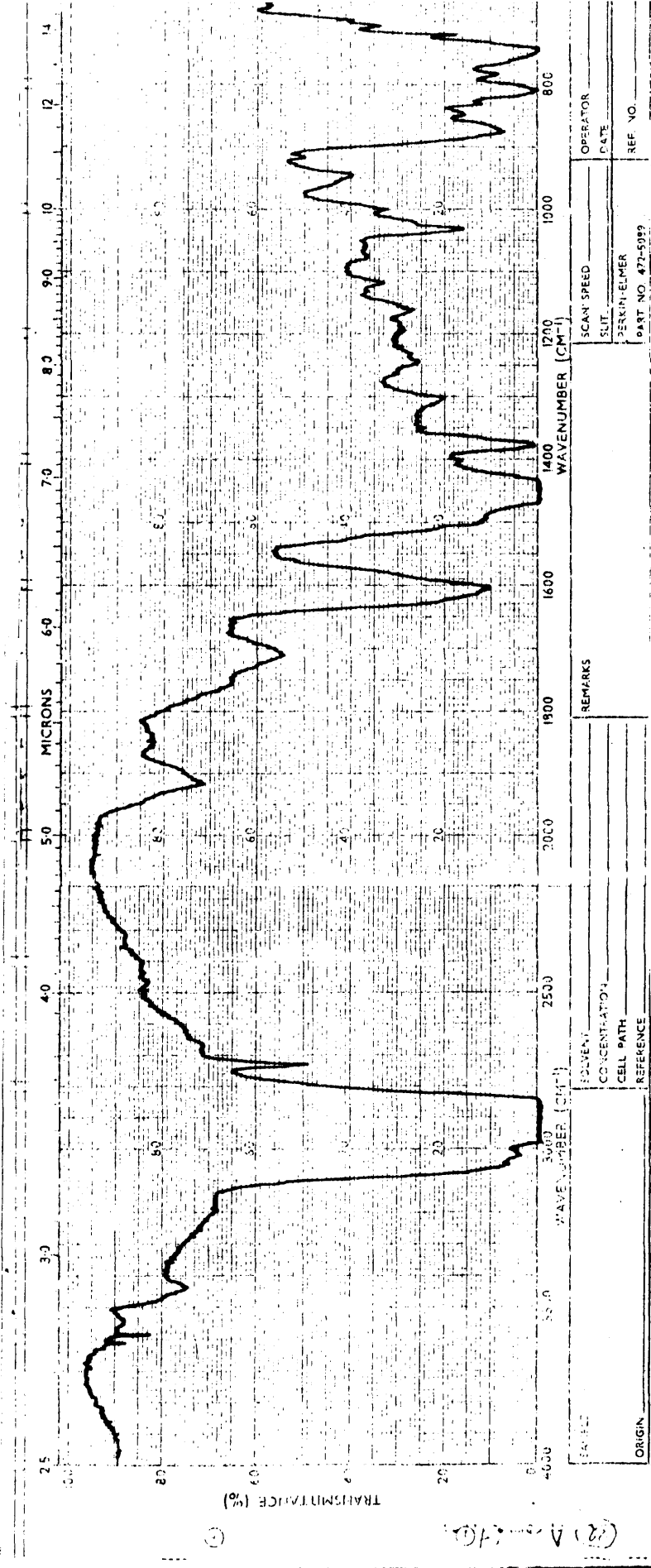
Gráfica 42. Estirpe G-32. Cultivo sobre parafinas lineales.
 (Control:Gráfica 10).



Gráfica 44. Estirpe G-32. Cultivo sobre pentaécano.



Gráfica 45. Estirpe G-32. Cultivo sobre tetrametilpentadecano.



Gráfica 46. Estirpe G-32. Cultivo sobre aromáticos.

Región 800-625: Solo se observa la disminución de intensidad - de la banda a 720 cm^{-1} , muy apreciable en la - gráfica 41.

Revisión de los espectros

La estirpe P-8 utiliza muy mal los hidrocarburos, seleccionando las parafinas de cadena lineal. El crecimiento es relativamente abundante en aromáticos.

La estirpe G-27 no muestra una selectividad marcada -- por las n-parafinas y oxida bien las ramificadas aunque el crecimiento sobre ellas sea escaso.

Finalmente la estirpe G-32 selecciona muy marcadamente las parafinas lineales, lo que se manifiesta no solo por la -- disminución de la banda a 720 cm^{-1} sino además por el aumento de absorción de las de 1375 y 3365 cm^{-1} , de las que la segunda indica la presencia de grupos isopropilo en las ramificaciones.

4.6.2.3. - Resultado de los cultivos de las especies del género Nocardia.

Los valores de crecimiento y pH final de estos cultivos se dan en la tabla LXII.

Se incluyen en este grupo las estirpes G-28, G-41, P-42, G-43 y P-44. Los espectros correspondientes están representados en las gráficas 47 a 74.

Las bandas diferenciales de estos espectros respecto de los controles se recogen en la tabla LXIII.

Asignación de bandas y discusión.

Región 3600-3100: Las bandas por encima de 3600 cm^{-1} , que son debidos a vibraciones de tensión de O-H en estado libre, aparecen a números de onda altos (3640) lo que indica con mucha posibilidad que son alcoholes primarios.

Por debajo de 3500 cm^{-1} las bandas corresponden a OH asociados y se encuentran en la posición ya discutida anteriormente.

Estas bandas son más intensas en los cultivos sobre parafinas lineales ó totales, y también en relación con los cultivos de otras estirpes.

Región 3500-2300: Tampoco en estos espectros se ha señalado ninguna banda en esta región, por las razones ya indicadas.

Teniendo en cuenta que las bandas de C=O son muy intensas, y no van acompañadas de absorción clara en esta zona, casi cabría inclinarse por admitir como cetónicos los carbonilos, al menos en ciertos espectros en que no se nota ninguna banda que haga sospechar la presencia de ácidos carboxílicos.

Región 1800-1600: Como siempre hay que distinguir las bandas por encima de 1700 cm^{-1} de vibraciones de tensión de enlaces C=O y las situadas entre 1600 y 1700 cm^{-1} que suponemos debidas a vibraciones de tensión de enlaces C=C.

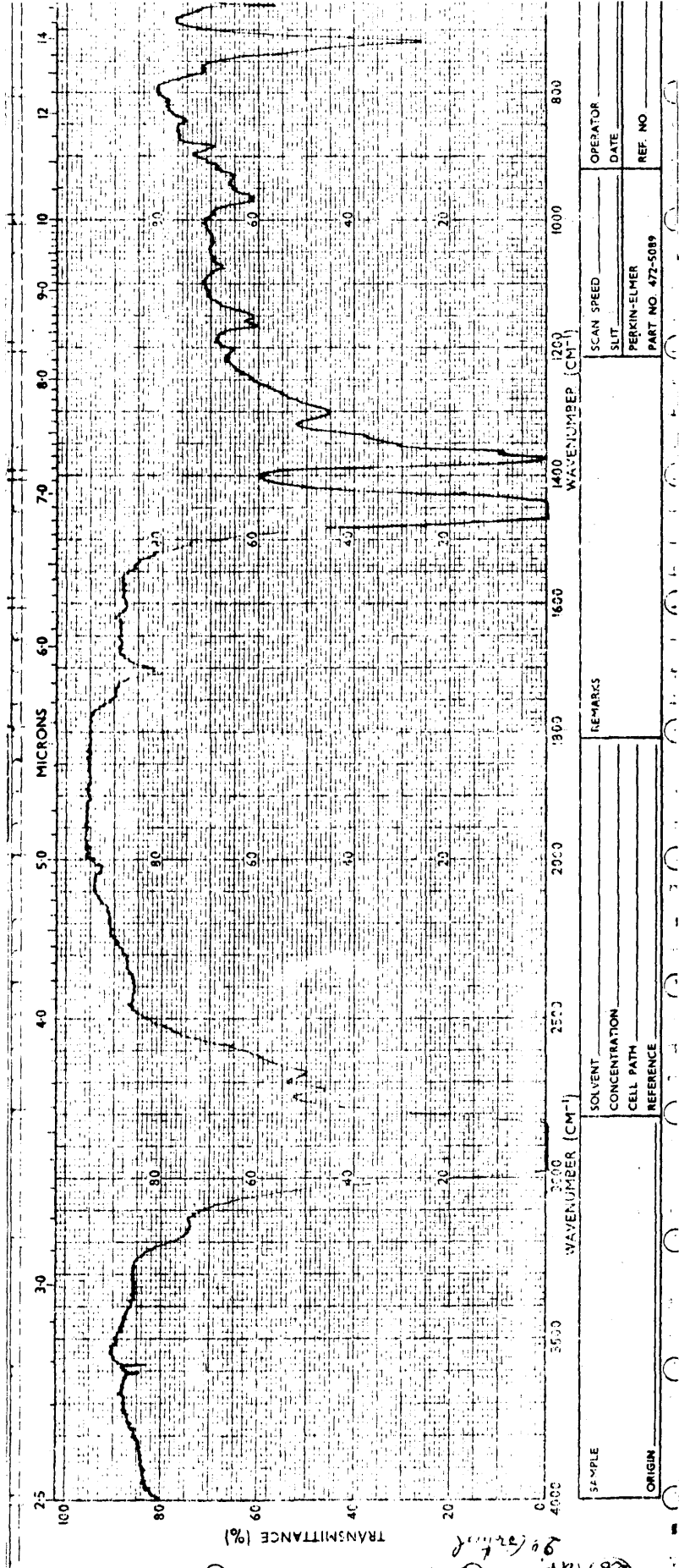
Entre 1800 y 1700 cm^{-1} aparecen dos bandas muy poco separadas en los espectros de parafinas, siendo el espectro de esta región inconfundible en los cultivos de estirpes de este género.

Tabla LXII: Valores de crecimiento y pH final de los cultivos de estirpes del género Nocardia.

Estirpe	Parafinas totales		Parafinas lineales		Parafinas ramificadas		Pentadecano		Tetrametil-pentadecano		Aromáticos	
	Crecimiento	pH. final	Crecimiento	pH. final	Crecimiento	pH. final	Crecimiento	pH. final	Crecimiento	pH. final	Crecimiento	pH. final
G-28	0,030	5,5	0,070	7	0,020	5,5	0,075	5,5	0,055	5,5	-	-
G-41	0,010	6	0,010	7	0,010	7	0,010	6,5	-	-	0,050	7
P-42	0,070	6	0,030	5,5	0,180	6	0,030	5,5	0,160	5,5	0,020	6
G-43	0,065	6	0,210	6	0,230	6	0,120	5,5	0,075	5,5	0,020	6,5
P-44	0,020	5,5	0,010	7	0,020	7	0,025	5,5	0,035	5,5	0,010	6,5

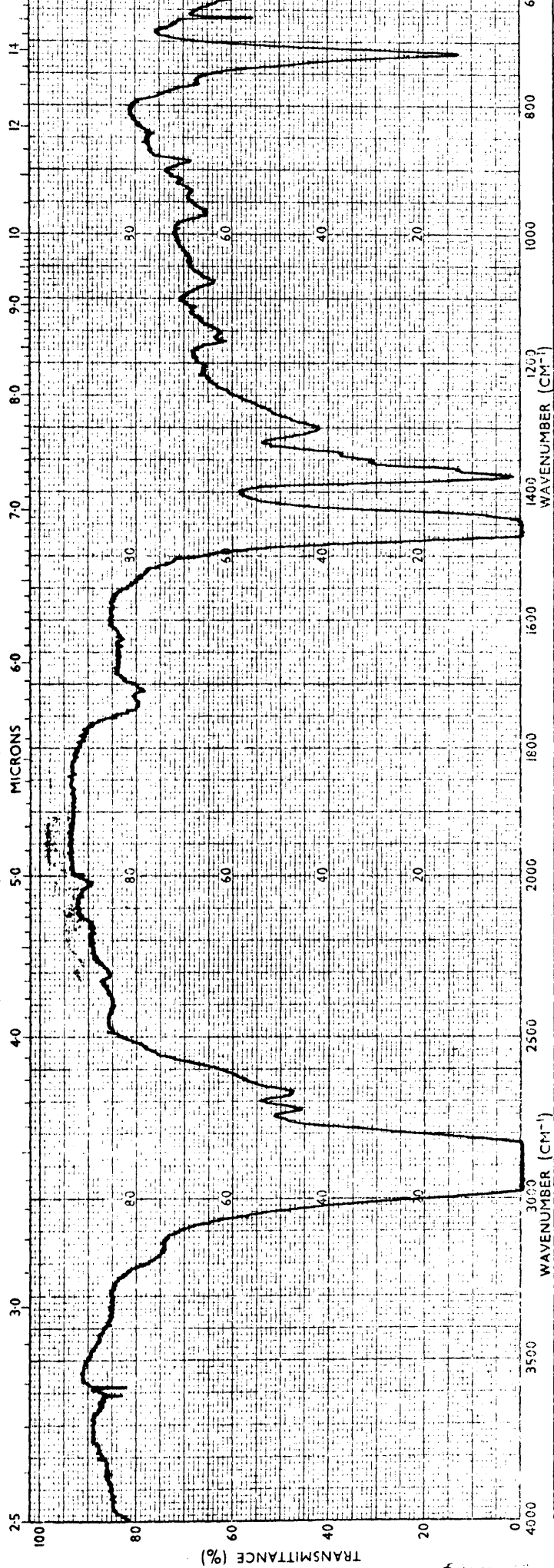
Tabla LXIII: Género Nocardia. Bandas diferenciales entre los - espectros de cultivos y sus respectivos controles.

Estirpe	Parafinas totales	Parafinas lineales	Parafinas ramificadas	Pentadecano	Tetrametilpentadecano	Aromáticos
G-28	3500-3100 (d) 1710 (m) 1605 (d) 720 (disminuye)	3500-3100 (d) 1730 (m) 1710 (m) 1620 (d) 1300-800 (aumenta)	1710 (f) 1300-800 (aumenta) 720 (aumenta)	3500-3100 (m) 3370 (d) 1710 (d) 720 (disminuye)	3500-3100 (m) 3330 (d) 1710 (f) 1300-800 (aumenta)	No crece
G-41	1745 (d) 1710 (d)	3500-3100 (m) 1730 (m) 1710 (m) 1660 (d) 1630 (d) 1120* (d) 940 (d) 1300-800 (aumenta)	3500-3100 (m) 1750 (f) 1710 (f) 1605 (d) 1300-800 (aumenta)	1710 (d) 1300-800 (aumenta) 720 (disminuye)	No crece	3400-3100 (d) 1710 (m) 1300-900 (aumenta)
P-42	3600-3100 (f) 3400 (f) 3170 (d) 1710 (f) 1630 (f) 1170 (aumenta) 1150 (aumenta) 1300-800 (aumenta) 720 (disminuye)	3600-3100 (f) 1780 (d) 1740-1730 (f) 1710 (f) 1630 (f) 1380 (aumenta) 1150 (aumenta) 1140 (d) 1300-800 (aumenta) 785 (d) 720 (disminuye)	3500-3100 (m) 1710 (f) 1120* (m) 940 (d) 720 (disminuye)	3500-3100 (m) 1750 (f) 1710 (f) 1630 (m) 1150- 60 (d) 980 (d) 1300- 800(aumenta) 720 (disminuye)	3640 (m) 3500-3100 (f) 1710 (f) 1630 (d) 1300- 800 (aumenta) 1170 (disminuye) 1030 (f) 980 (d) 730 (disminuye)	1710 (m) 1120* (m)
G-43	3400-3100 (m) 1735 (f) 1710 (m) 1300-900 (aumenta) 1170 (aumenta) 1150 (aumenta) 1035 (d) 720 (disminuye)	3640 (d) 3500-3100 (m) 1740 (f) 1710 (f) 1630 (d) 1375 (aumenta) 1170 (aumenta) 1150 (aumenta) 1035 (d) 1300-900 (aumenta) 720 (disminuye)	3500-3100 (m) 1750 (m) 1735 (f) 1710 (f) 1650 (d) 1605 (d) 1365 (aumenta) 1250 (d) 1035 (d) 940 (m) 860 (d) 725 (f) 690 (f)	3500-3100 (m) 1745 (f) 1712 (f) 1300-800 (aumenta) 1165 (d) 1380 (disminuye) 720 (disminuye)	3640 (m) 3340 (d) 3500-3100 (m) 1735 (f) 1710 (f) 1170 (disminuye) 1030 (f) 1300-800 (aumenta) 730 (disminuye)	3400-3100 (m) 1710 (m) 1300-900 (aumenta) 1230 (d)
P-44	3500-3100 (d) 1710 (m) 1300-800 (aumenta) 720 (disminuye)	3500-3100 (m) 1735 (m) 1710 (f) 970 (d)	3640 (d) 3500-3100 (d) 1750 (f) 1710 (f) 1300-800 (aumenta) 725 (f) 720 (aumenta) 690 (f)	3500-3100 (d) 1740 (d) 1710 (d) 1300-800 (aumenta) 720 (disminuye)	1740 (d) 1710 (d) 1300-800 (aumenta) 785 (hombro,d) 735 (disminuye)	3400-3100 (d) 1710 (m) 1260 (m) 1120* (m) 1075 (d) 1300-900 (aumenta)



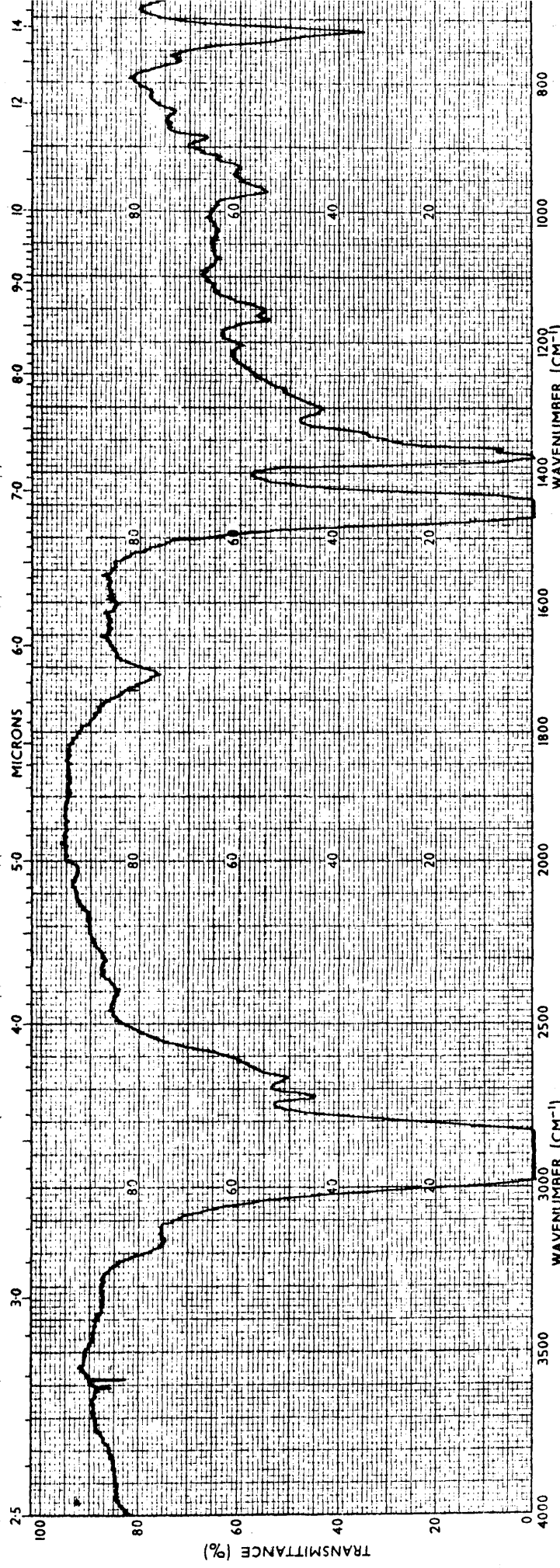
Gráfica 47. Estirpe G-28. Cultivo sobre parafinas totales.

SAMPLE		SOLVENT		SCAN SPEED		OPERATOR	
ORIGIN		CONCENTRATION		SLIT		DATE	
		CELL PATH		PERKIN-ELMER		REF. NO.	
		REFERENCE		PART NO. 472-5089			
		REMARKS		WAVENUMBER (CM⁻¹)			



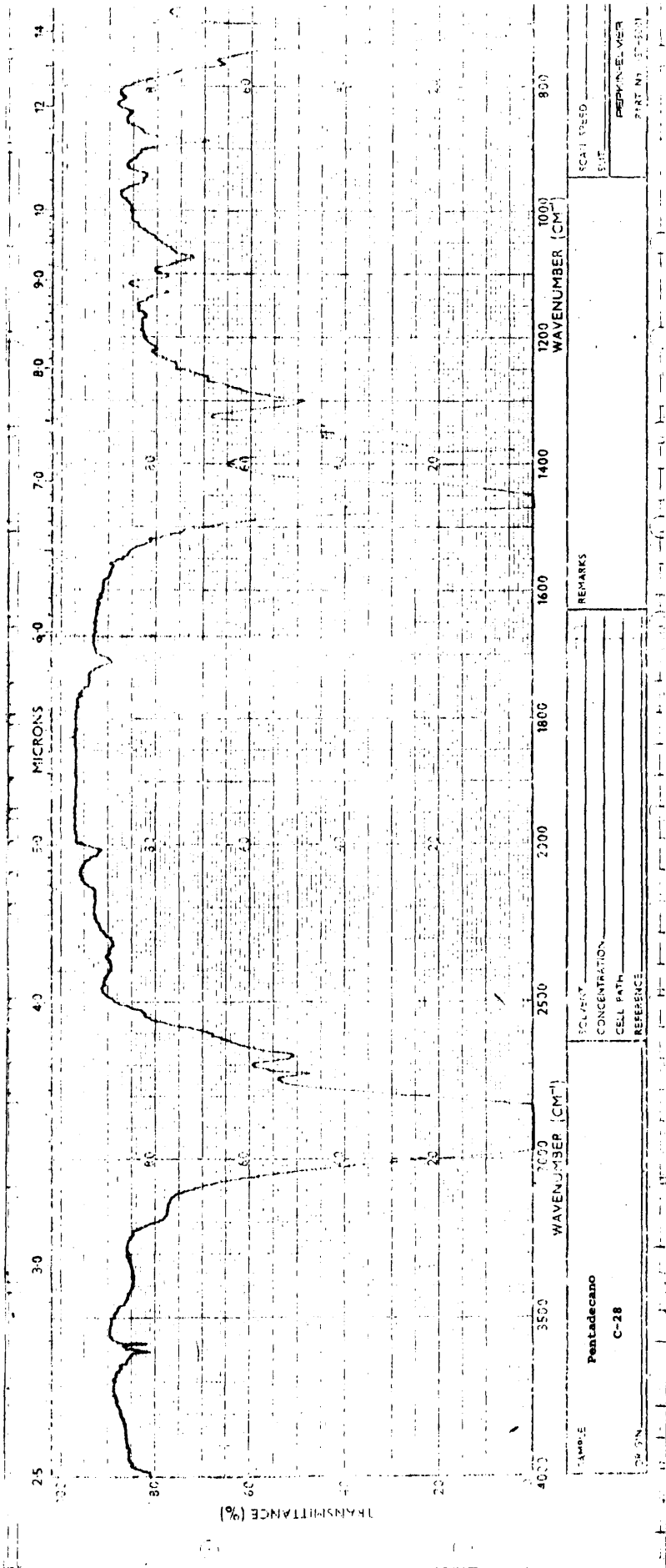
SAMPLE	SOLVENT	REMARKS	SCAN SPEED	OPERATOR
	CONCENTRATION		SLIT	DATE
ORIGIN	CELL PATH	PART NO. 472-5089	PERKIN-ELMER	REF. NO.
	REFERENCE			

Gráfica 48. Estirpe G-28. Cultivo sobre parafinas lineales.
(Control:Gráfica 10)

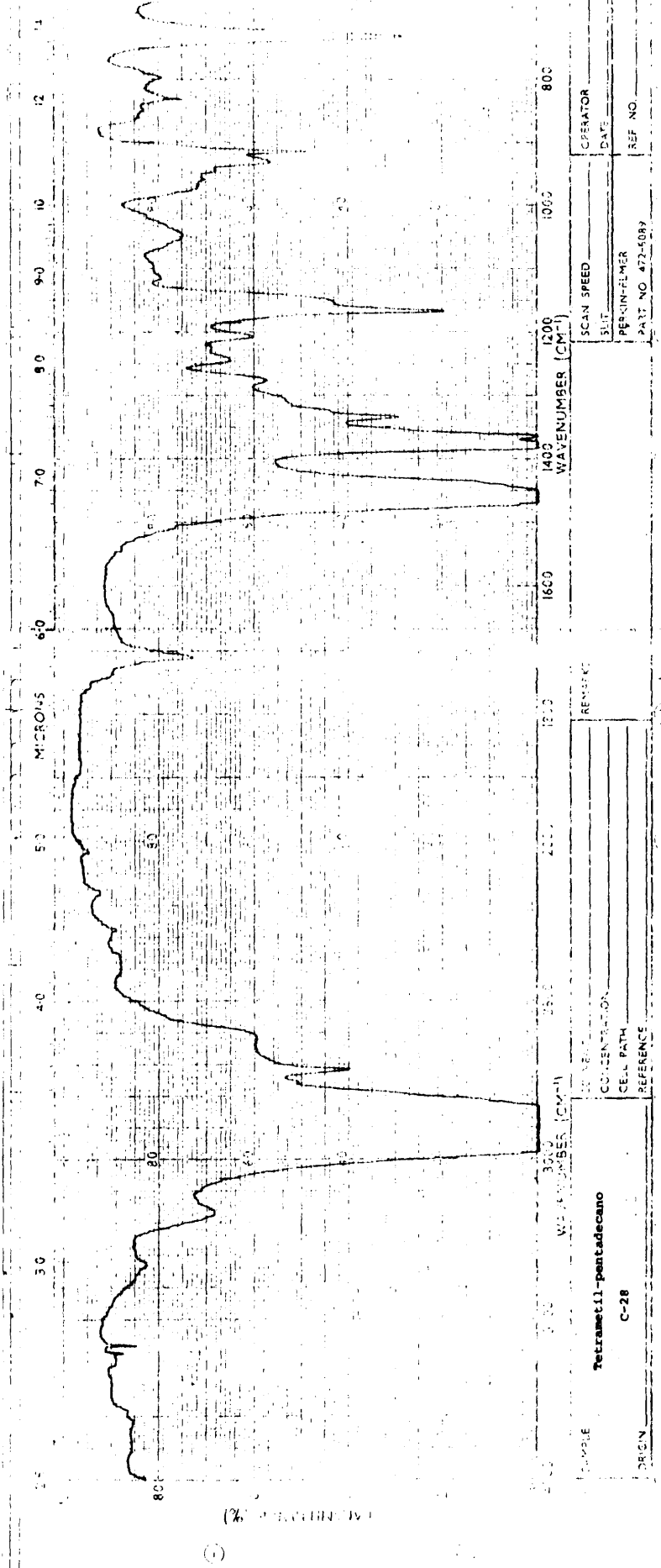


SAMPLE	SOLVENT	REMARKS	SCAN SPEED	OPERATOR
	CONCENTRATION		SLIT	DATE
ORIGIN	CELL PATH		PERKIN-ELMER	REF. NO.
	REFERENCE		PART NO. 472-5089	

Gráfica 49. Estirpe G-28. Cultivo sobre parafinas ramificadas.
(Control:Gráfica 9)



Gráfica 50. Estirpe G-28. Cultivo sobre pentadecano.

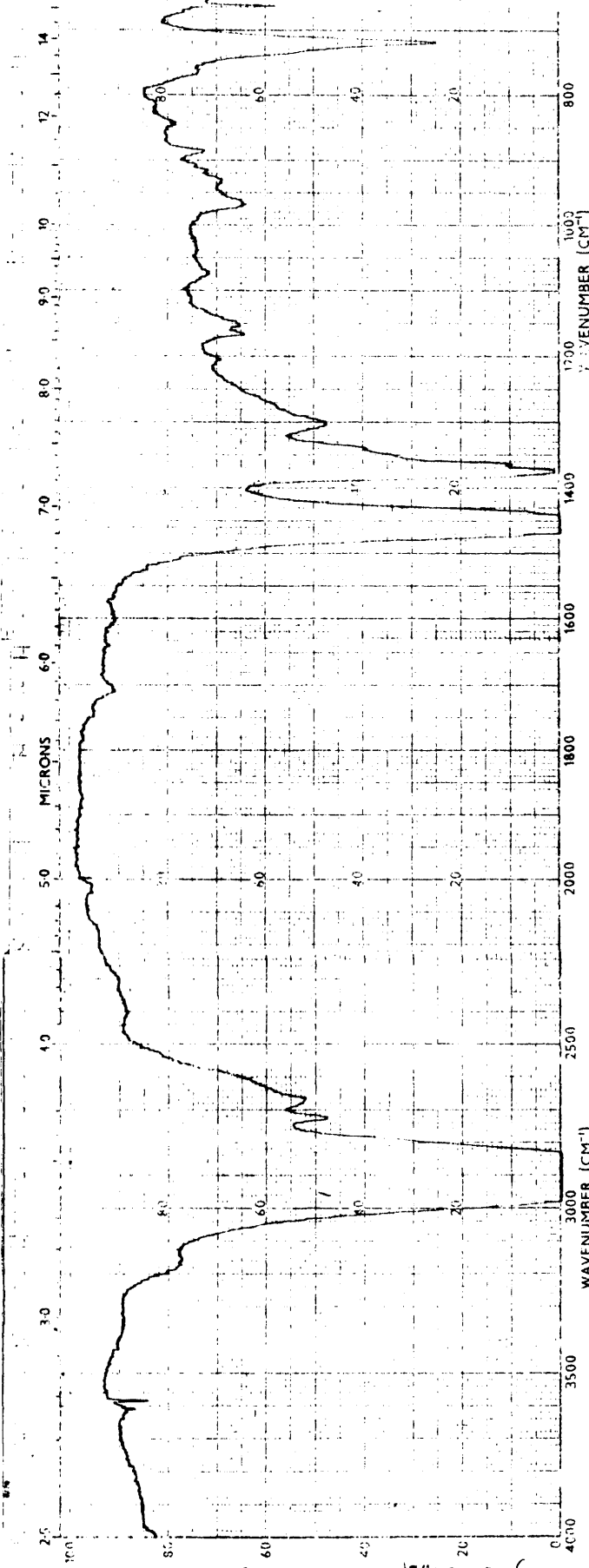


SAMPLE
 Tetrametil-pentadecano
 C-28

WAVENUMBER (CM⁻¹)
 3000 2900 1600 1400 800

MICRONS
 3.3 3.4 6.2 7.1 12.5

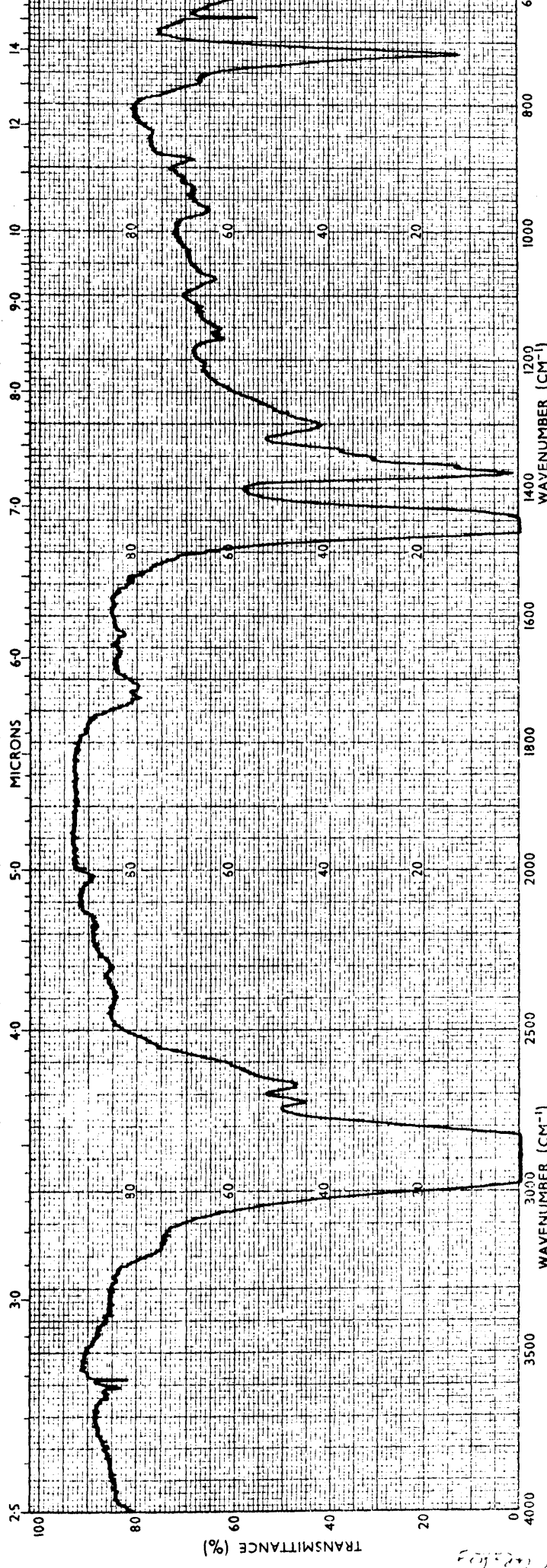
Gráfica 51. Estirpe G-28. Cultivo sobre tetrametilpentadecano.



SAMPLE	SOLVENT	REMARKS	SCAN SPEED
	CONCENTRATION		SPLIT
ORIGIN	CELL PATH	PERKIN-ELMER	PART No. 457-5001
	REFERENCE		

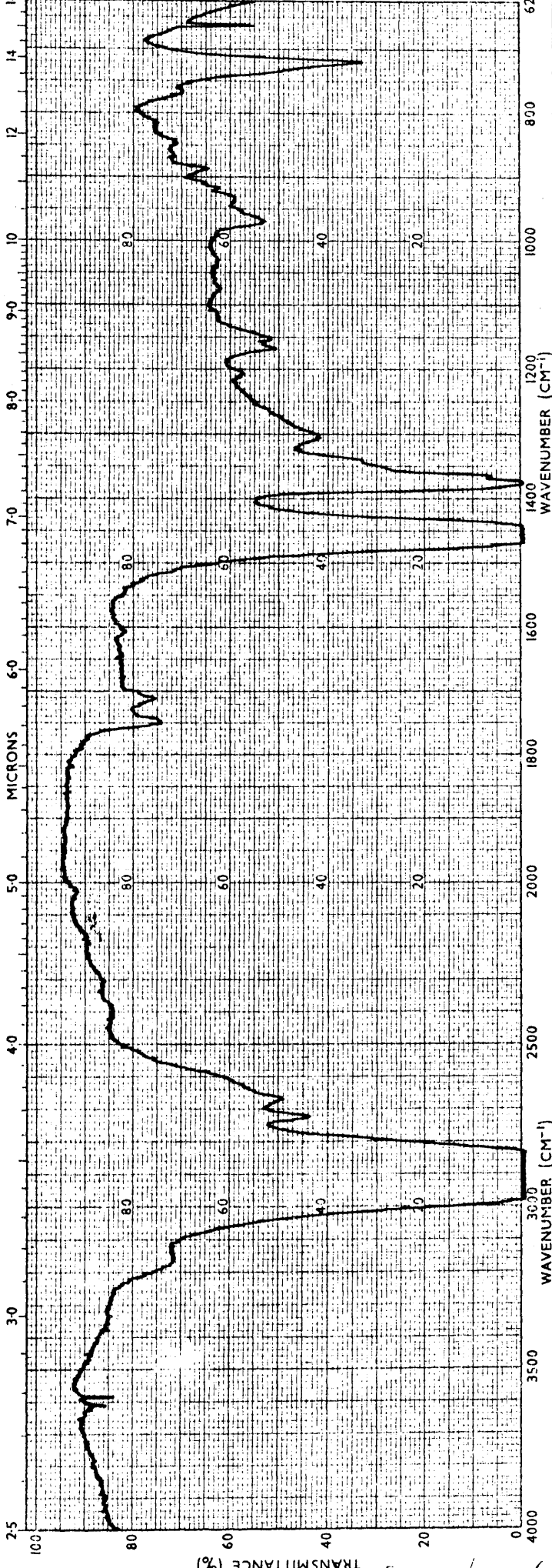
Gráfica 52. Estirpe G-41. Cultivo sobre parafinas totales.

4



SAMPLE	SOLVENT	REMARKS	OPERATOR
ORIGIN	CONCENTRATION		DATE
	CELL PATH		REF. NO.
	REFERENCE		
	SCAN SPEED		
	SPLIT		
	PERKIN-ELMER		
	PART NO. 472-5089		

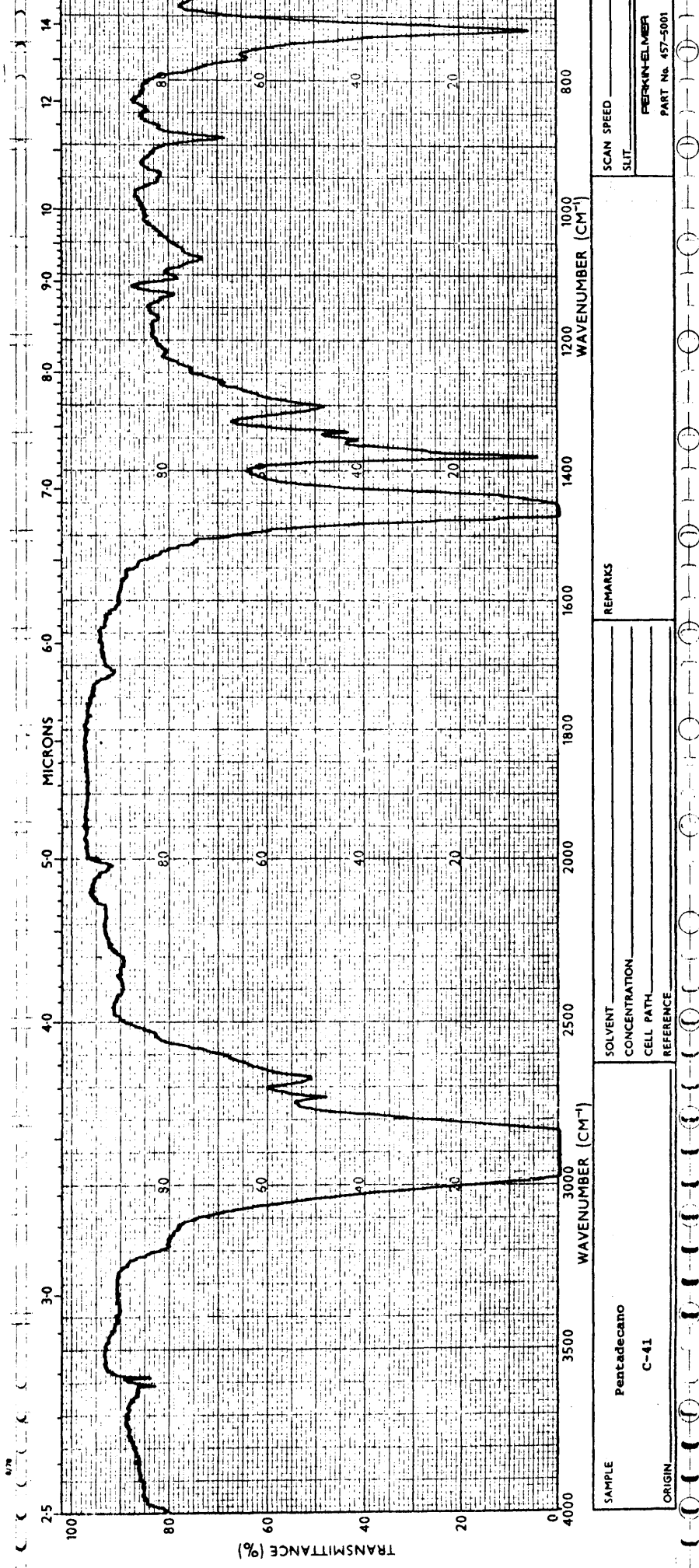
Gráfica 53. Estirpe G-41. Cultivo sobre parafinas lineales.
(Control:Gráfica 10).



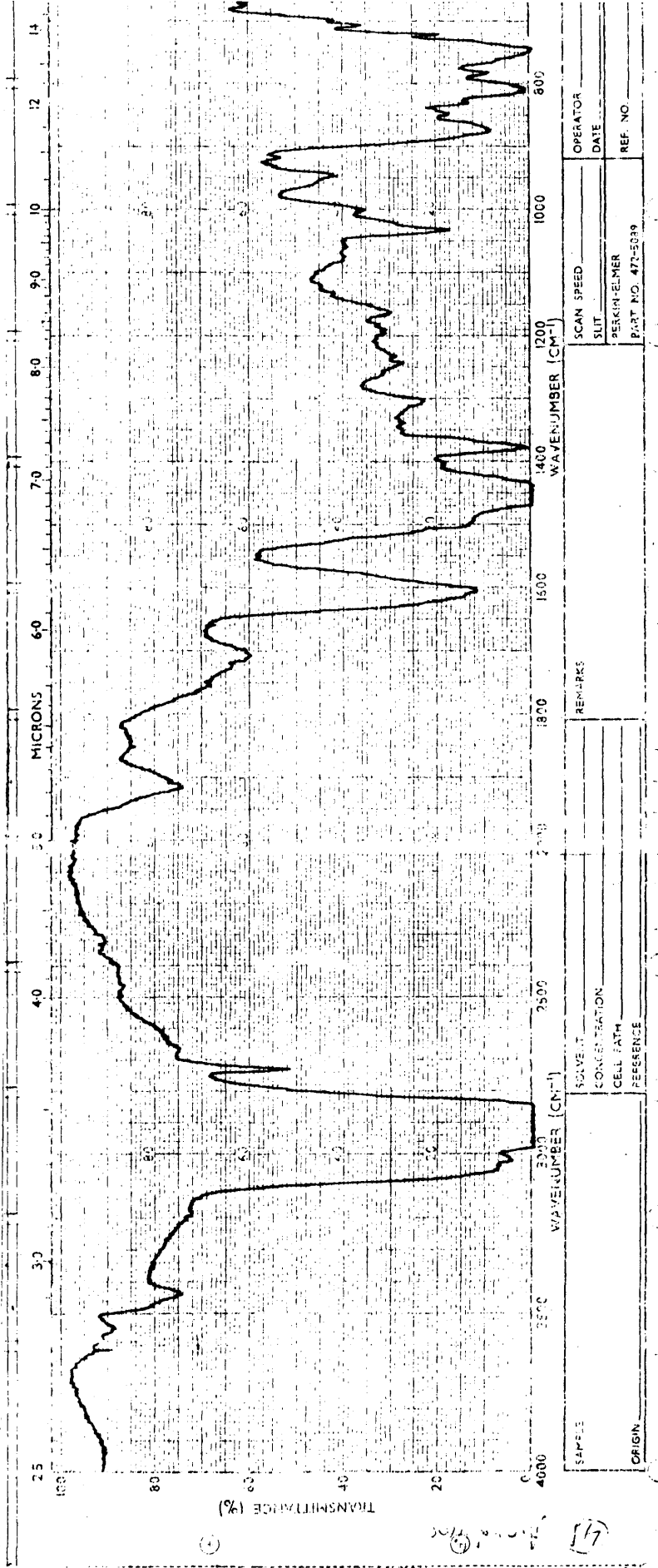
(11) *Amey*

SAMPLE	SOLVENT	REMARKS	OPERATOR
ORIGIN	CONCENTRATION		DATE
	CELL PATH		REF. NO.
	REFERENCE		
		SCAN SPEED	
		SLIT	
		PERKIN-ELMER	
		PART NO. 472-5089	

Gráfica 54. Estirpe G-41. Cultivo sobre parafinas ramificadas.
(Control:Gráfica 9)

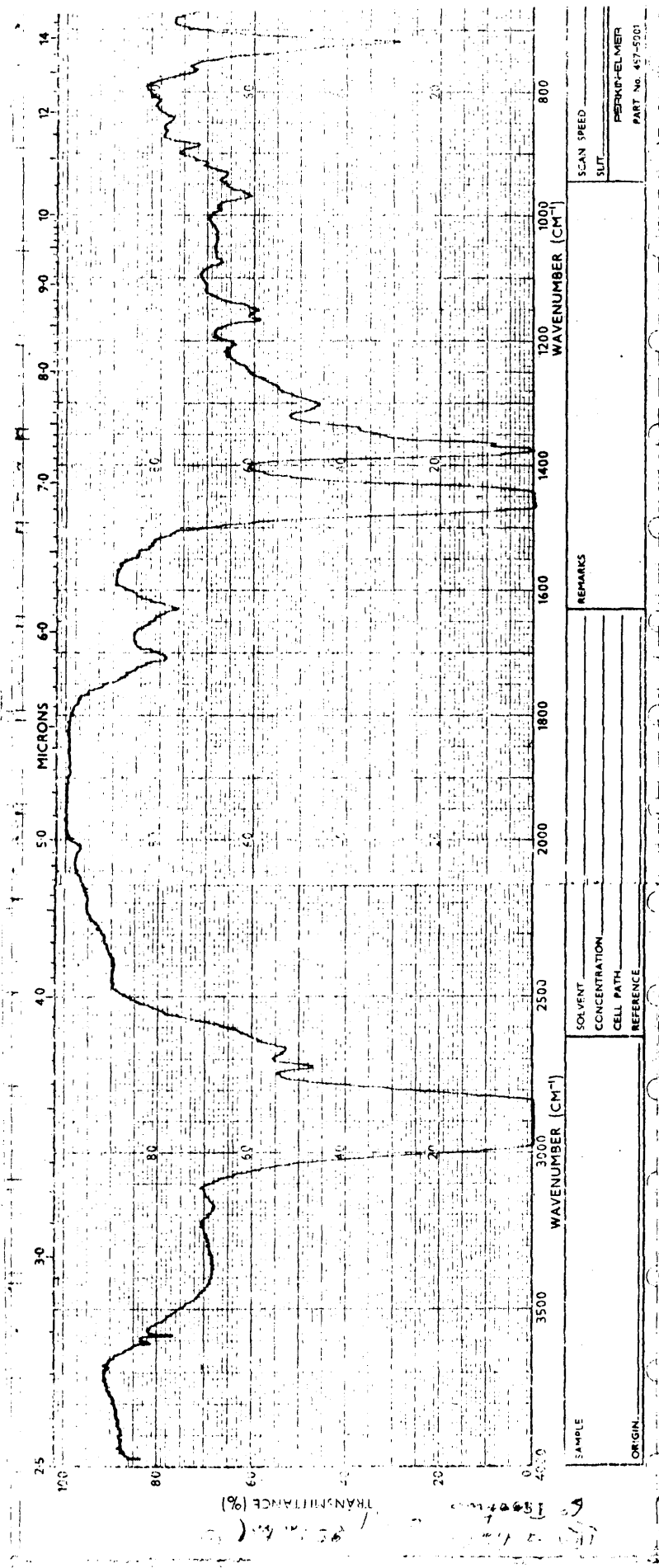


Gráfica 55. Estirpe G-41. Cultivo sobre pentadecano.

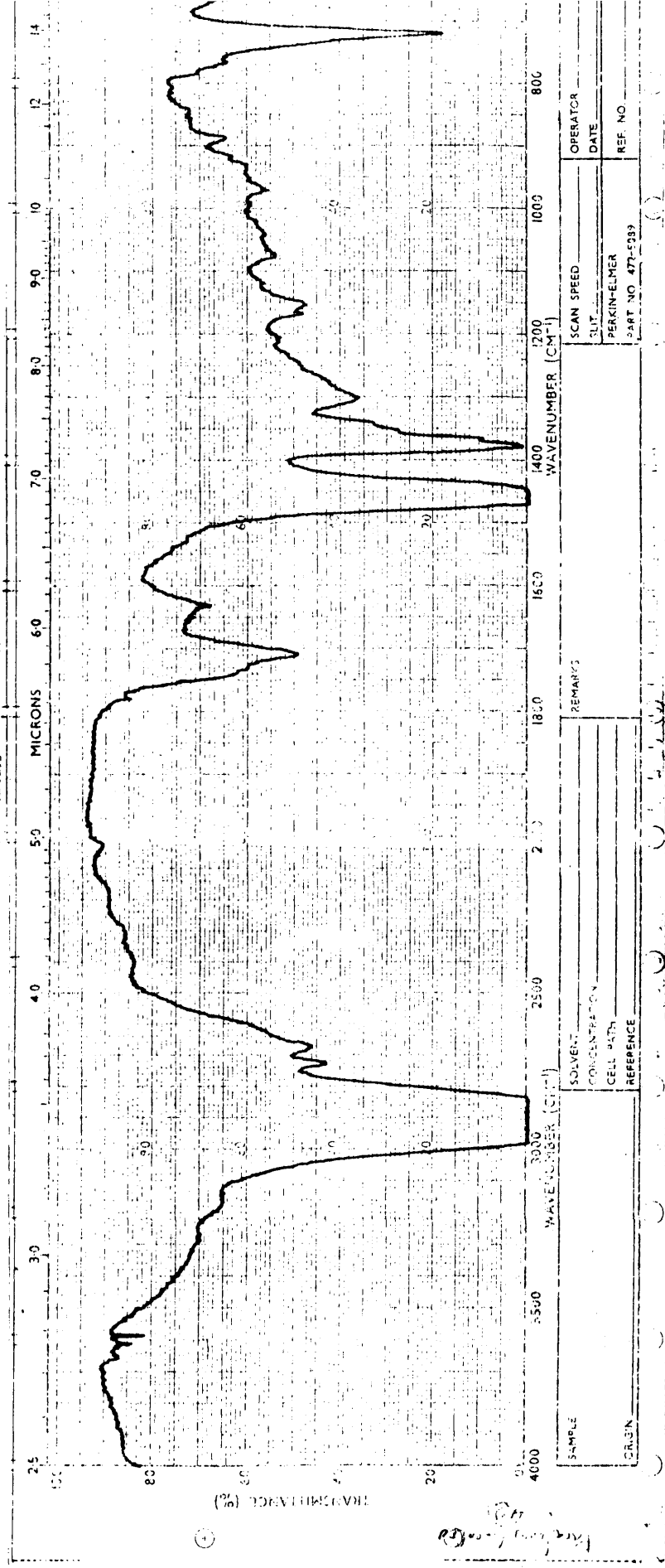


SAMPLE		REMARKS		OPERATOR	
ORIGIN		REMARKS		DATE	
SOLVENT		SCAN SPEED		SLIT	
CONCENTRATION		PERKIN-ELMER		PART NO. 472-5839	
CELL PATH		REF. NO.			
REFERENCE					

Gráfica 56. Estirpe G-41. Cultivo sobre aromáticos.



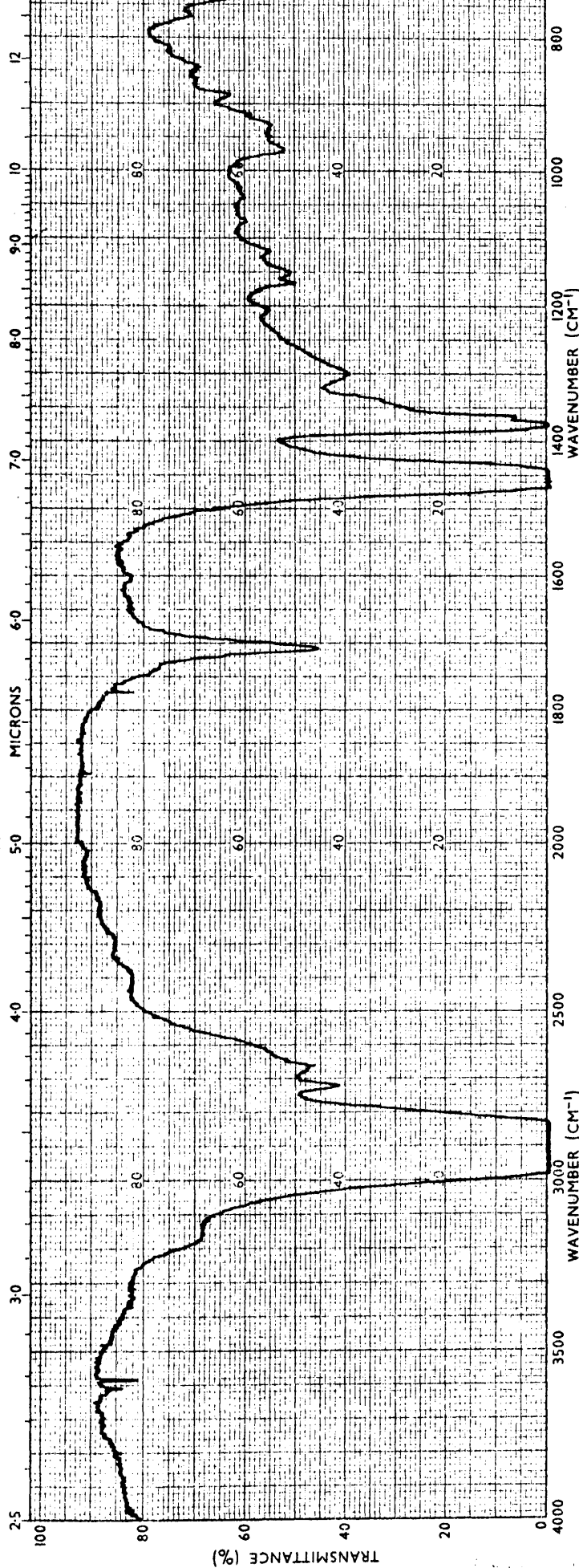
Gráfica 57. Estirpe P-42. Cultivo sobre parafinas totales.



SAMPLE	SOLVENT	REMARKS
GRJEN	CONCENTRATION	
	CELL PATH	
	REFERENCE	

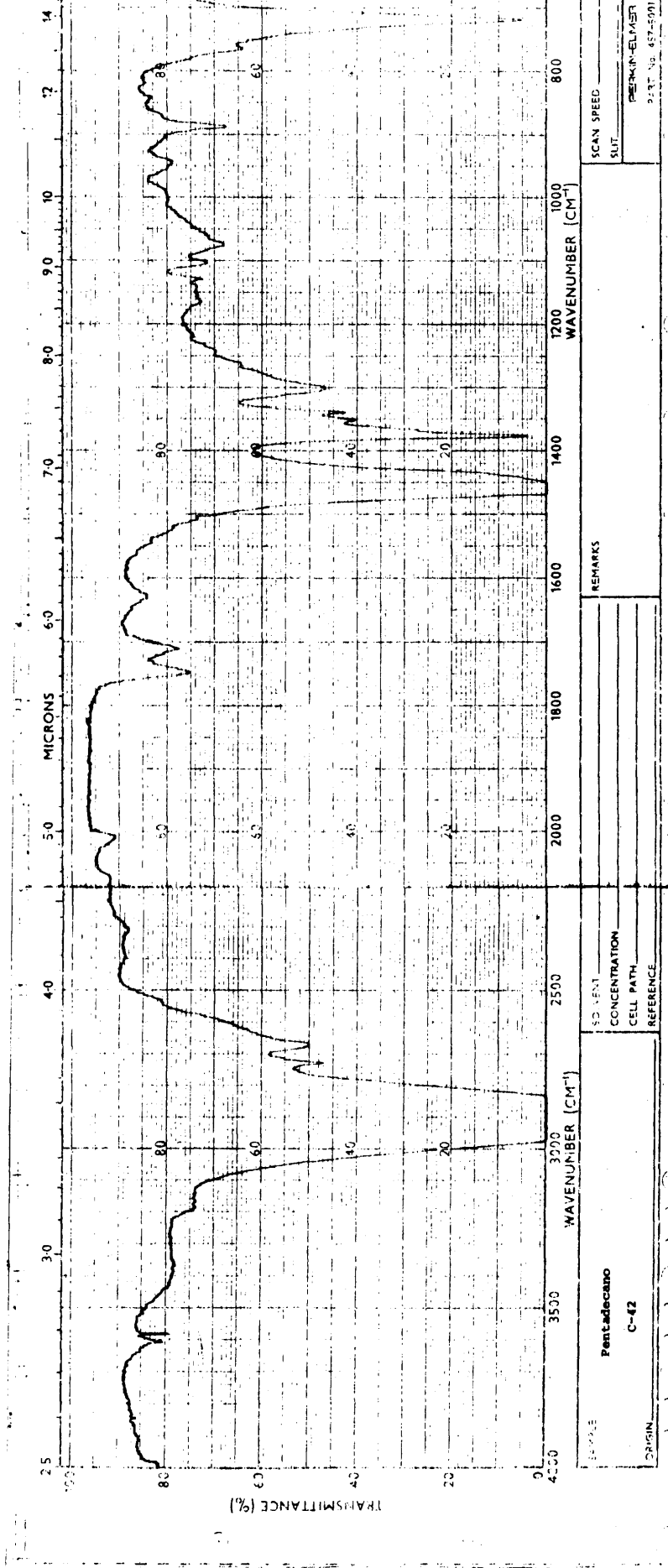
SCAN SPEED	OPERATOR
SPLIT	DATE
PERKIN-ELMER	REF. NO.
PART NO 471-539	

Gráfica 58. Estirpe P-42. Cultivo sobre parafinas lineales.
(Control:Gráfica 10)



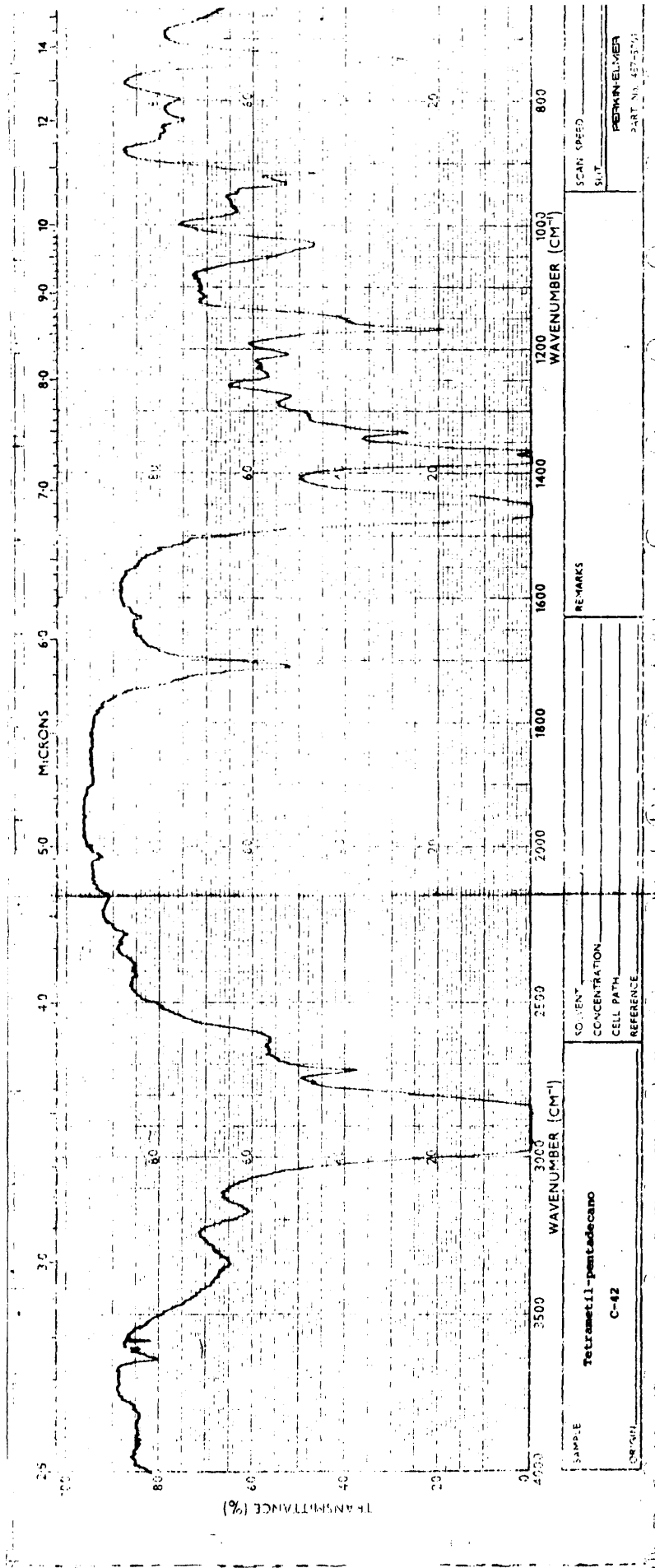
SAMPLE		SOLVENT		REMARKS	
ORIGIN		CONCENTRATION		SCAN SPEED	
		CELL PATH		SLIT	
		REFERENCE		PERKIN-ELMER	
				PART NO. 472-5089	
				OPERATOR	
				DATE	
				REF. NO.	

Gráfica 59. Estirpe P-42. Cultivo sobre parafinas ramificadas.
(Control:Gráfica 9)

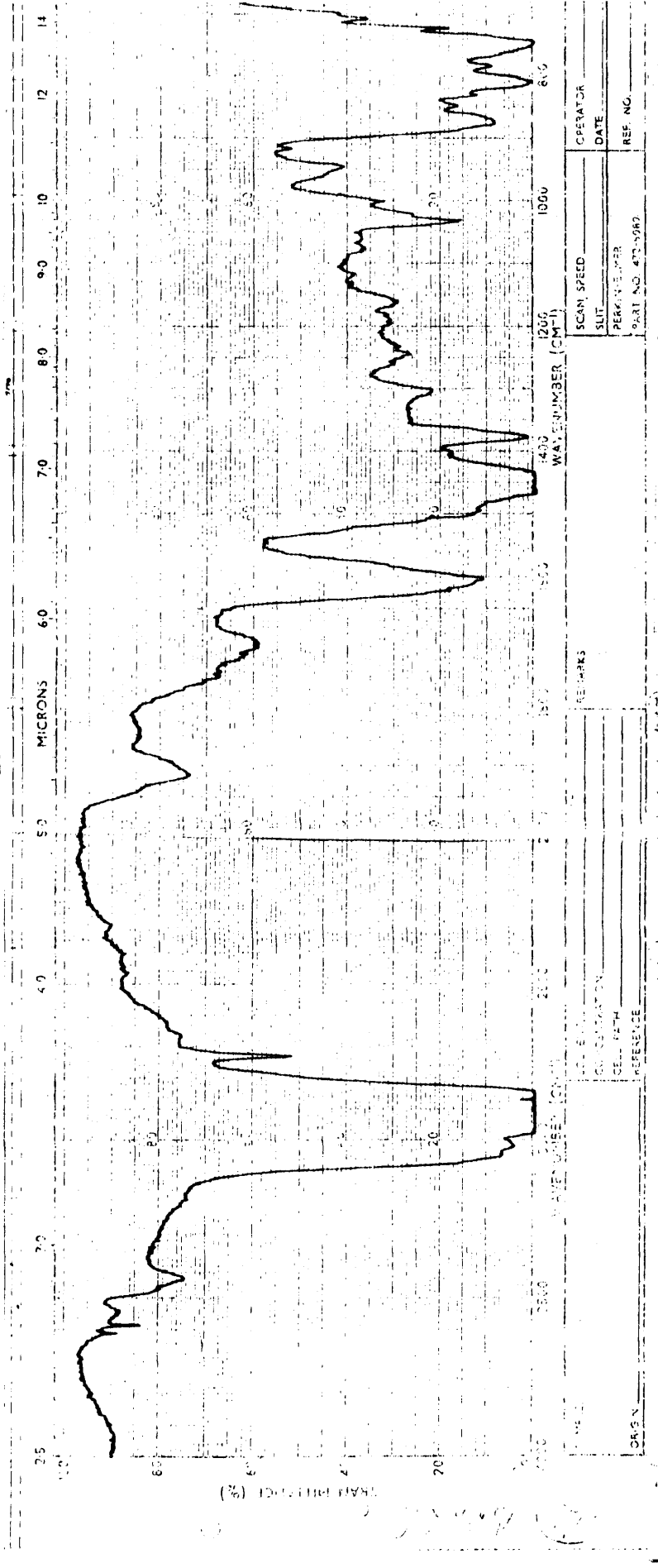


SAMPLE	Pentadecano			REMARKS	
	C-42				
SOVENT				SCAN SPEED	
CONCENTRATION					SUIT
CELL PATH					
REFERENCE				PERKIN-ELMER	
ORIGIN				PART No. 457-5001	

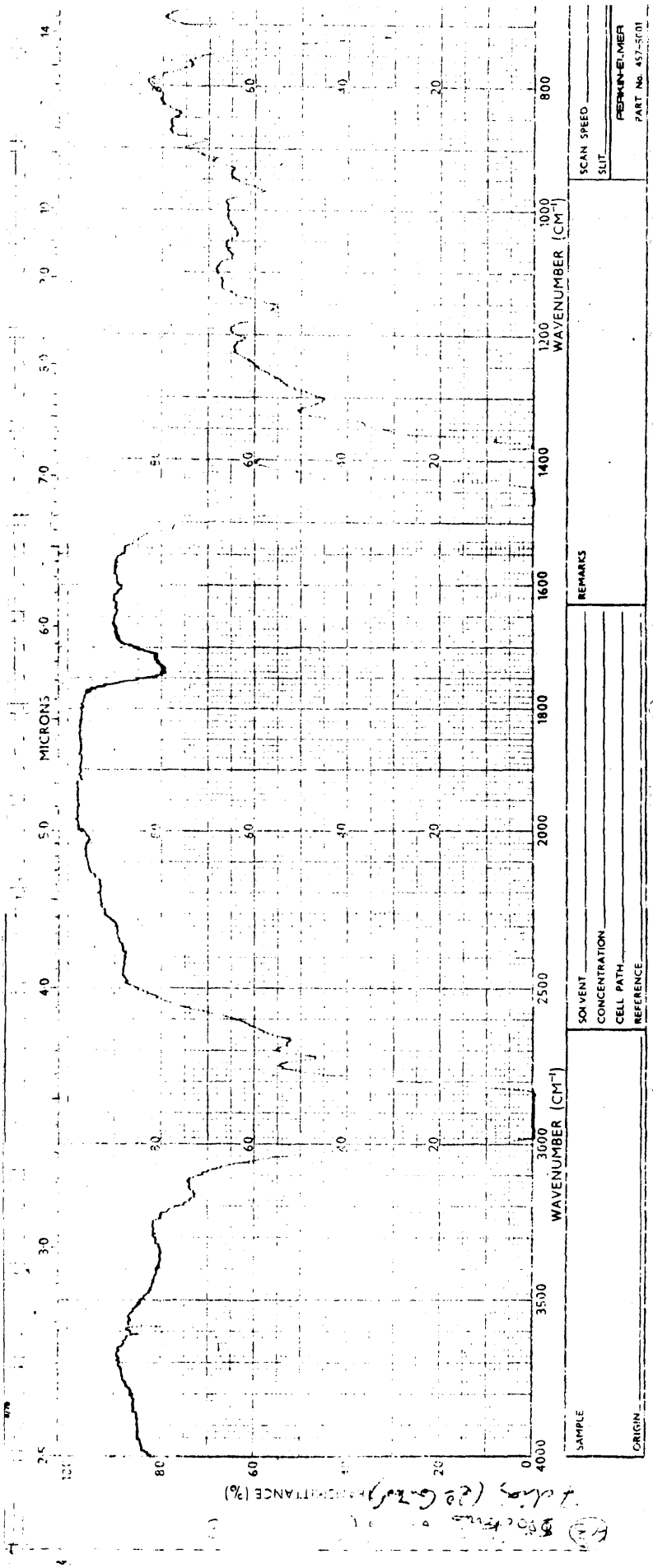
Gráfica 60. Estirpe P-42. Cultivo sobre pentadecano.



Gráfica 61. Estirpe P-42. Cultivo sobre tetrametilpentadecano.

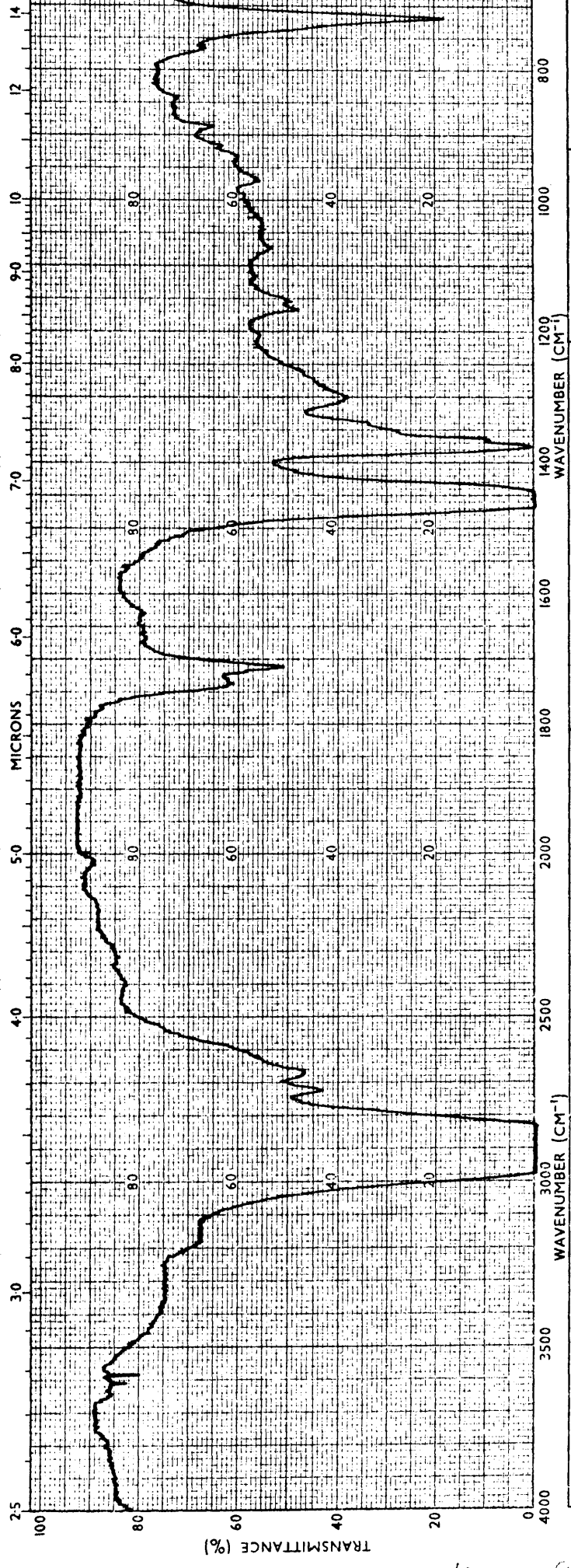


Gráfica 62. Estirpe P-42. Cultivo sobre aromáticos.



SAMPLE	REMARKS	SCAN SPEED
CONCENTRATION		SLIT
CELL PATH		PERKIN-ELMER
REFERENCE		PART No. 457-5001
ORIGIN		

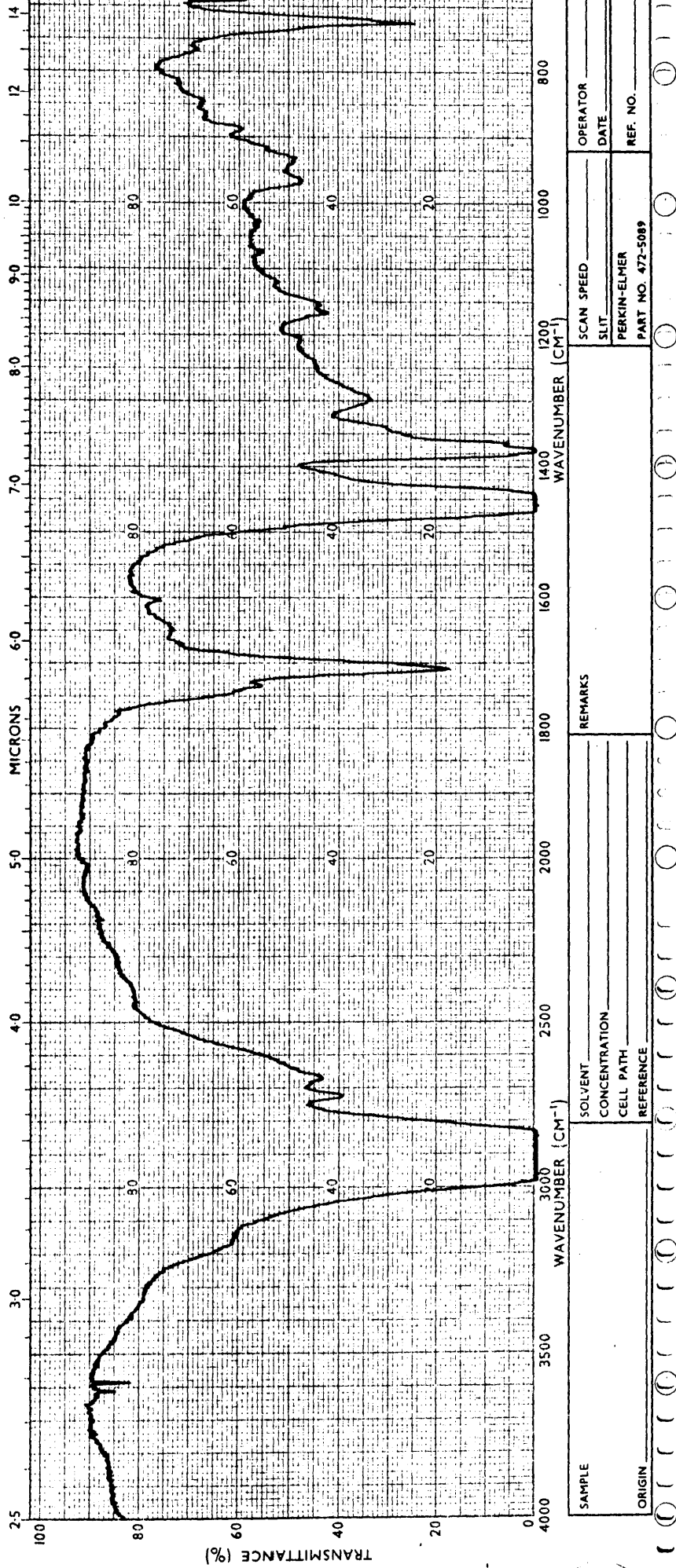
Gráfica 63. Estirpe G-43. Cultivo sobre parafinas totales.



SAMPLE	SOLVENT	REMARKS	OPERATOR
ORIGIN	CONCENTRATION		DATE
	CELL PATH		REF. NO.
	REFERENCE		
		SCAN SPEED	
		SLIT	
		PERKIN-ELMER	
		PART NO. 472-5089	

Gráfica 64. Estirpe G-43. Cultivo sobre parafinas lineales.
 (Control:Gráfica 10).

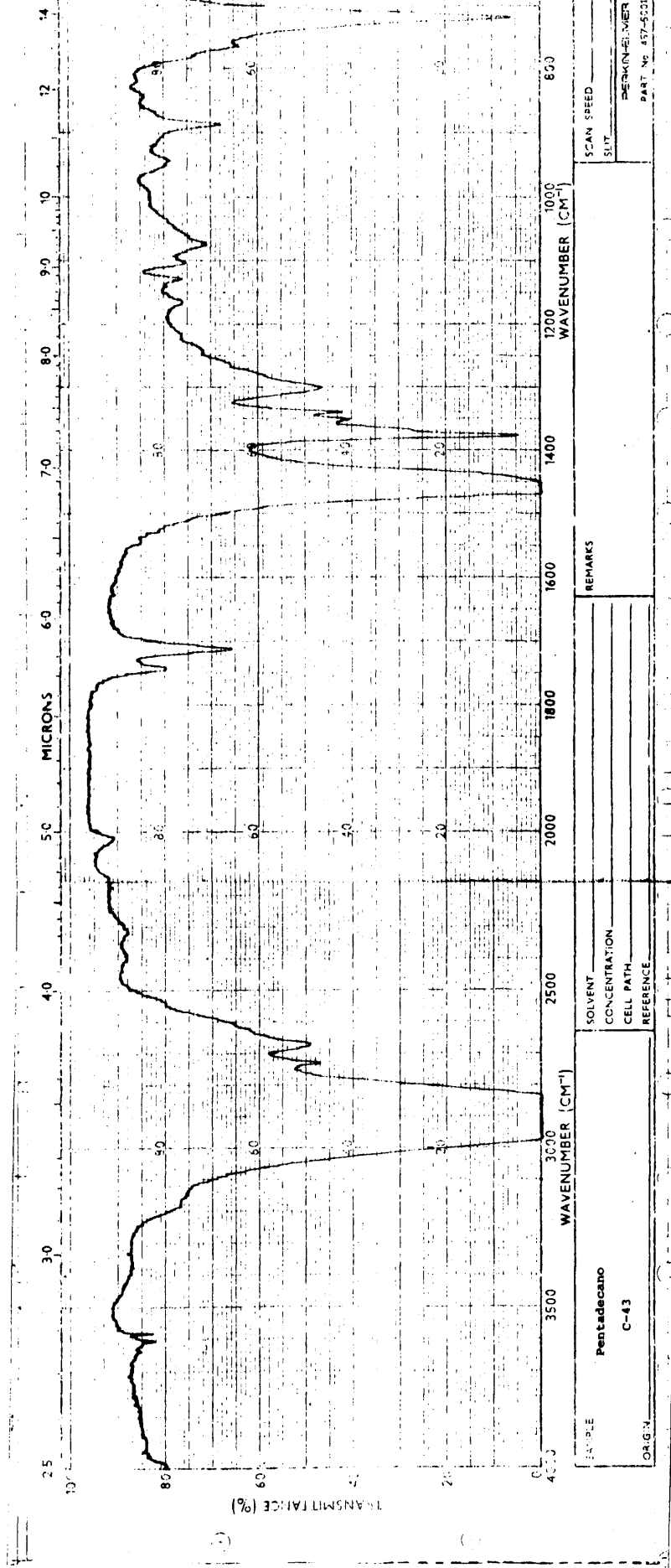
(43) Control



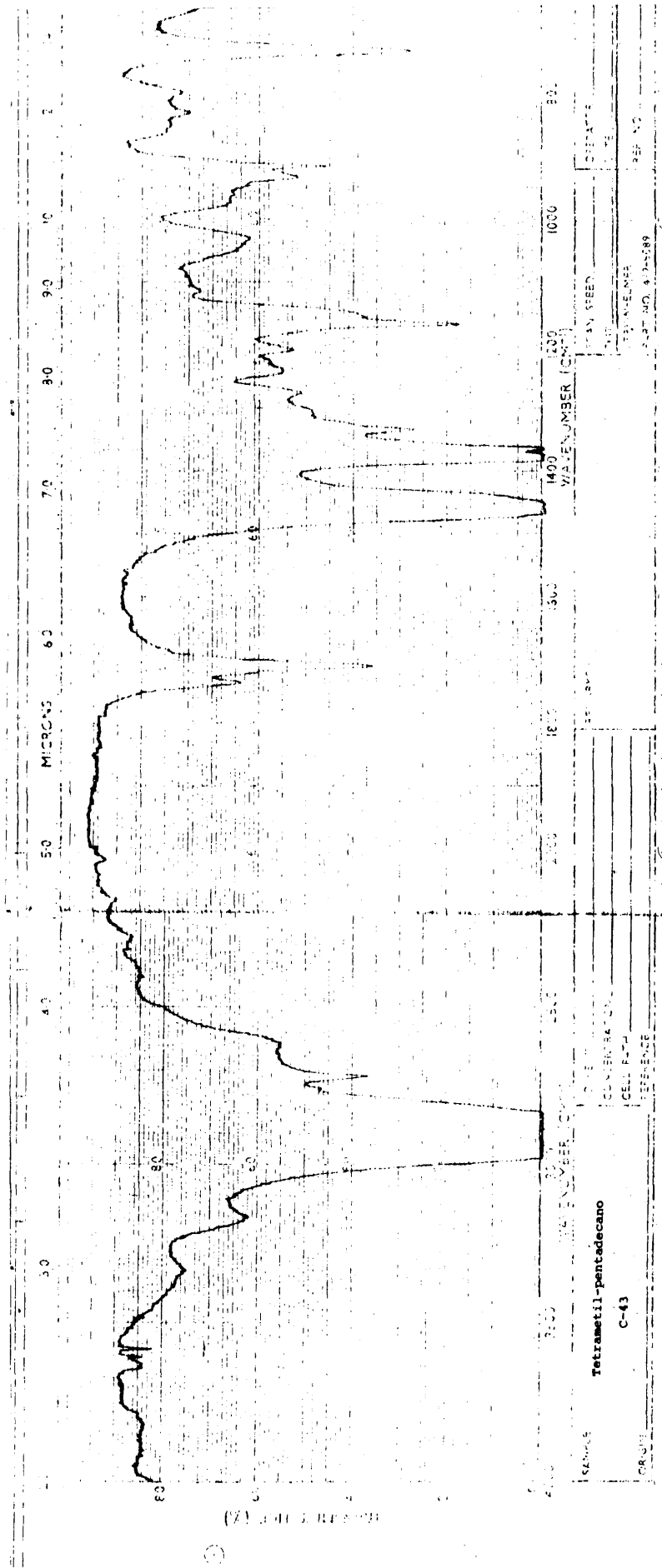
SAMPLE	SOLVENT	REMARKS	SCAN SPEED	OPERATOR
	CONCENTRATION		SLIT	DATE
ORIGIN	CELL PATH	PERKIN-ELMER	PART NO. 472-5089	REF. NO.

Gráfica 65. Estirpe G-43. Cultivo sobre parafinas ramificadas.
 (Control:Gráfica 9).

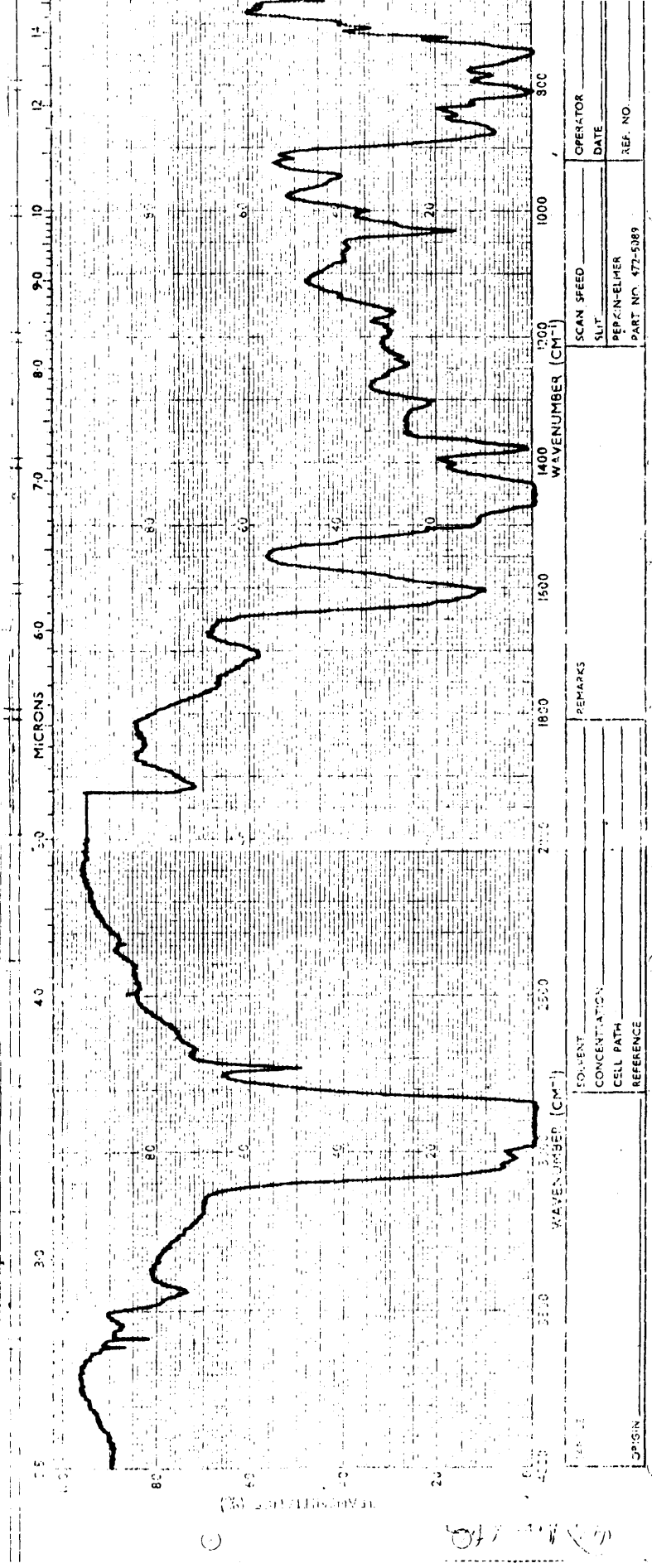
472-5089 (17)



Gráfica 66. Estirpe G-43. Cultivo sobre pentadecano.



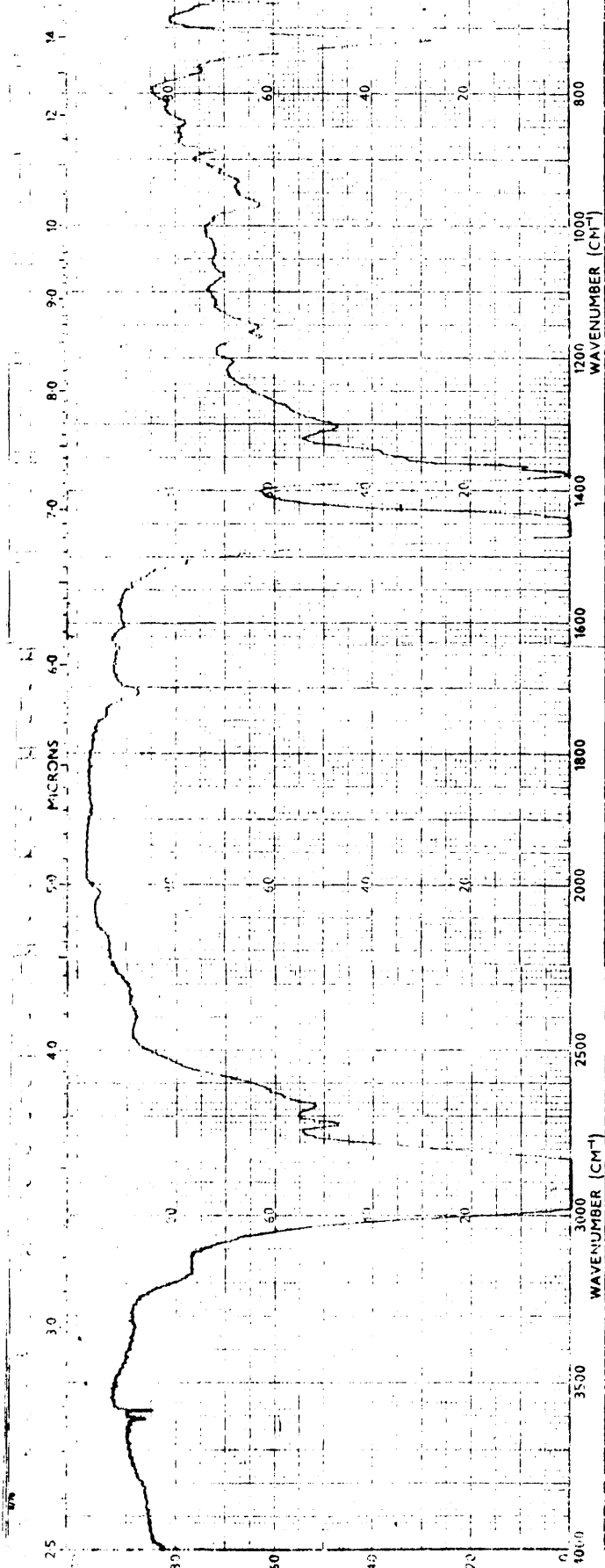
Gráfica 67. Estirpe G-43. Cultivo sobre tetrametilpentadecano.



OPERATOR	DATE
SCAN SPEED	SLOT
PERKIN-ELMER	REF. NO.
PART NO. 472-5389	

SOLVENT	REMARKS
CONCENTRATION	
CELL PATH	
REFERENCE	

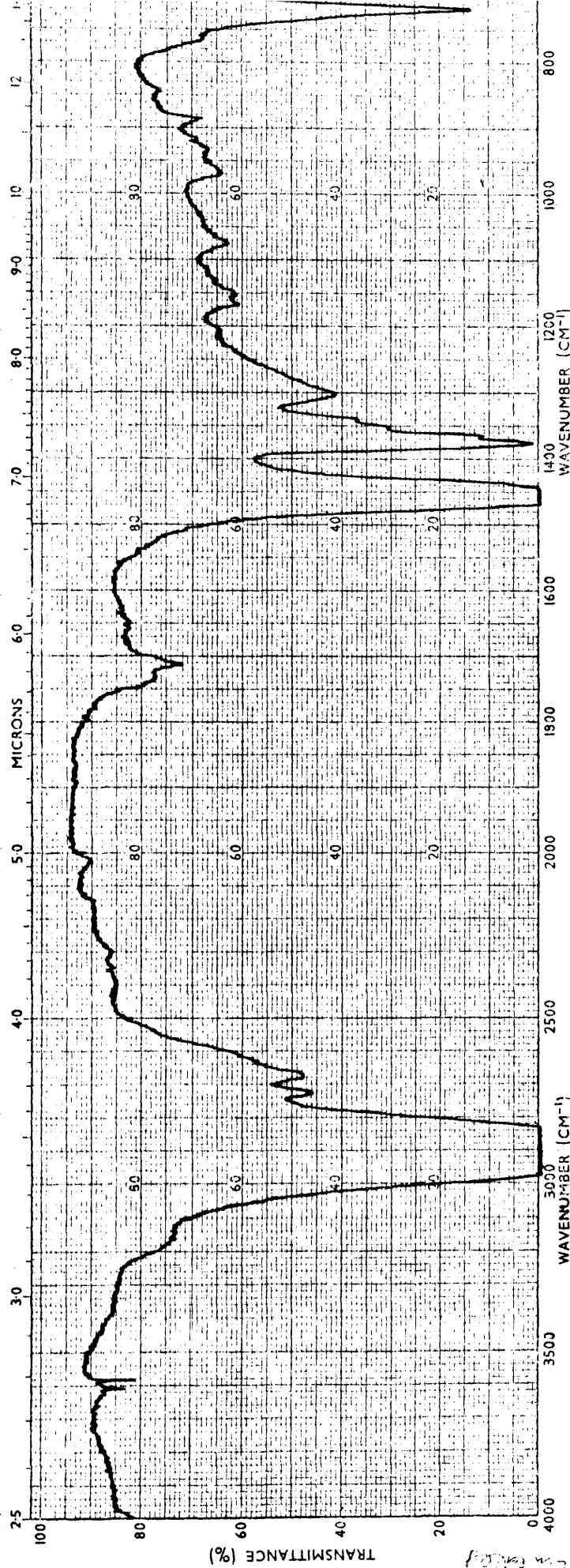
Gráfica 68. Estirpe G-43. Cultivo sobre aromáticos.



69
 +
 Transmittance (%)
 Wavenumber (CM⁻¹)

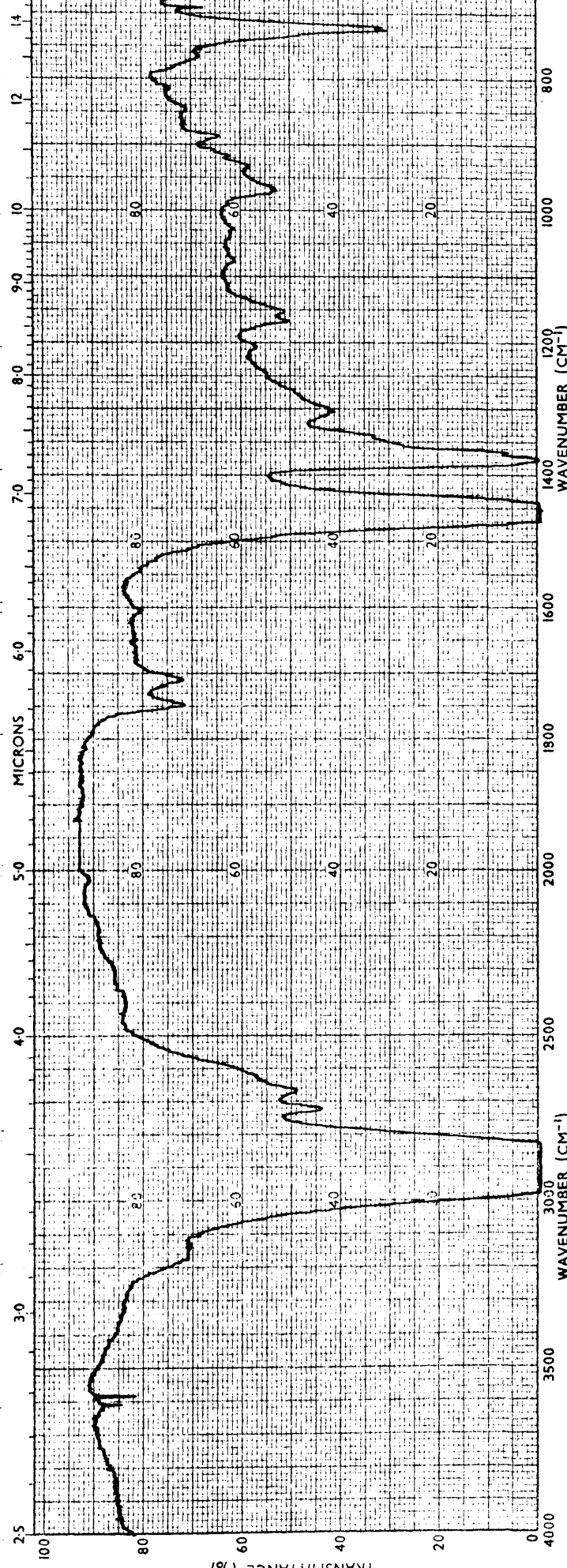
SAMPLE	SOLVENT	REMARKS	SCAN SPEED
	CONCENTRATION		SLIT
ORIGIN	CELL PATH		PERKIN-ELMER
	REFERENCE		PART NO. 457-5001

Gráfica 69. Estirpe P-44. Cultivo sobre parafinas totales.



SAMPLE		REMARKS	
ORIGIN		SCAN SPEED	
SOLVENT		SLIT	
CONCENTRATION		PERKIN-ELMER	
CELL PATH		PART NO. 472-5089	
REFERENCE		OPERATOR	
		DATE	
		REF. NO.	

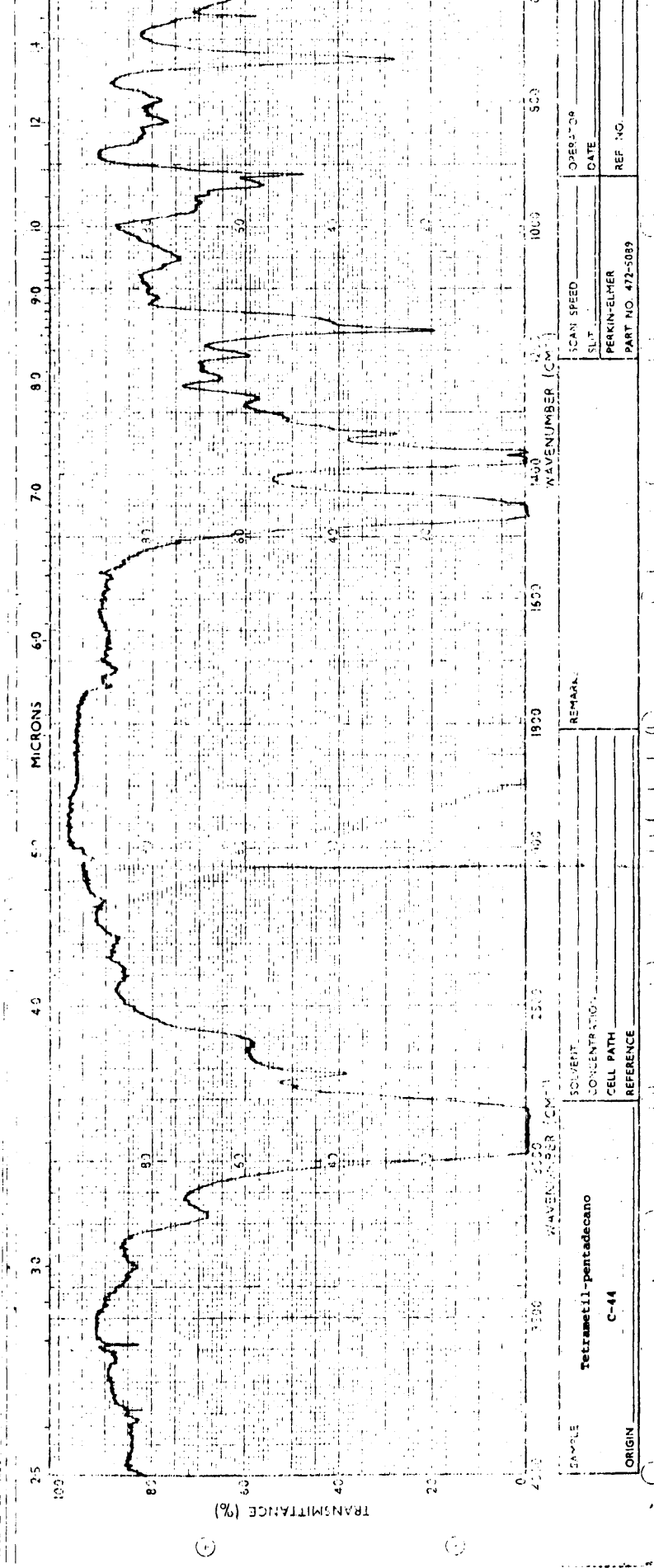
Gráfica 70. Estirpe P-44. Cultivo sobre parafinas lineales.
(Control:Gráfica 10).



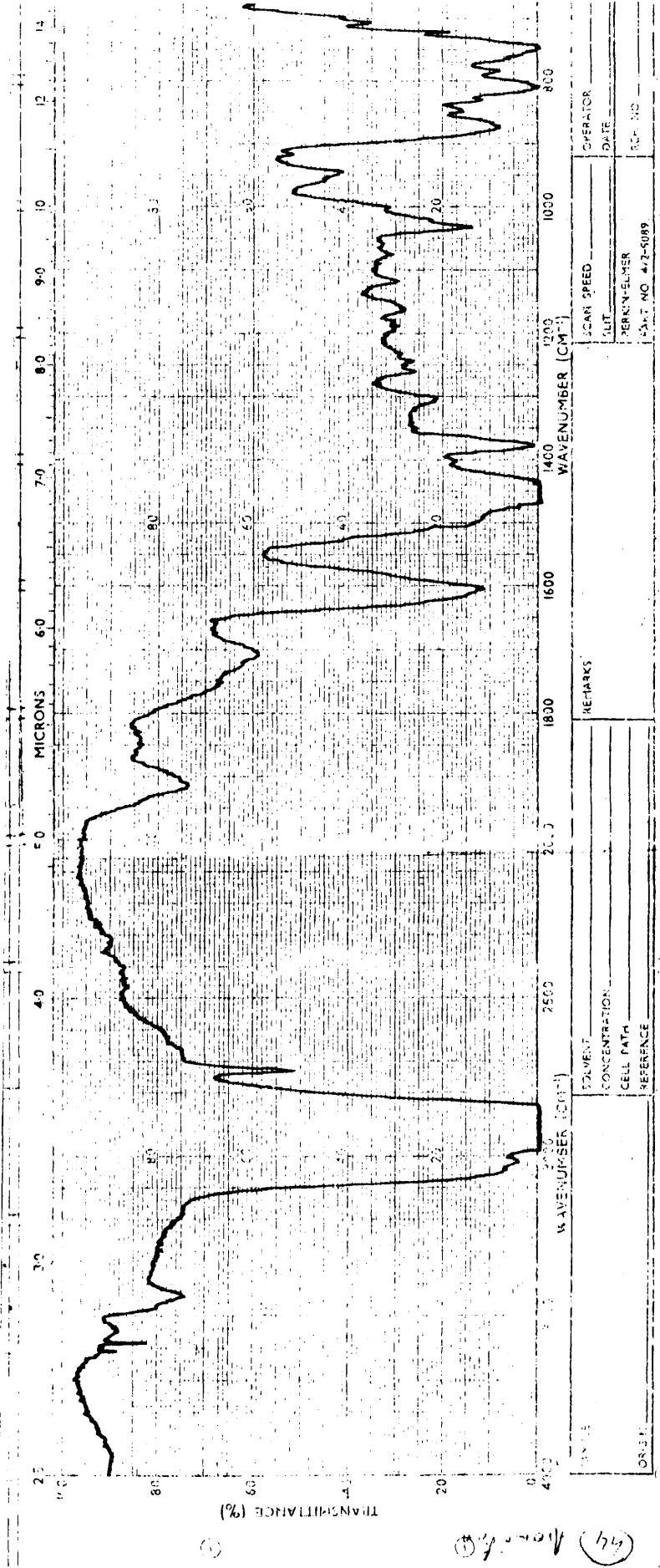
SAMPLE	SOLVENT	REMARKS	SCAN SPEED	OPERATOR
	CONCENTRATION		SLIT	DATE
ORIGIN	CELL PATH	PERKIN-ELMER	PART NO. 472-5089	REF. NO.

Gráfica 71. Estirpe P-44. Cultivo sobre parafinas ramificadas.
(Control:Gráfica 9).

(Handwritten signature)



Gráfica 73. Estirpe P-44. Cultivo sobre tetrametilpentadecano.



Gráfica 74. Estirpe P-44. Cultivo sobre aromáticos.

(44) No. 44

En cambio en los cultivos sobre parafinas ramificadas predomina la banda fuerte a 1710, que no va acompañada de absorción en la región 3000-2500 de vibración del O-H carboxílico y que por tanto nos inclinamos a considerar de carácter cetónico, al menos en parte.

El comportamiento frente a pentadecano y tetrametilpentadecano, sigue la misma línea, pues mientras en el primero es intensa la banda de aldehidos o ésteres, no lo es tanto en el segundo donde siempre hay una banda a 1710 destacada por su gran intensidad.

Por debajo de 1700 cm^{-1} aparecen bandas a 1660, 1650, 1630 y 1605 de las cuales, al menos las dos primeras no pueden deberse a un doble enlace conjugado y la tercera, que es la de mayor intensidad, tampoco nos lo parece.

Región 1400-800: Las bandas en esta región son de muy diferentes significados y a veces no tienen interés por su difícil asignación.

La variación en las bandas a 1150 y 1170 ya ha sido estudiada anteriormente e implica una variación igual en la concentración de moléculas ramificadas. Lo mismo podemos afirmar respecto de la banda a 1380 cm^{-1} .

Las bandas hacia 1160 que aparecen en algunos cultivos sobre pentadecano deben corresponder a vibraciones del enlace C-O que por su baja situación pensamos que serán debidas a la presencia de ácidos carboxílicos, pues para los ésteres se presentan a números de onda superiores (1240 cm^{-1} aproximadamente) y son más fuertes.

Las bandas fuertes a 1030 cm^{-1} de los espectros de las gráficas 61 y 67 tampoco ofrecen lugar a dudas, y nos sirven para explicar la aparición de bandas en esta zona en otros espectros. Se deben a vibraciones de flexión (en el plano) de enlaces O-H y de tensión de enlaces C-O, en alcoholes primarios. A veces aparecen dos bandas pero es ésta la más intensa. La relación de esta banda con las situadas entre 3700 y 3200 es innegable y confirme nuestra idea que los alcoholes formados son primarios.

Finalmente las bandas hacia 940 cm^{-1} indican probablemente vibraciones de flexión del OH fuera del plano en grupos ácidos carboxílicos, como ya se indicó anteriormente.

Región 800-625: En las estirpes de buen crecimiento, vuelven a aparecer bandas a 725 y 690 cm^{-1} en los -- cultivos sobre parafinas ramificadas. Su --- asignación es dudosa y ya ha sido tratada.

En cuanto a las variaciones cuantitativas de la banda a 720 cm^{-1} , solo haremos - notar que en algunos de estos espectros son particularmente intensas.

Revisión de los espectros.-

En conjunto, las estirpes de este género se caracterizan por dar los valores más altos de crecimiento y las bandas más intensas de oxidación sobre las parafinas de todo tipo.

En cuanto a la selectividad, podemos suponer que oxidan fuertemente las moléculas ramificadas, pero utilizan mejor para el crecimiento las lineales, siempre que estas estén disueltas en aquellas. La disminución de intensidad de la banda a 720 cm^{-1} no está tan marcada como para otras estirpes que -- tienen en cambio valores de absorbancia para las bandas de -- C=O mayores (ver tablas LXXII y LXXIII). Sin embargo, en presencia de los dos tipos de parafinas, es decir, en el cultivo sobre la fracción parafínica total, muestra una selectividad hacia las de cadena lineal que contrasta con las bandas de -- oxidación de las ramificadas más intensas.

Las estirpes que mejor crecieron fueron las P-42 y G-43, y especialmente la última, que se estudia con más detalle en - otro capítulo.

Es interesante destacar aquí el efecto de oxidación -- tan marcado en la estirpe G-41, que no va acompañado en ninguno de sus cultivos de un crecimiento igualmente importante. -- Además no se produce disminución de intensidad a 720 cm^{-1} . Esto solo se puede explicar suponiendo que la estirpe forma productos de oxidación que es incapaz de utilizar posteriormente para su crecimiento, y que se acumulan en el medio de cultivo.

4.6.2.4. - Resultado de los cultivos de la especie del género -
Streptomyces.

Los valores de crecimiento y pH final de estos cultivos se dan en la tabla LXIV.

Se incluye en este grupo la estirpe Pa-19. Los espectros correspondientes están representados en las gráficas 75 a 78.

Las bandas diferenciales de estos espectros respecto de los controles se recogen en la tabla LXV.

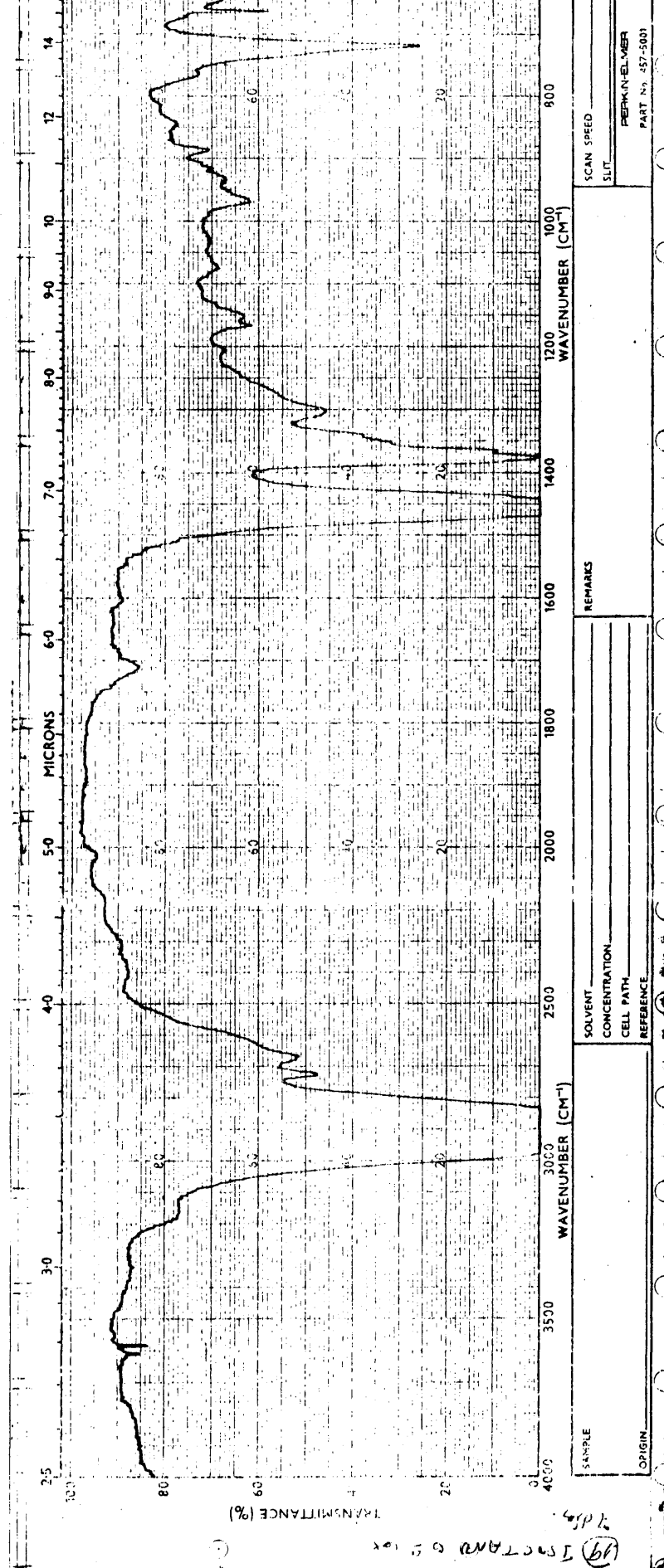
Asignación de bandas y discusión.

Las bandas que aparecen en estos espectros son similares a las de los anteriores, por lo que no serán nuevamente -- descritas.

También este grupo utiliza las parafinas lineales selectivamente haciendo disminuir la intensidad de la banda a -- 720 cm^{-1} .

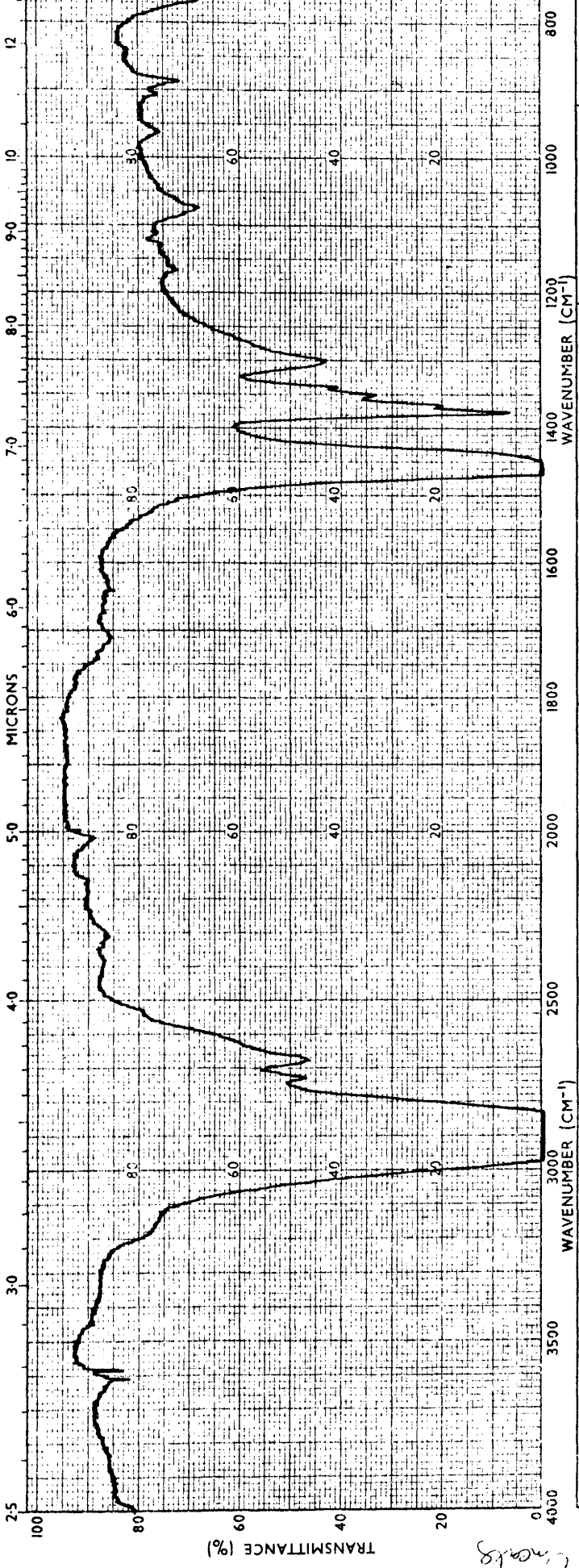
En la región $1800-1600 \text{ cm}^{-1}$ se forman dos bandas, una carboxílica y otra correspondiente a una insaturación, siendo la primera más intensa en la fracción de parafinas ramificadas.

El pentadecano y el tetrametilpentadecano no son utilizados ni oxidados.



Gráfica 75. Estirpe Pa-19. Cultivo sobre parafinas totales.

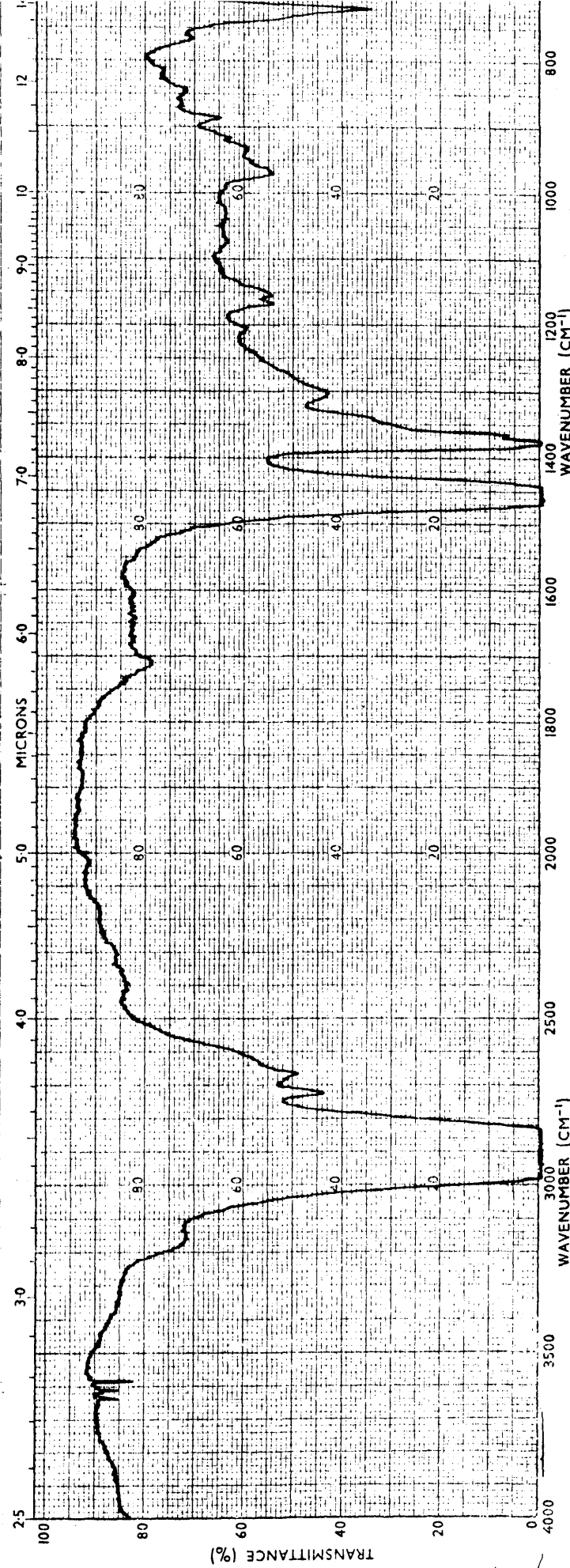
SAMPLE	SOLVENT	REMARKS
ORIGIN	CONCENTRATION	
	CELL PATH.	
	REFERENCE	
	SCAN SPEED	
	SLIT	
	PERKIN-ELMER	
	PART No. 457-5001	



SAMPLE _____ OPERATOR _____
 ORIGIN _____ CONCENTRATION _____ DATE _____
 SOLVENT _____ CELL PATH _____ REFERENCE _____ PERKIN-ELMER PART NO. 472-5089
 REMARKS _____
 SCAN SPEED _____ SLIT _____
 WAVENUMBER (CM⁻¹) _____ MICRONS _____

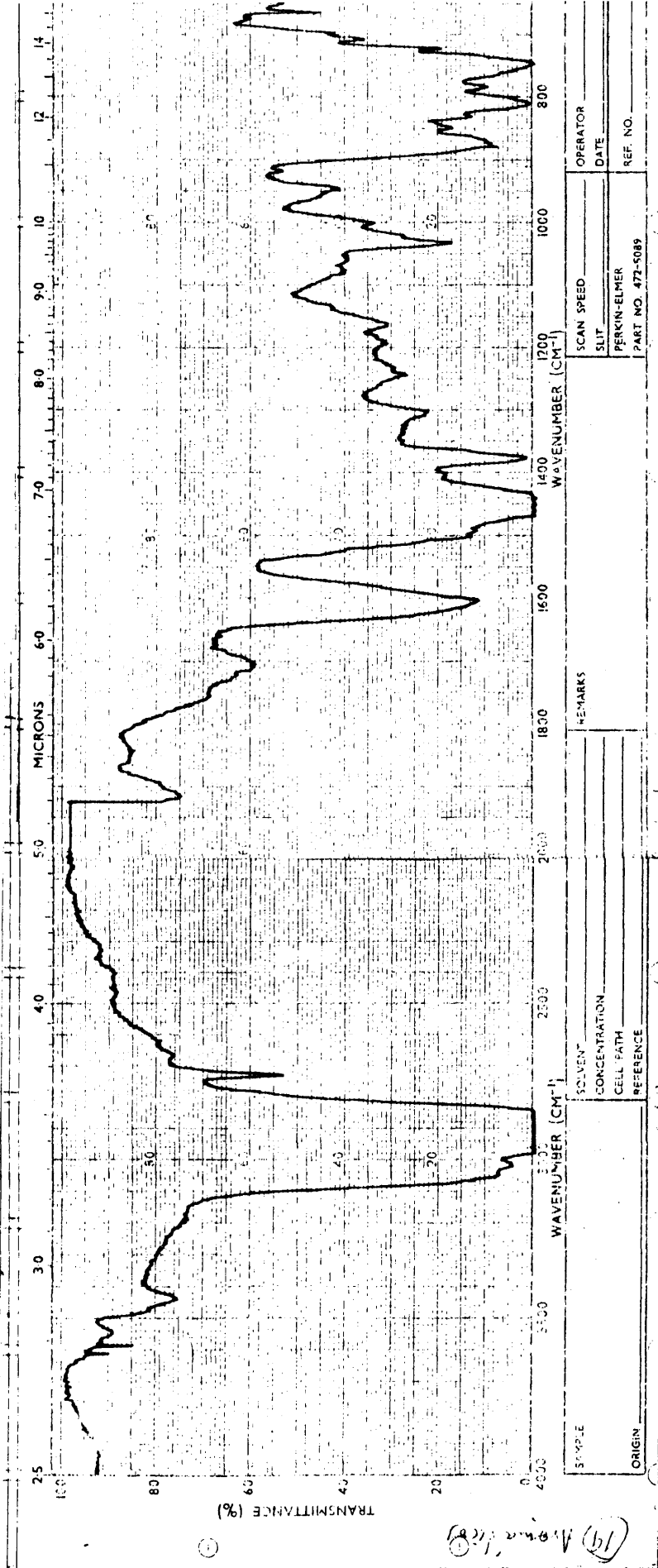
Gráfica 76. Estirpe Pa-19. Cultivo sobre parafinas lineales.
 (Control:Gráfica 9).

1/1 (1976)



SAMPLE	SOLVENT	CONCENTRATION	CELL PATH	REFERENCE	REMARKS	SCAN SPEED	OPERATOR
						SLIT	DATE
ORIGIN						PERKIN-ELMER	REF. NO.
						PART NO. 472-5089	

Gráfica 77. Estirpe Pa-19. Cultivo sobre parafinas ramificadas.
(Control:Gráfica 9)



WAVENUMBER (CM ⁻¹)	1700	1200	1000	800
MICRONS	5.9	8.3	10.0	12.5
WAVENUMBER (CM ⁻¹)	3000	2500	1800	1600
MICRONS	3.3	4.0	5.6	6.3

OPERATOR	DATE
SCAN SPEED	SLIT
PERKIN-ELMER	PART NO. 472-5089
REF. NO.	

REMARKS
CONCENTRATION
CELL PATH
REFERENCE
ORIGIN

Gráfica 78. Estirpe Pa-19. Cultivo sobre aromáticos.

Tabla LXIV: Valores de crecimiento y pH final de los cultivos de estirpes del género Streptomyces.

Estirpe	Parafinas totales		Parafinas lineales		Parafinas ramificadas		Pentadecano		Tetrametil-Pentadecano		Aromáticos	
	Crecimiento	PH. final	Crecimiento	PH. final	Crecimiento	PH. final	Crecimiento	PH. final	Crecimiento	PH. final	Crecimiento	PH. final
Pa-19	0,025	6,5	0,020	7	0,010	6,5	-	-	-	-	0,015	6

Tabla LXV: Género Streptomyces. Bandas diferenciales entre --- los espectros de cultivos y sus respectivos controles.

Estirpe	Parafinas totales	Parafinas lineales	Parafinas ramificadas	Pentadecano	Tetrametilpentadecano	Aromáticos
Pa-19	1710 (m) 1300-900 (aumenta) 720 (disminuye)	3500-3100 (d) 1740 (d) 1710 (d) 1630 (d) 720 (disminuye)	3500-3100 (d) 1710 (m) 1600 (d) 1300-800 (aumenta) 720 (disminuye)	No crece	No crece	3400-3100 (m) 1710 (m) 1300- 900 (aumenta)

4.6.2.5. - Resultado de los cultivos de las especies del género Micrococcus.

Los valores de crecimiento y pH final de estos cultivos se dan en la tabla LXVI.

Se incluyen en este grupo las estirpes P-4, P-5, P-9, G-39 y P-40. Los espectros correspondientes representados en las gráficas 79 a 97.

Las bandas diferenciales de estos espectros respecto de los controles se recogen en la tabla LXVII.

Asignación de bandas y discusión.

Región 3600-3100: Las bandas en esta región son débiles salvo para la estirpe G-39 en la fracción de parafinas ramificadas donde aparece una banda -- más intensa a 3340 cm^{-1} . El aspecto de estas bandas es por lo demás idéntico al de otros espectros.

Región 3500-2300: Tampoco aquí las bandas son de utilidad para decidir sobre la naturaleza del grupo carboxílico. En algunos casos las bandas debidas a estos grupos son muy intensas, por lo que sigue llamando la atención la ausencia de absorción en esta zona que indicaría que el -- compuesto formado en mayor abundancia sería de naturaleza cetónica. Sin embargo, no se puede descartar la presencia de C=O carboxílico porque en los casos en que la banda a 1710 es más intensa (gráficas 91, 92 y 93) -- va siempre "asociada" con una banda hacia -- 940 cm^{-1} de deformación fuera del plano del O-H en ácidos carboxílicos.

Región 1800-1600: En general este grupo de especies presenta -- una sola banda intensa a 1710 cm^{-1} . Las bandas de carbonilos de ésteres o aldehidos aparecen como hombros de débil intensidad a veces probablemente exageradas por la gran absorción a 1710.

Lo mismo podemos decir de las bandas entre 1700 y 1600 cm^{-1} que están ausentes ó son muy débiles en la mayoría de los espectros.

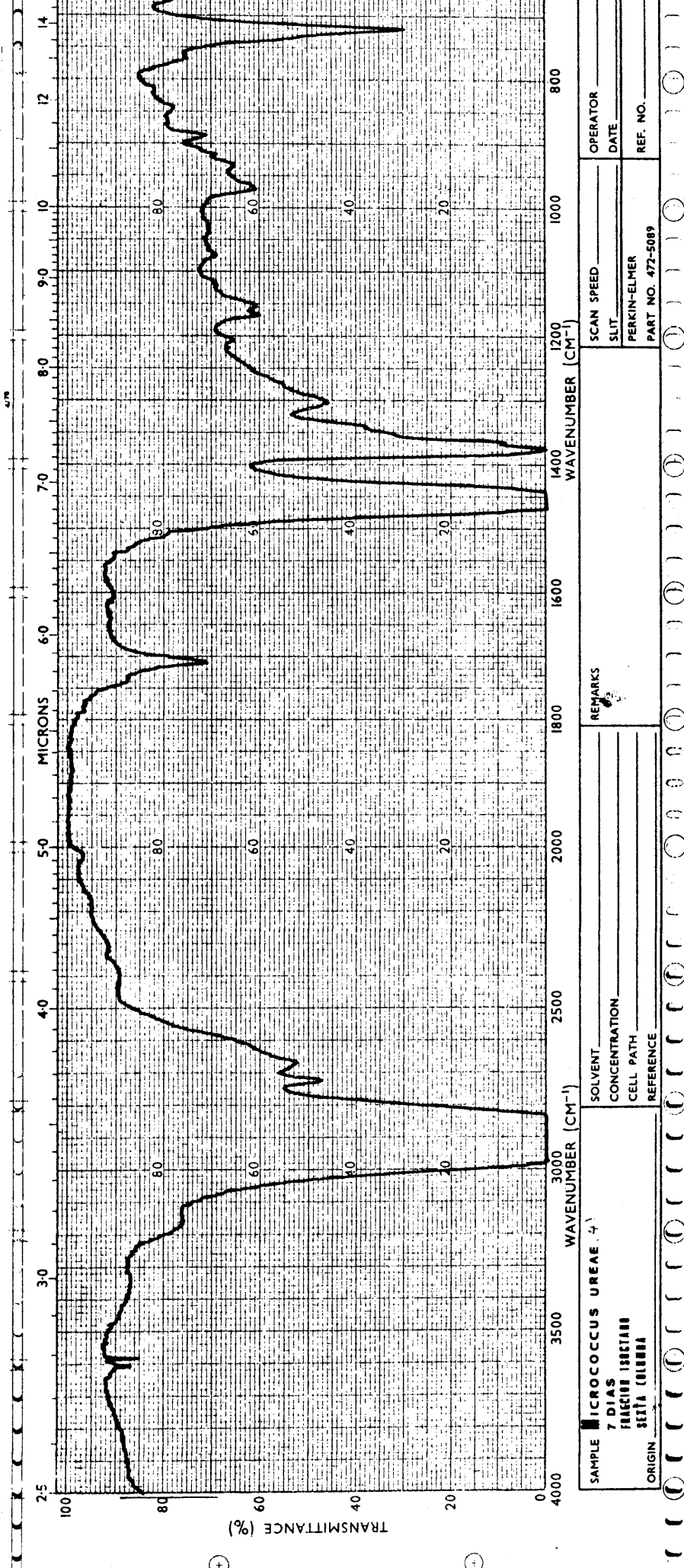
Hay que exceptuar el comportamiento de la estirpe P-40, en cuyos espectros son -- fuertes las bandas de aldehidos y las de dobles enlaces. Destaca por su intensidad la -- banda a 1605 cm^{-1} en el espectro de parafinas ramificadas (gráfica 96) asociada con -- bandas a 725 y 690 de gran intensidad.

Tabla LXVI: Valores de crecimiento y pH final de los cultivos de estirpes del género Micrococcus.

Estirpe	Parafinas totales		Parafinas lineales		Parafinas ramificadas		Pentadecano		Tetrametil-pentadecano		Aromáticos	
	Crecimiento	pH. final	Crecimiento	pH. final	Crecimiento	pH. final	Crecimiento	pH. final	Crecimiento	pH. final	Crecimiento	pH. final
P-4	0,080	6	0,040	6	0,050	6	-	-	-	-	0,040	6,5
P-5	0,045	5,5	0,060	5,5	0,120	6,5	-	-	-	-	0,070	7
P-9	0,045	5,5	0,040	6	0,080	5,5	-	-	-	-	0,040	6
G-39	0,080	6	0,250	6	0,070	6	-	-	-	-	0,070	6,5
P-40	-	-	0,010	7	0,010	6,5	-	-	-	-	0,020	6

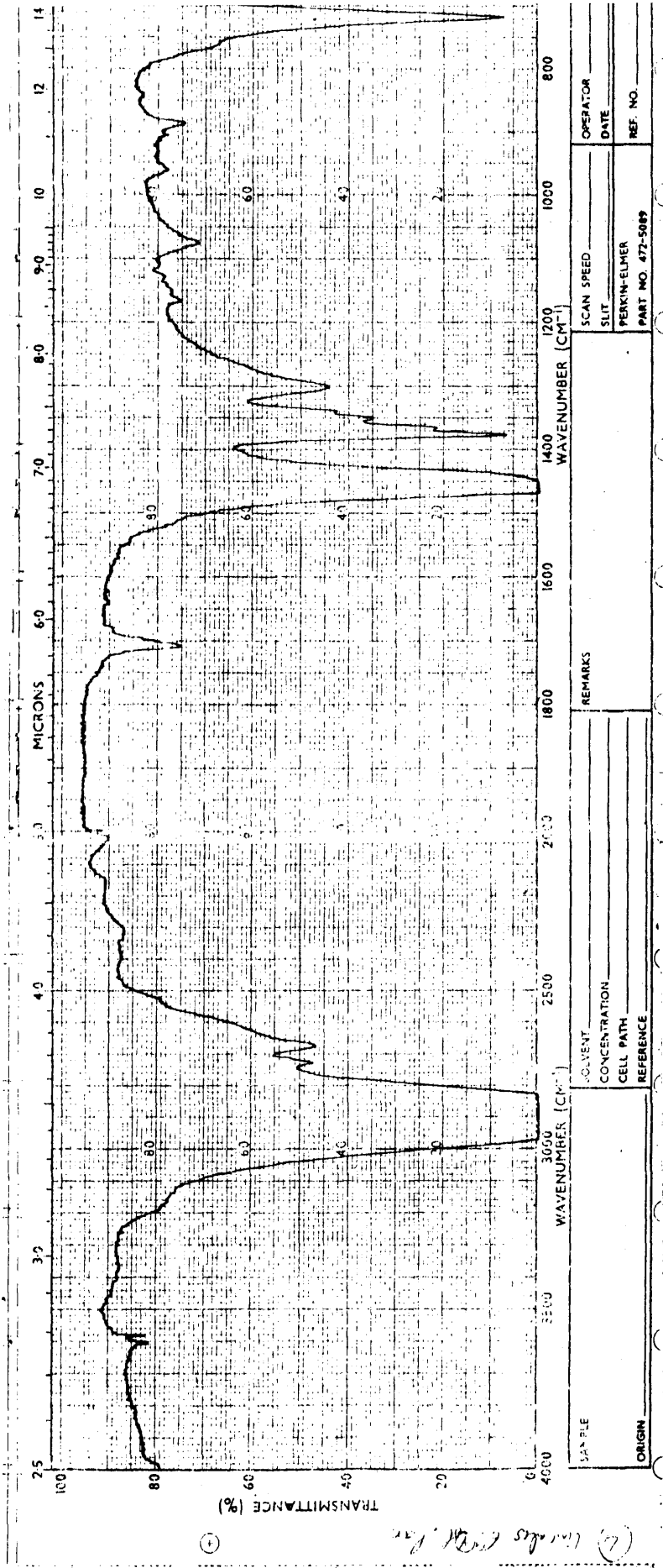
Tabla LXVII: Género Micrococcus. Bandas diferenciales entre los espectros de cultivos y sus respectivos controles.

Estirpe	Parafinas totales	Parafinas lineales	Parafinas ramificadas	Pentadecano	Tetrametilpentadecano	Aromáticos
P-4	3600-3100 (m)	1710 (f)	3600-3100 (d)			3500-3100 (m)
	1740 (d)	1300 (aumenta)	1710 (f)			2800-2500 (m)
	1710 (f)	940 (d)	1300- 800 (aumenta)	No estudiado	No estudiado	1710 (f)
	1605 (d)	885 (disminuye)	720 (disminuye)			1300-900 (aumenta)
	1300-800 (aumenta)	720 (disminuye)				
	1120* (d)					
	720 (disminuye)					
P-5	1740 (f)	3600-3100 (d)	3500-3100 (m)			3500-3100 (m)
	1710 (f)	1740 (hombro,d)	1710 (f)			1710 (f)
	1120* (f)	1710 (f)	1300-800 (aumenta)			1300-900 (aumenta)
	720 (disminuye)	1590 (d)	720 (disminuye)			
		1490 (m)		No estudiado	No estudiado	
		1090 (f)				
		1015 (f)				
		805 (d)				
		775 (f)				
		770 (f)				
	720 (disminuye)					
P-9	3500-3100 (m)	1710 (m)	1710 (f)			3400-3100 (m)
	1740 (m)	1300 (aumenta)	1300-800 (aumenta)	No estudiado	No estudiado	2800-2500 (m)
	1710 (f)	890 (disminuye)	935 (d)			1710 (f)
	1120* (m)	720 (disminuye)				1300-900 (aumenta)
	930 (d)					
	720 (disminuye)					
G-39	3600-3100 (m)	3500-3100 (m)	3600-3100 (f)			3400-3100 (d)
	1740 (d)	1740 (f)	1740 (hombro,d)			1710 (f)
	1708 (f)	1710 (f)	1710 (f)			1230 (d)
	1650 (d)	1650 (d)	1120* (d)			1120* (d)
	1600 (d)	1300-800 (aumenta)	1100 (d)			
	1300-900(aumenta)	1120* (d)	1085 (d)	No estudiado	No estudiado	
	1170 (aumenta)	950 (d)	1045 (d)			
	1150 (aumenta)		940 (m)			
	930 (m)		865 (d)			
	865 (d)					
	720 (disminuye)					
		3500-3100 (d)	1745 (f)			3400-3100 (m)
		1730 (m)	1710 (m)			1710-1700 (m)
	1710 (m)	1605 (m)			1120* (d)	
	1630 (d)	1120* (m)			685 (f)	
P-40	No estudiado		1075 (m)	No estudiado	No estudiado	
			1030 (d)			
			725 (f)			
			690 (f)			



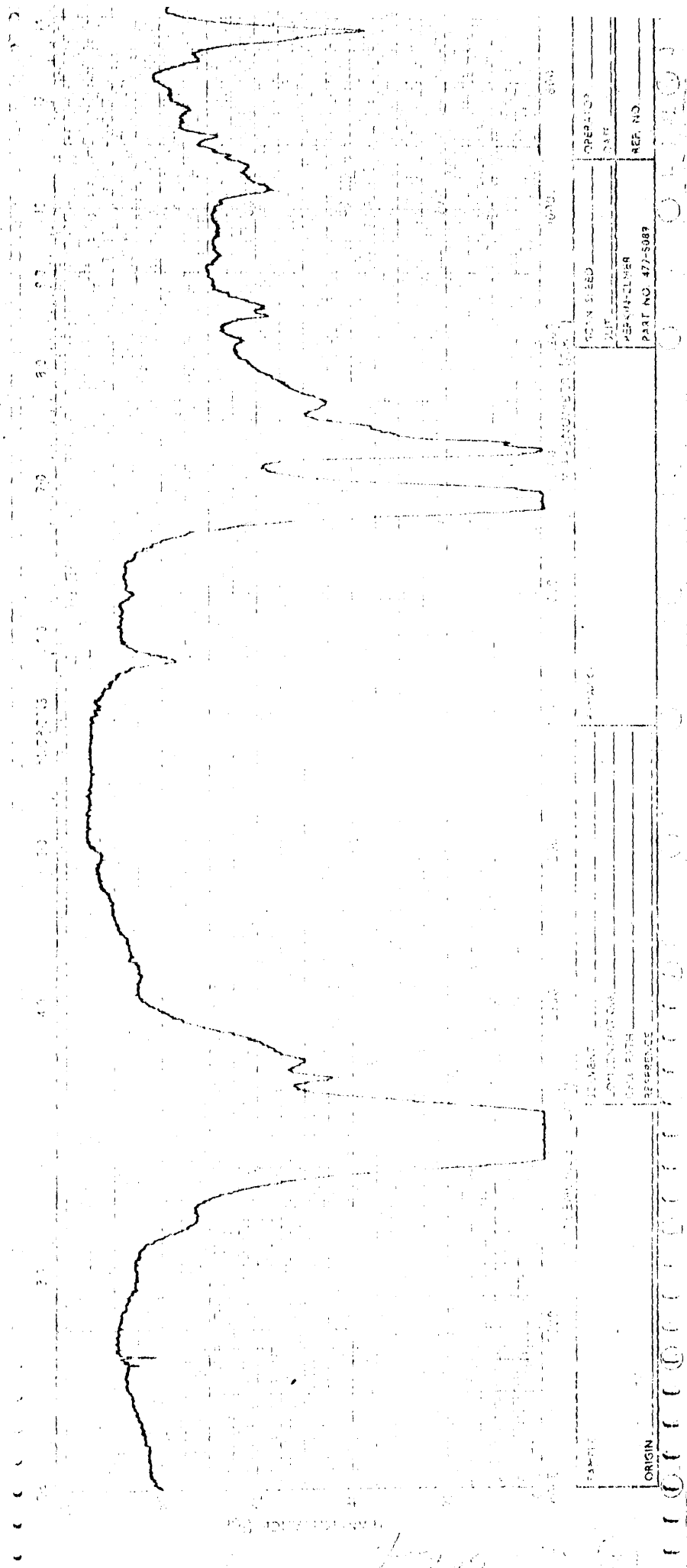
Gráfica 79. Estirpe P-4. Cultivo sobre parafinas.

This document is a reproduction of a document from the National Library of Medicine. It is not a substitute for medical advice or a medical record. It is provided for informational purposes only.



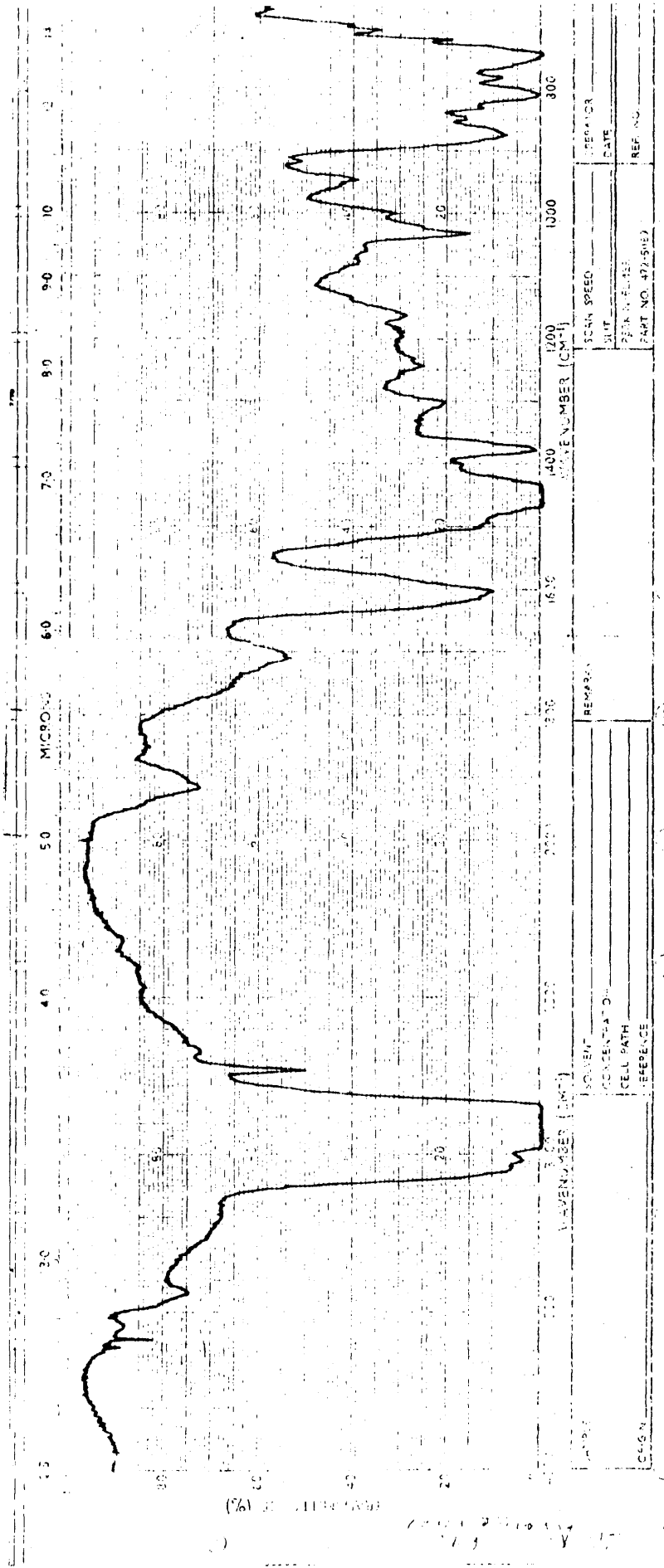
Gráfica 80. Estirpe P-4. Cultivo sobre parafinas lineales.
(Control:Gráfica 9)

SAMPLE	NO. SOLVENT	SCAN SPEED	OPERATOR
ORIGIN	CONCENTRATION	SLIT	DATE
	CELL PATH	PERKIN-ELMER	REF. NO.
	REFERENCE	PART NO. 472-5089	
REMARKS			

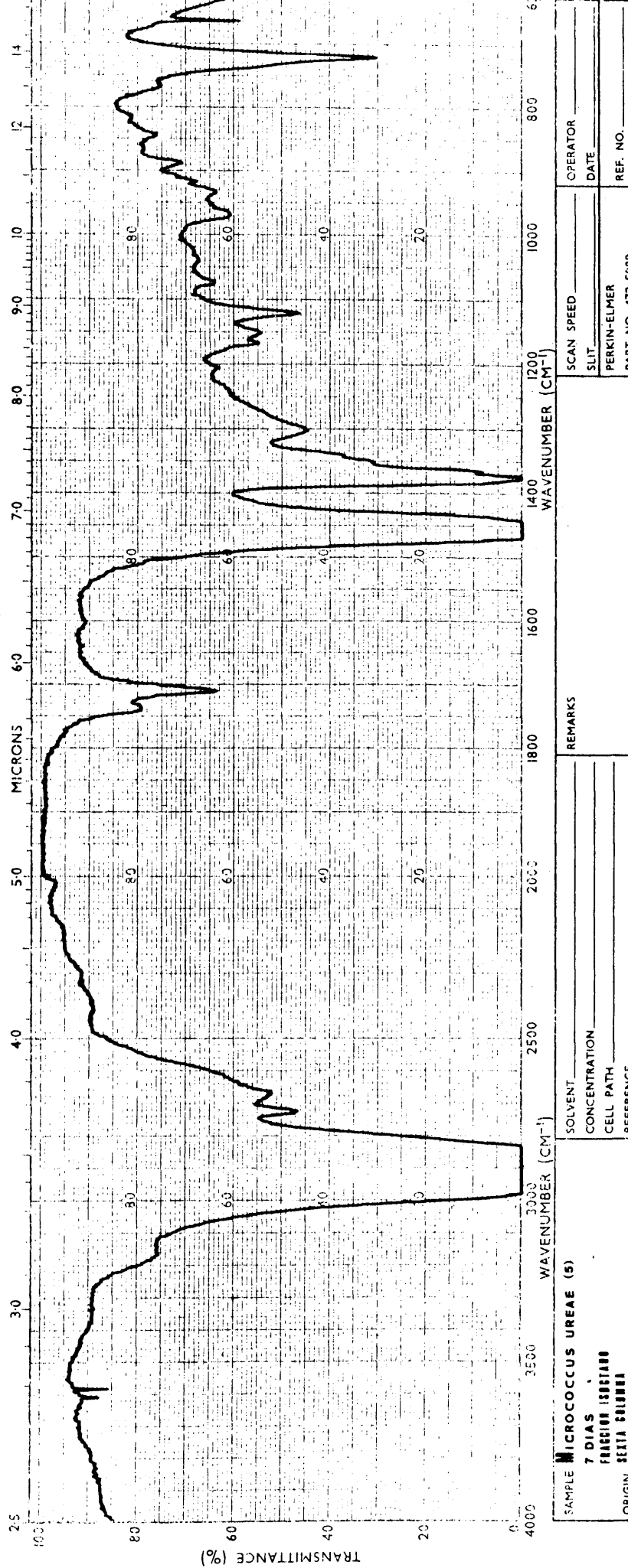


Gráfica 81. Estirpe P-4. Cultivo sobre parafinas ramificadas.
 (Control:Gráfica 9).

ORIGIN	OPERATOR
FACTORY	DATE
EXPERIMENT	REF. NO.
ANALYST	
COLLECTION DATE	
DATE SENT	
REFERENCE	
ROTOR SPEED	
MECHANISM	
PART NO. 471-5889	



Gráfica 82. Estirpe P-4. Cultivo sobre aromáticos.



SAMPLE MICROCOCCUS UREAE (S)
 7 DIAS
 FRACCIÓN ISOSTIARO
 ORIGIN SETIA COLONIA

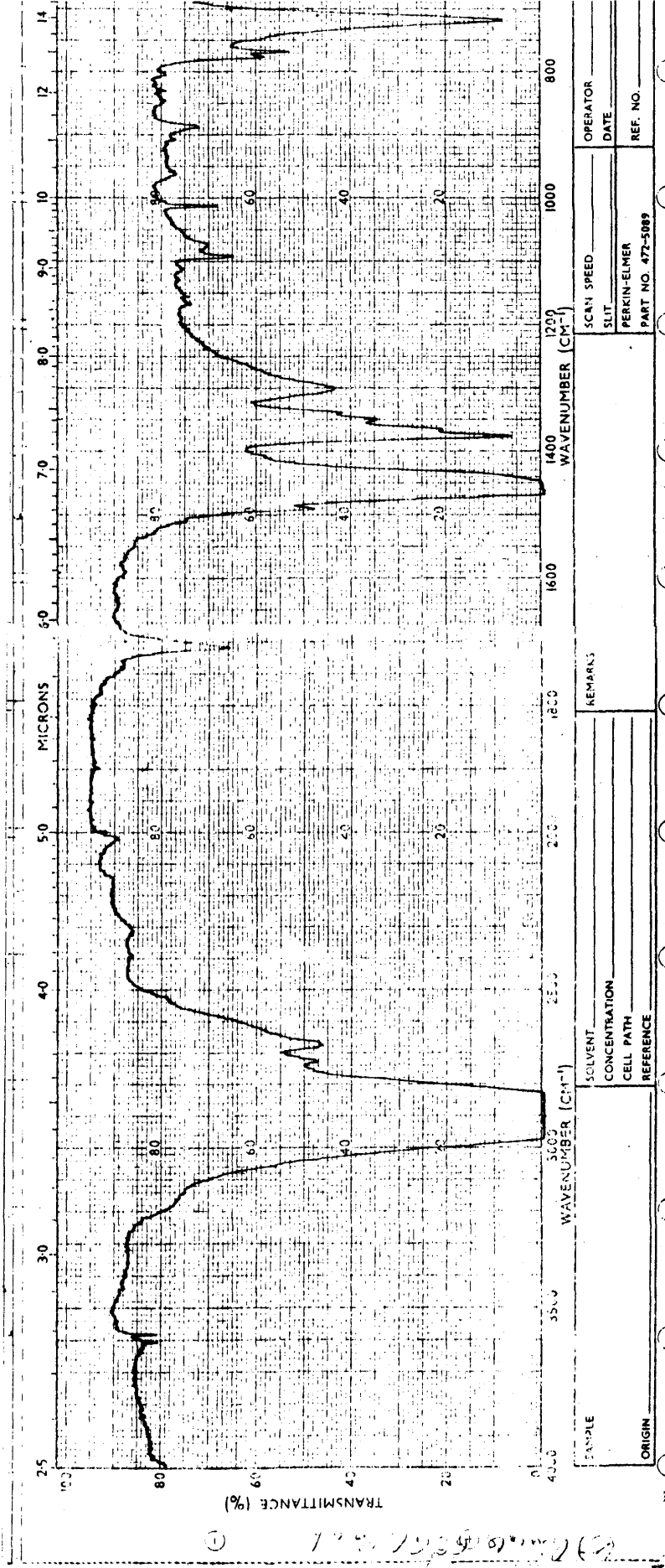
SOLVENT
 CONCENTRATION
 CELL PATH
 REFERENCE

REMARKS

SCAN SPEED
 SLIT
 PERKIN-ELMER
 PART NO. 472-5089

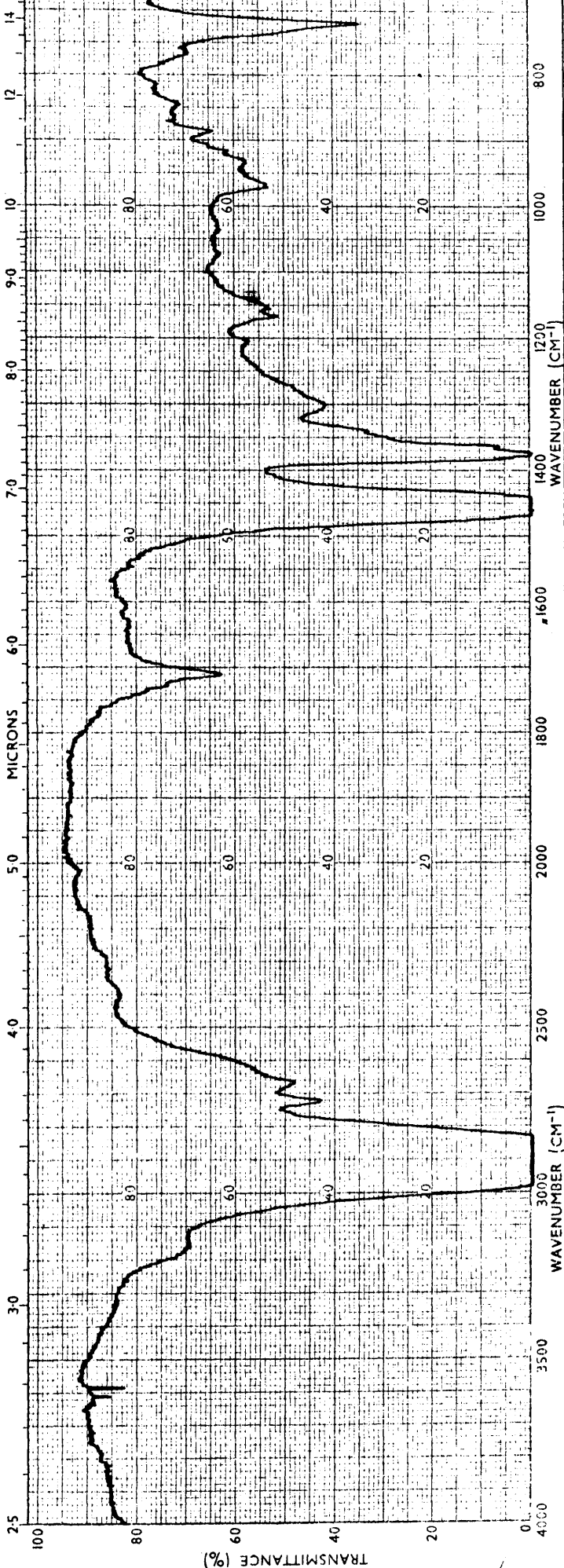
OPERATOR
 DATE
 REF. NO.

Gráfica 83. Estirpe P-5. Cultivo sobre parafinas totales.



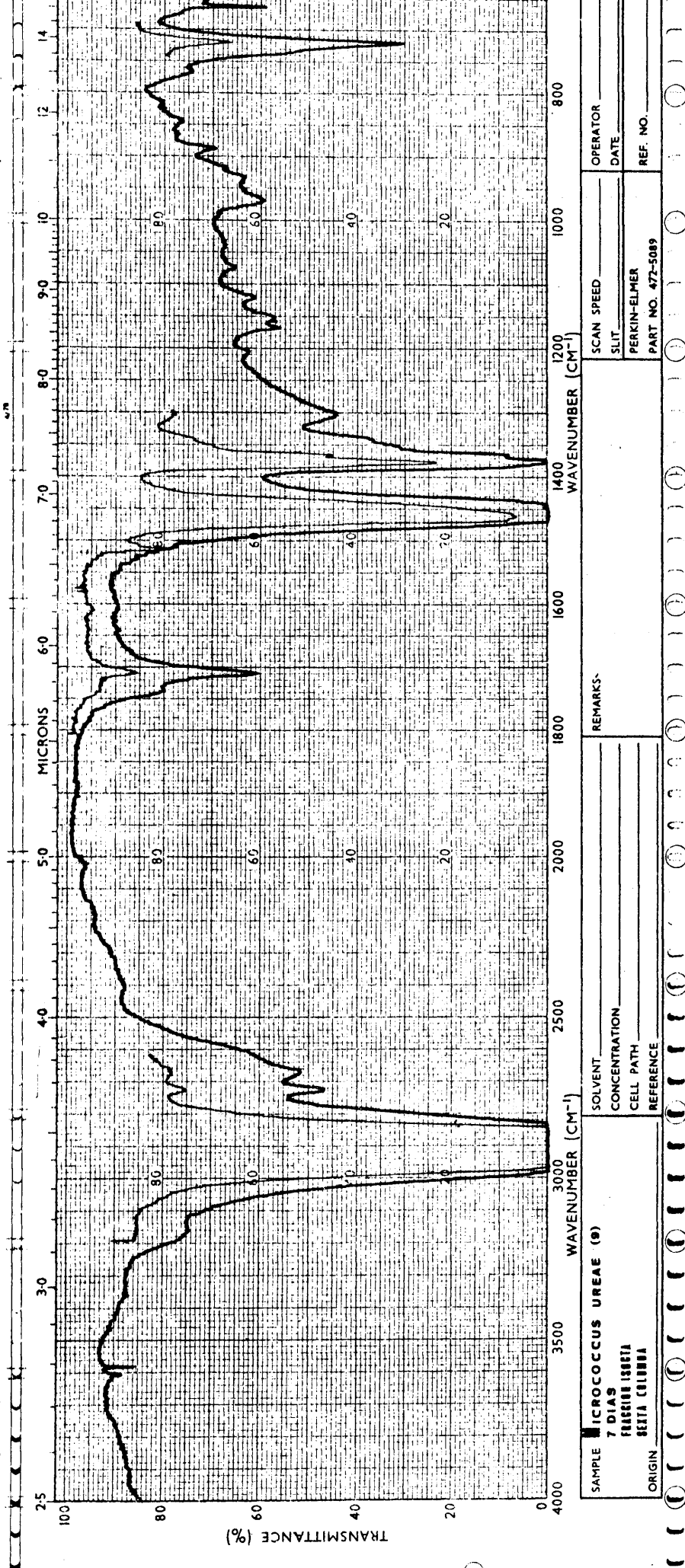
Gráfica 84. Estirpe P-5. Cultivo sobre parafinas lineales.
 (Control: Gráfica 9).

SAMPLE		SCANNING SPEED		OPERATOR	
WAVENUMBER (CM ⁻¹)		SLIT		DATE	
MICRONS		PERKIN-ELMER		REF. NO.	
TRANSMITTANCE (%)		PART NO. 472-5089			
CONCENTRATION		REMARKS			
CELL PATH					
REFERENCE					
ORIGIN					

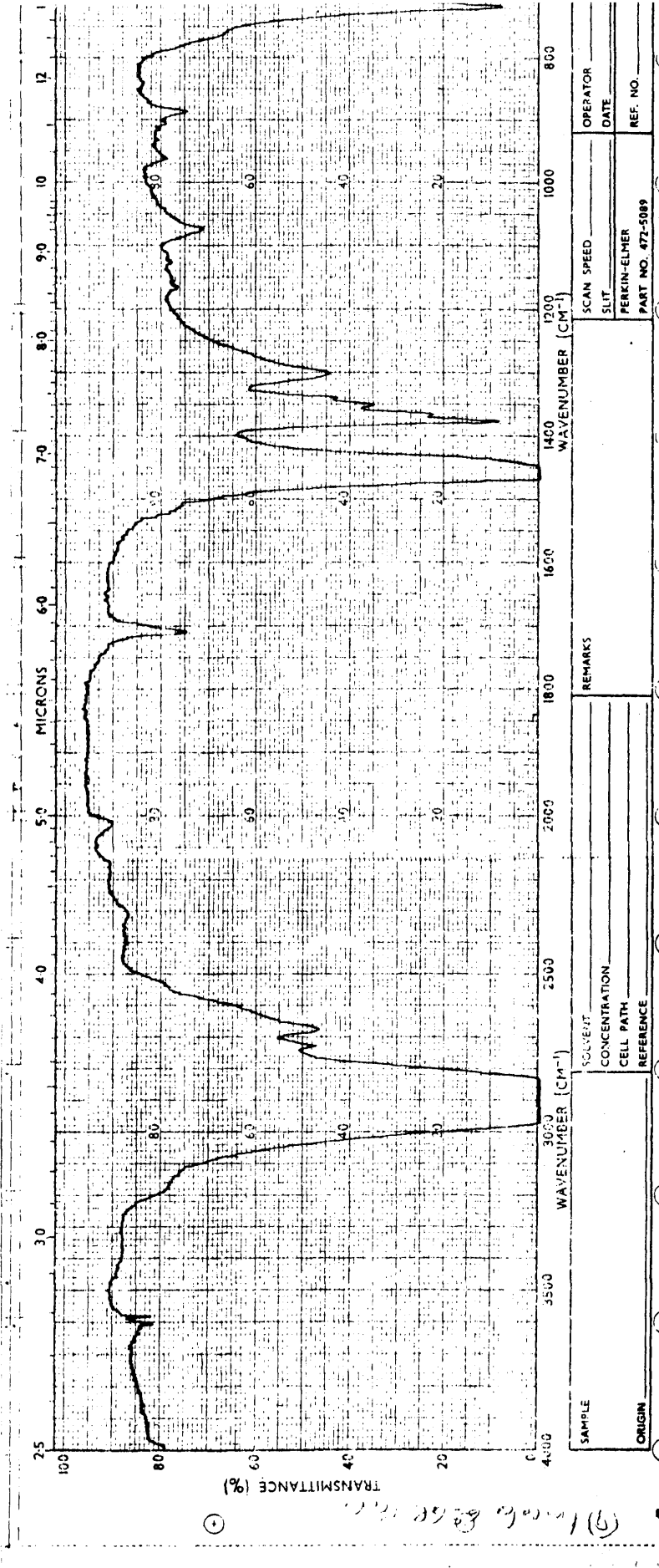


SAMPLE		SOLVENT		REMARKS		OPERATOR	
ORIGIN		CONCENTRATION		SCAN SPEED		DATE	
		CELL PATH		SLIT		REF. NO.	
		REFERENCE		PERKIN-ELMER		PART NO. 472-5089	

Gráfica 85. Estirpe P-5. Cultivo sobre parafinas ramificadas.
 (Control:Gráfica 9).



Gráfica 87. Estirpe P-9. Cultivo sobre parafinas totales.



Gráfica 88. Estirpe P-9. Cultivo sobre parafinas lineales.
(Control:Gráfica 9).

SAMPLE		SCAN SPEED		OPERATOR	
ORIGIN		SLIT		DATE	
SOLVENT		PERKIN-ELMER		REF. NO.	
CONCENTRATION		PART NO. 472-5089			
CELL PATH					
REFERENCE					
REMARKS					

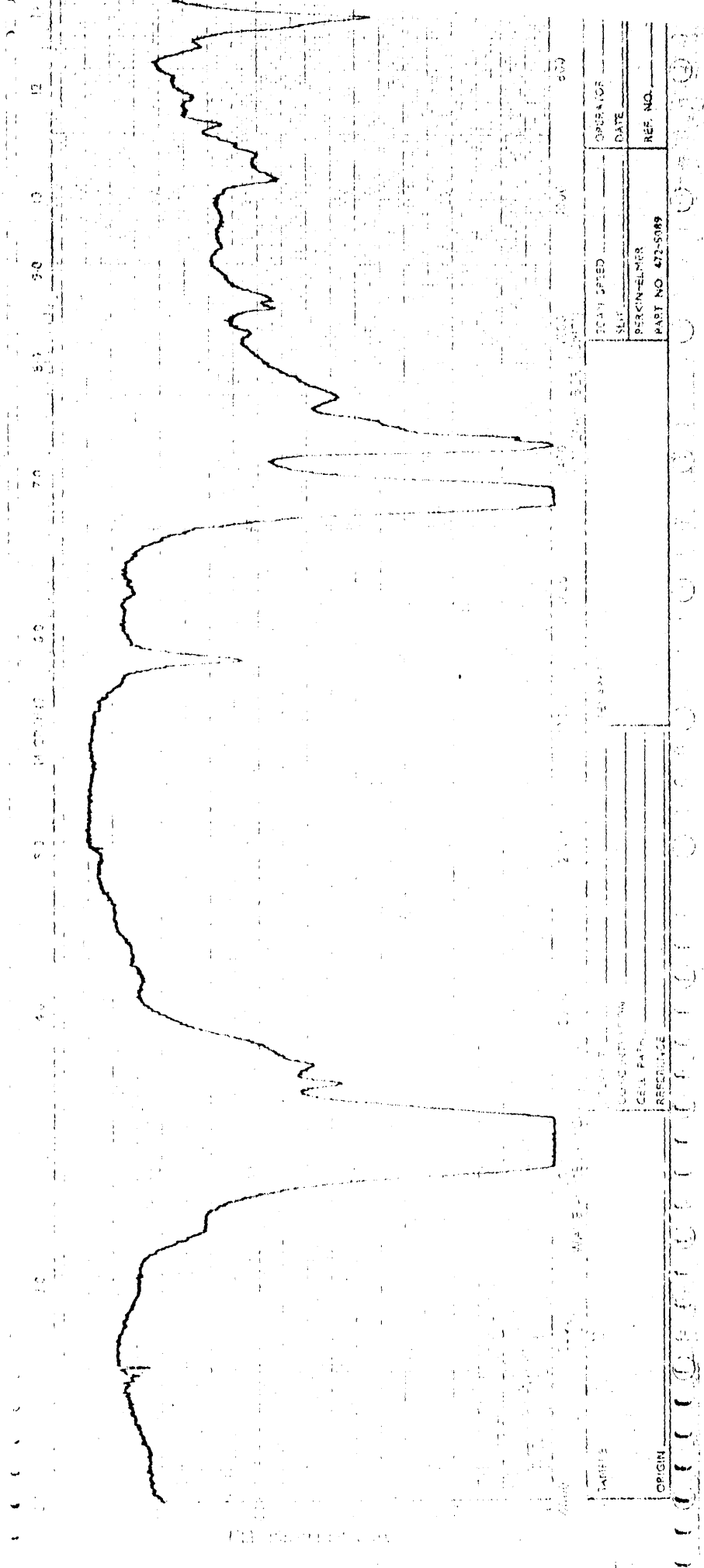
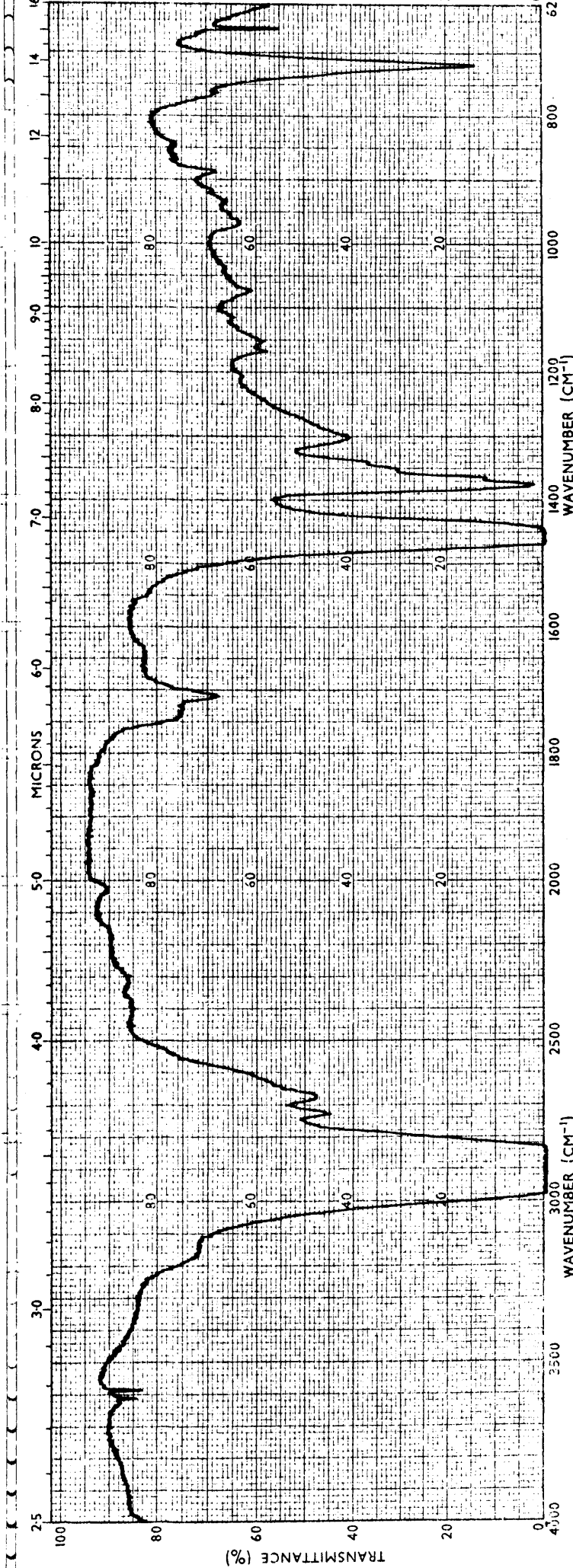


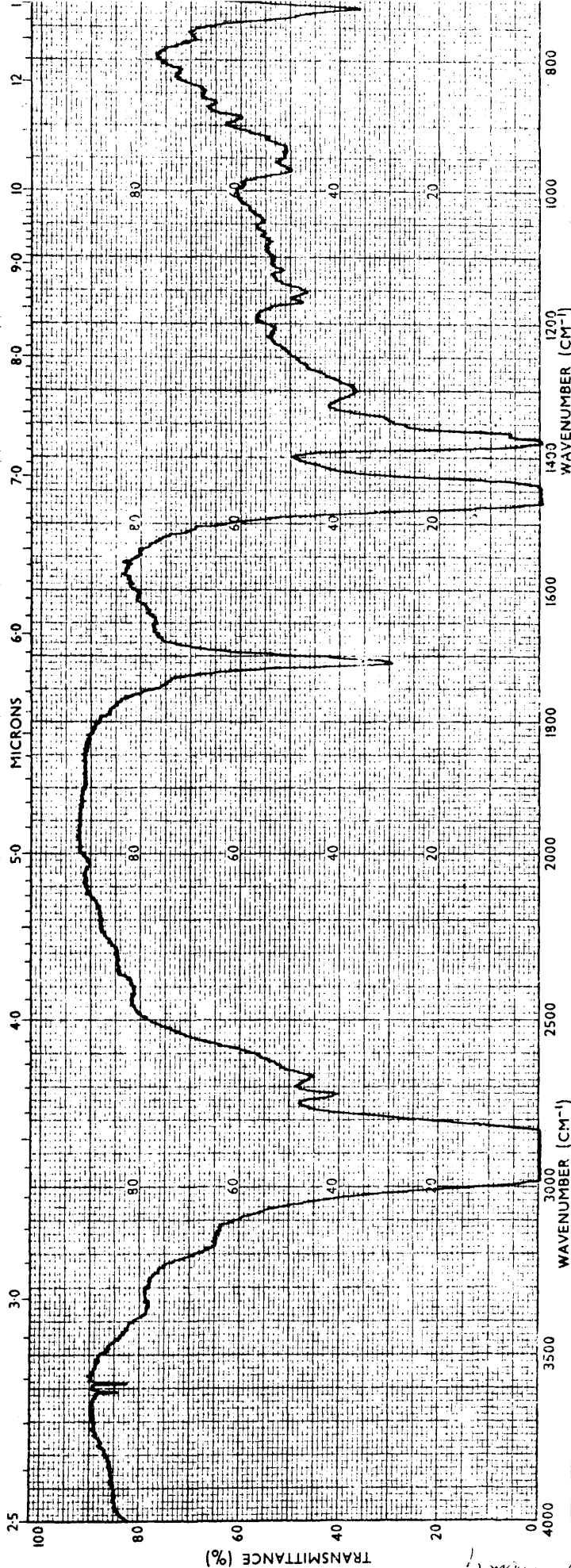
TABLE	OPERATOR
DATE	DATE
SCAN SPEED	REF. NO.
SPLIT	
PERCENTMER	
PART NO 472-5089	
ORIGIN	
CELL PATH	
REFERENCE	

Gráfica 89. Estirpe P-9. Cultivo sobre parafinas ramificadas.
 (Control:Gráfica 9).



SAMPLE	REMARKS		SCAN SPEED	OPERATOR
	CONCENTRATION		SPLIT	DATE
ORIGIN	CELL PATH		PERKIN-ELMER	REF. NO.
	REFERENCE		PART NO. 472-5089	

Gráfica 92. Estirpe G-39. Cultivo sobre parafinas lineales.
 (Control:Gráfica 10.)



SAMPLE _____ SOLVENT _____
 CONCENTRATION _____
 CELL PATH _____
 REFERENCE _____
 ORIGIN _____

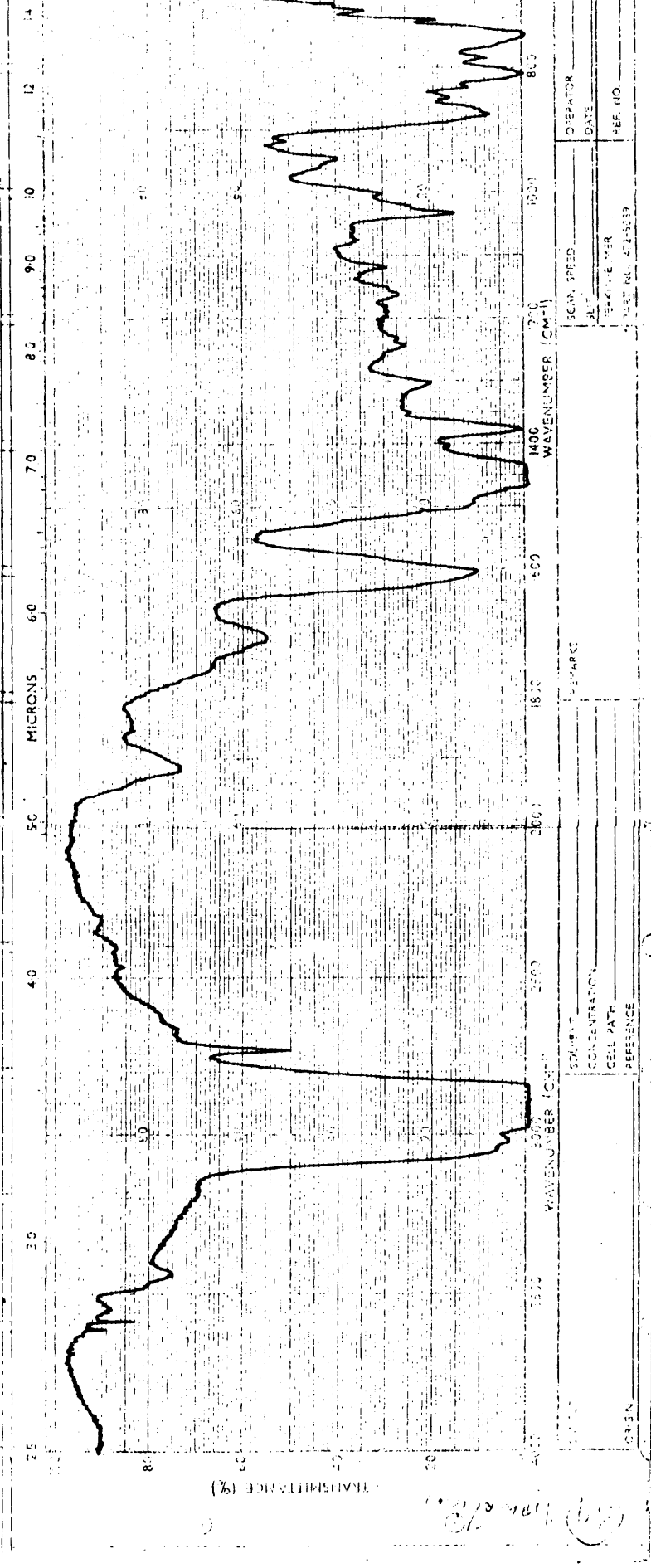
REMARKS _____

SCAN SPEED _____
 SUIT PERKIN-ELMER
 PART NO. 472-5089

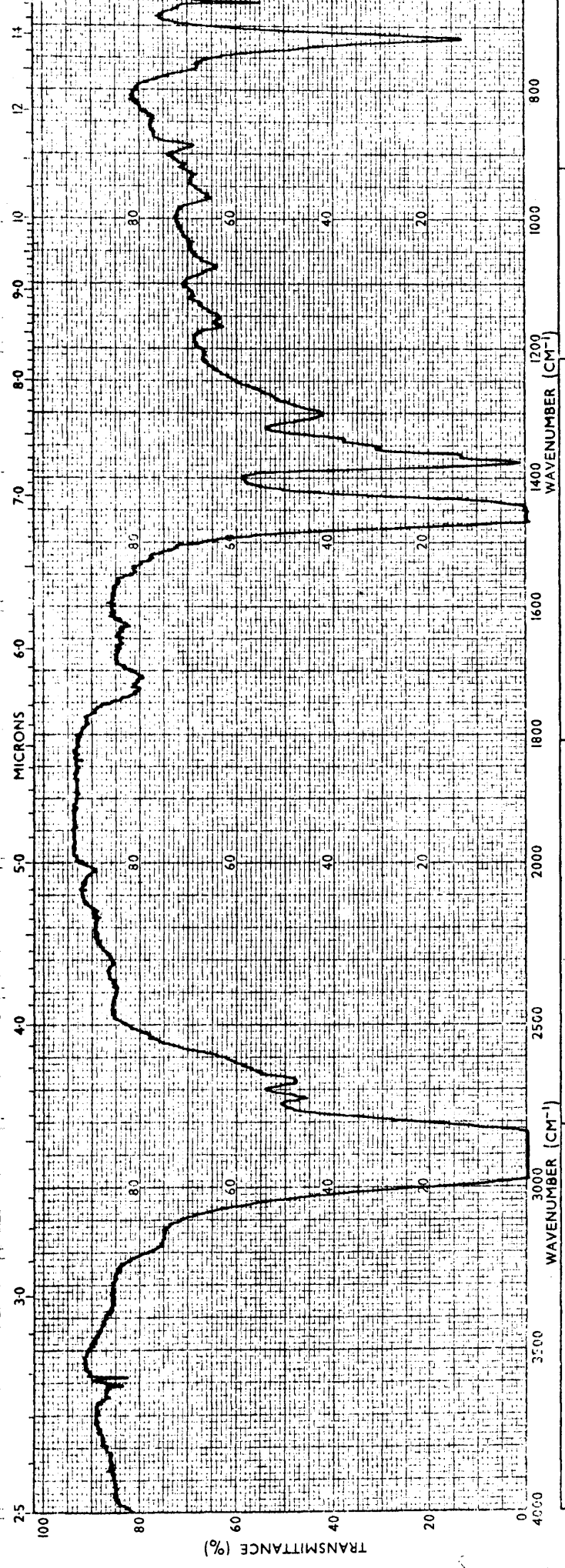
OPERATOR _____
 DATE _____
 REF. NO. _____

Gráfica 93. Estirpe G-39. Cultivo sobre parafinas ramificadas.
 (Control: Gráfica 9).

(87) *[Handwritten signature]*
 (+)

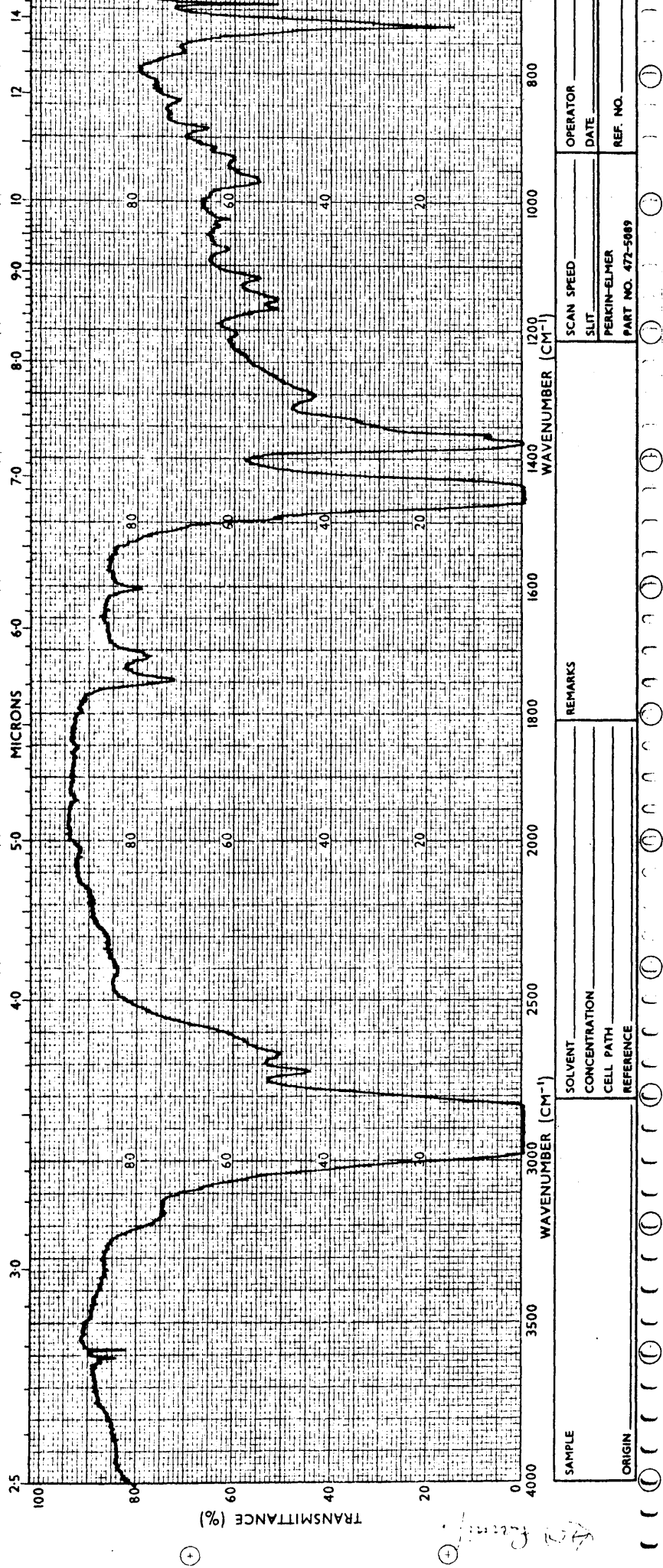


Gráfica 94. Estirpe G-39. Cultivo sobre aromáticos.



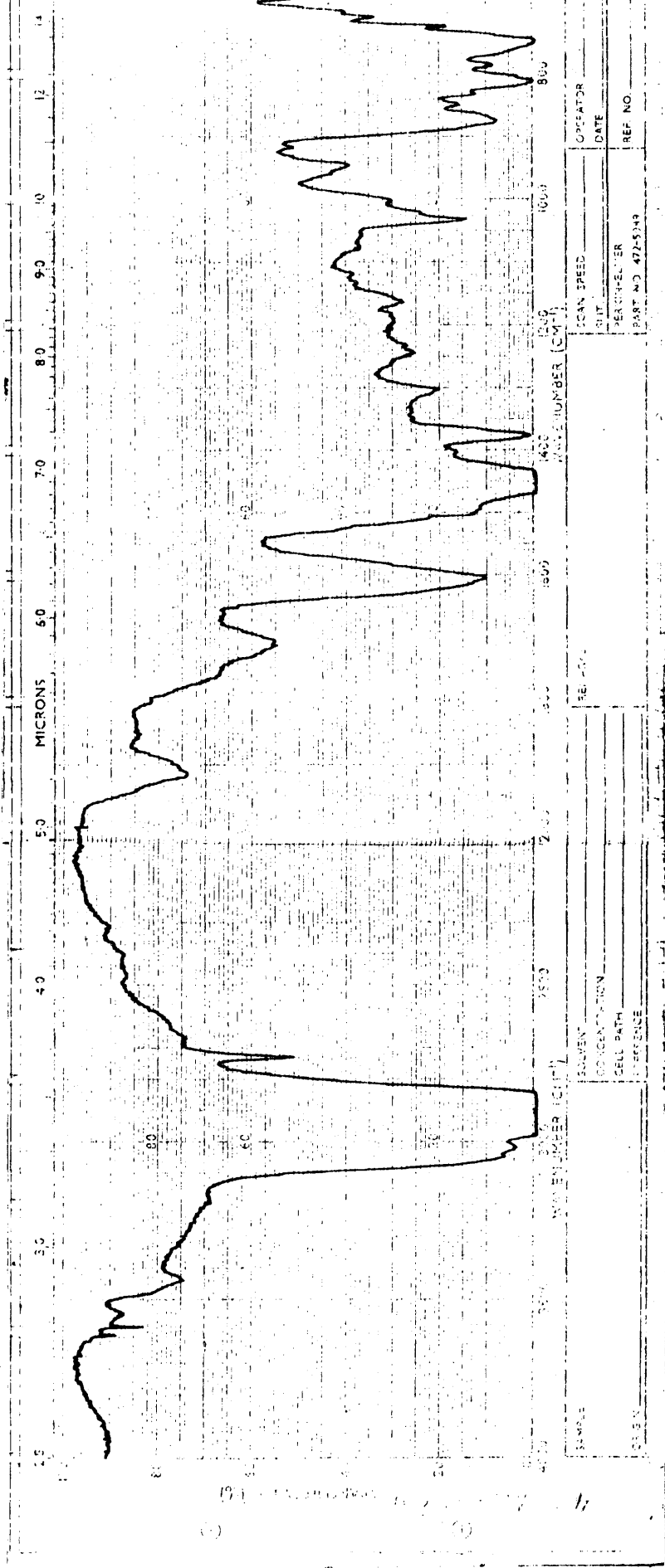
SAMPLE	SOLVENT	CONCENTRATION	CELL PATH	REFERENCE	REMARKS	SCAN SPEED	OPERATOR
						SLIT	DATE
ORIGIN						PERKIN-ELMER	REF. NO.
						PART NO. 477-5089	

Gráfica 95. Estirpe P-40. Cultivo sobre parafinas lineales.
 (Control:Gráfica 10).



SAMPLE		SCAN SPEED		OPERATOR	
CONCENTRATION		SLIT		DATE	
CELL PATH		PERKIN-ELMER		REF. NO.	
REFERENCE		PART NO. 472-5089			
ORIGIN		REMARKS			

Gráfica 96. Estirpe P-40. Cultivo sobre parafinas ramificadas.
(Control:Gráfica 9).



Gráfica 97. Estirpe P-40. Cultivo sobre aromáticos.

OPERATOR	SCAN SPEED	PERCENTILE	REF. NO.
DATE	UNIT	PART NO. 472-5149	
WAVENUMBER (CM⁻¹)			
SOLVENT			
SCATTERATION			
CELL PATH			
REFERENCE			

Región 1400-800: Destaca en esta región el aumento relativo de intensidad que se producen en las bandas correspondientes a parafinas ramificadas (grupos isopropilo) (1150 y 1170) que en algunos casos va confirmado por la disminución de bandas de cadenas lineales (890 cm^{-1}). En efecto, la selectividad de estas estirpes para las n-parafinas es muy acusada (ver más adelante).

En cuanto a otras bandas, aparece muy constante la de 935-40 cm^{-1} .

Región 800-625: Es notable la disminución de intensidad a 720 cm^{-1} así como la aparición de bandas ya mencionadas a 725 y 690 cm^{-1} para la estirpe P-40, como en otros casos sobre la fracción de parafinas ramificadas.

Revisión de los espectros.-

Las estirpes P-4, P-5 y P-9 se comportan de forma muy similar en todos los cultivos. Las bandas a 1590, 1490, 1090, 1015, 775, 770 que aparecen en la P-5 sobre parafinas lineales se deben a una contaminación probable de la muestra, que suponemos debida a un producto aromático del tipo del xileno; no se pudo repetir el cultivo por falta de muestra pero preferimos dejar el espectro porque se puede observar el tipo de oxidación producido.

En todos los cultivos, la oxidación es muy intensa y la utilización de n-parafinas también.

La estirpe G-39 de los valores más altos de crecimiento y oxidación pero a juzgar por las medidas de turbidez en los cultivos, el crecimiento es mayor en parafinas lineales y en cambio la oxidación alcanza valores muy superiores en las ramificadas. Esta estirpe ha sido objeto de un estudio más detallado (ver más adelante).

En cuanto a la estirpe P-40 hay que destacar una vez más la intensidad de la banda a 1605 cm^{-1} que parece relacionada como cabía esperar con las de 725 y 690 cm^{-1} que también en este espectro tienen mayor intensidad que en otros similares.

4.6.2.6. - Resultado de los cultivos de las especies del género Pseudomonas.

Los valores de crecimiento y pH final de estos cultivos se dan en la tabla LXVIII.

Se incluyen en este grupo las estirpes: P-7, K-10, G-11, G-12, A-13, A-14, K-15, G-16, Pa-17, Pa-18, K-22, Pa-23, G-26, G-31, G-33, P-34, P-35, P-37, y P-38. Los espectros correspondientes están representados en las gráficas 98 a 176.

Las bandas diferenciales de estos espectros respecto de los controles, se recogen en la tabla LXIX.

Asignación de bandas y discusión.

Región 3600-3100: Las bandas en esta región son débiles y sólo aparecen algo más intensas en los espectros de parafinas ramificadas y en los de aromáticos, aunque en estos últimos, la forma de la banda y su situación es distinta y parece -- más bien producida por OH carboxílicos que -- alcohólicos.

Por otra parte, la oxidación de las parafinas por las bacterias de este grupo es escasa, si se exceptúan algunas estirpes de Ps.aeruginosa.

Región 3500-2300: Se puede decir lo mismo que para la región anterior. En realidad es una continuación de la banda ancha de tensión de O-H carboxílicos que abarcaría aproximadamente entre 3500 y - 2300 cm^{-1} . Muy clara en los espectros de cultivos sobre aromáticos, en los que confirma que la banda a 1710 debe de ser de ácidos -- carboxílicos. Obsérvese esta banda es el espectro de la gráfica 110, donde la oxidación ha sido muy fuerte.

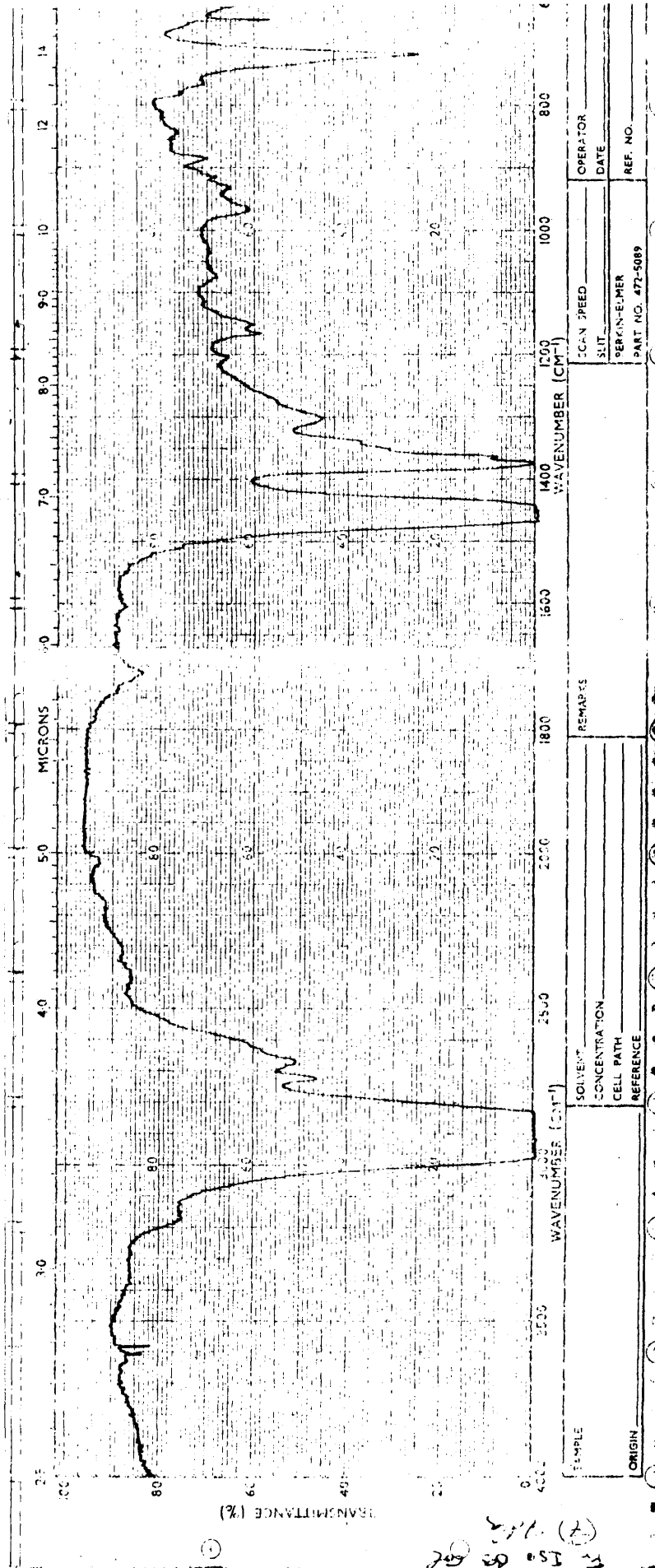
Región 1800-1600: De nuevo como en grupos anteriores, el espectro de esta región es muy característico para todas las estirpes estudiadas en este grupo, con la excepción de las estirpes de Ps. aeruginosa que utilizan y oxidan las parafinas con mayor intensidad que las demás.

Presentan los espectros una banda ancha, no bien definida entre 1700 y 1800 cm^{-1} que se puede situar a 1710 y una absorción -- relativamente importante entre 1600 y 1700 -- con dos bandas ligeramente señaladas hacia -- 1630 y 1605 cm^{-1} .

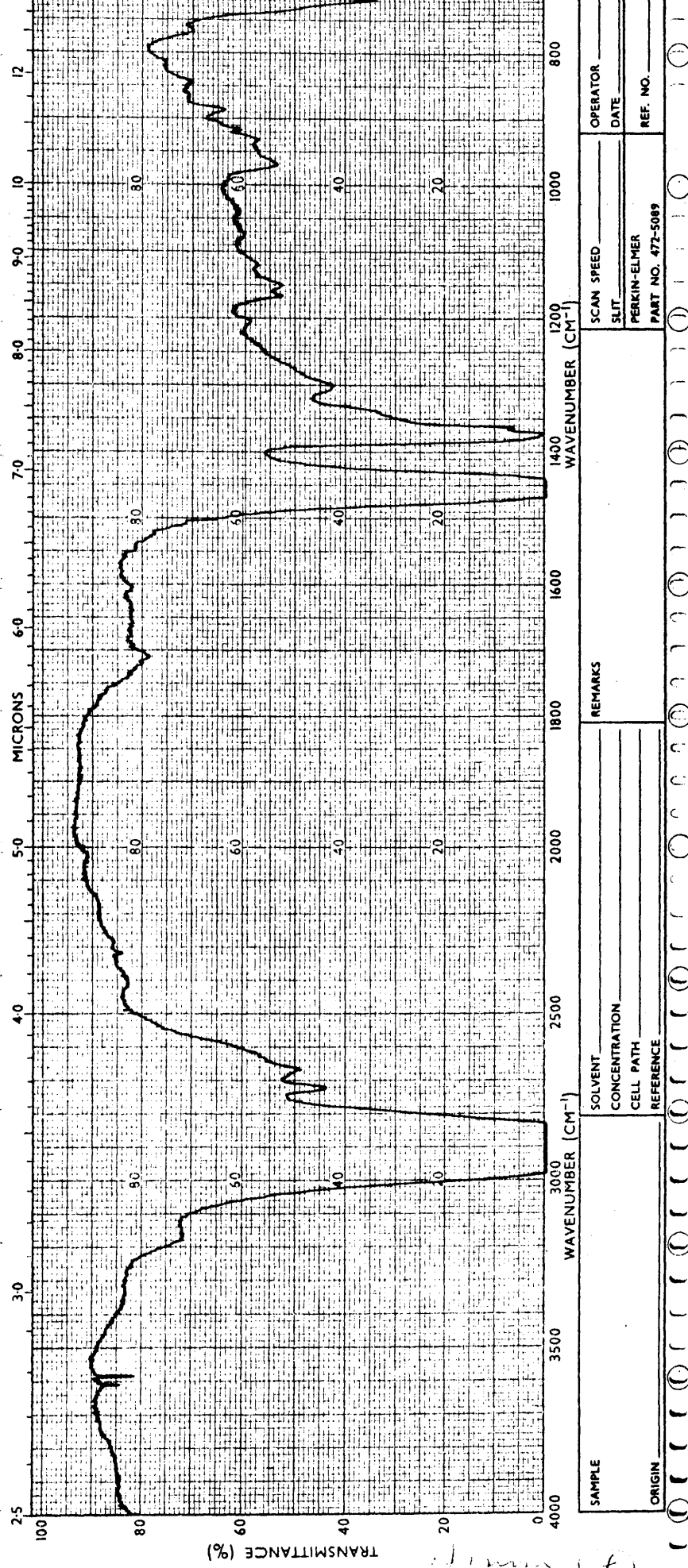
Los cultivos sobre pentadecano se di

Tabla LXVIII: Valores de crecimiento y pH final de los cultivos de estirpes del género Pseudomonas.

Estirpe	Parafinas totales		Parafinas lineales		Parafinas ramificadas		Pentadecano		Tetrametil-pentadecano		Aromáticos	
	Crecimiento	pH. final	Crecimiento	pH. final	Crecimiento	pH. final	Crecimiento	pH. final	Crecimiento	pH. final	Crecimiento	pH. final
P-7	0,020	6,5	-	-	0,030	5,5	0,015	6,5	0,030	6	0,060	6,5
K-10	-	-	-	-	-	-	-	-	0,035	6	0,020	7
G-11	0,015	7	-	-	-	-	-	-	0,015	6	0,060	7
G-12	0,025	7	0,010	7	0,010	7	-	-	-	-	0,020	7
A-13	0,020	7	-	-	-	-	-	-	-	-	0,020	6
A-14	0,015	7	0,010	6	0,030	6	-	-	-	-	0,040	6,5
K-15	0,025	7,5	0,010	7	0,015	6	-	-	0,010	7	0,040	7
G-16	0,010	7	0,020	6,5	0,020	6	-	-	-	-	0,020	6
Pa-17	0,020	7	0,020	6,5	0,060	6	0,010	7	0,010	7	0,020	6,5
Pa-18	0,010	6	0,010	6	0,020	6	0,015	6,5	0,045	6	0,030	6,5
K-22	-	-	0,015	6	0,015	6	0,030	7	0,010	7	0,020	6
Pa-23	-	-	0,015	6	0,010	6	0,020	7	0,030	6	0,040	6,5
G-26	0,020	7	0,010	7	0,010	6	0,035	6	-	-	0,060	6,5
G-31	0,180	6	0,200	5	0,030	7	-	-	-	-	0,040	6,5
G-33	-	-	0,010	7	0,010	7	-	-	-	-	0,030	7
P-34	0,065	6	0,025	5,5	0,070	6	0,010	6,5	0,035	6	0,020	6,5
P-35	0,135	6	0,025	5,5	0,110	6,5	0,015	6,5	0,010	7	0,030	6
P-37	0,030	7	0,010	6,5	0,020	5,5	-	-	-	-	0,060	6,5
P-38	0,280	6	0,020	6	0,020	6	0,015	6,5	0,010	7	0,030	6

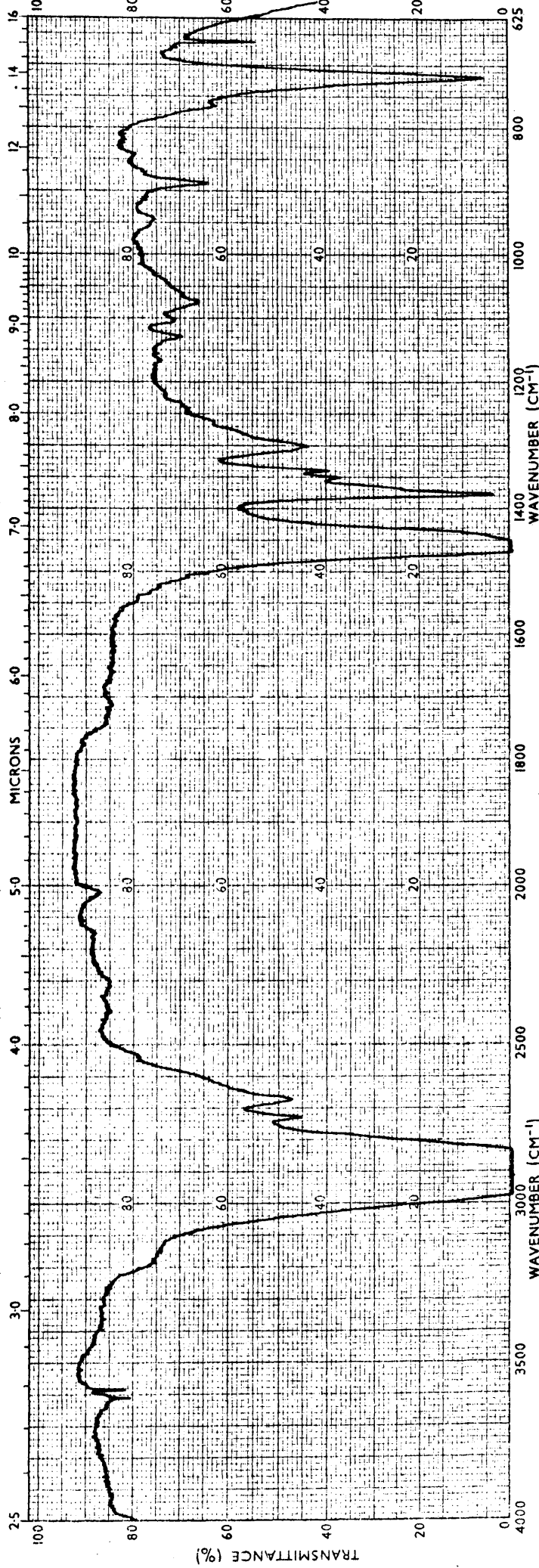


Gráfica 98. Estirpe P-7. Cultivo sobre parafinas totales.



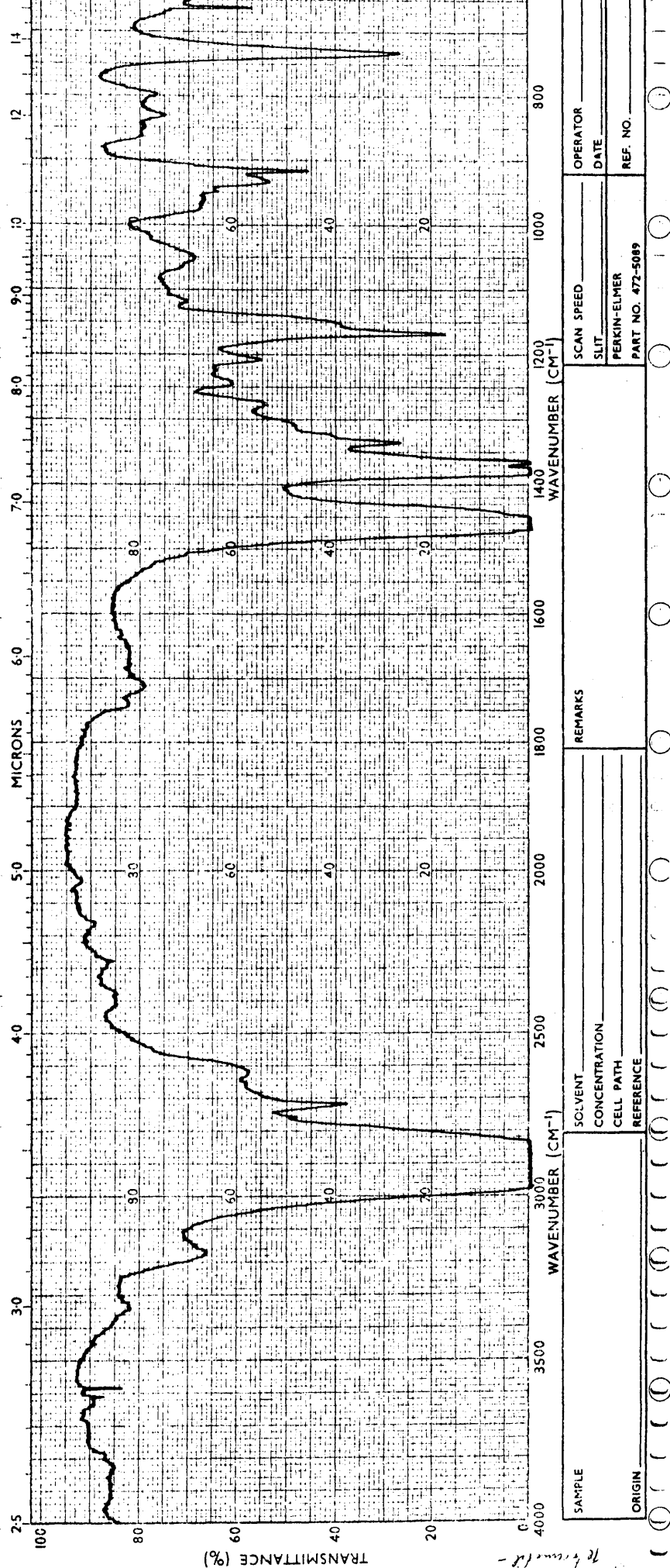
SAMPLE	SOLVENT	SCAN SPEED	OPERATOR
	CONCENTRATION	SLIT	DATE
ORIGIN	CELL PATH	PERKIN-ELMER	REF. NO.
	REFERENCE	PART NO. 472-5089	
REMARKS			

Gráfica 99. Estirpe P-7. Cultivo sobre parafinas ramificadas.
 (Control: Gráfica 9).



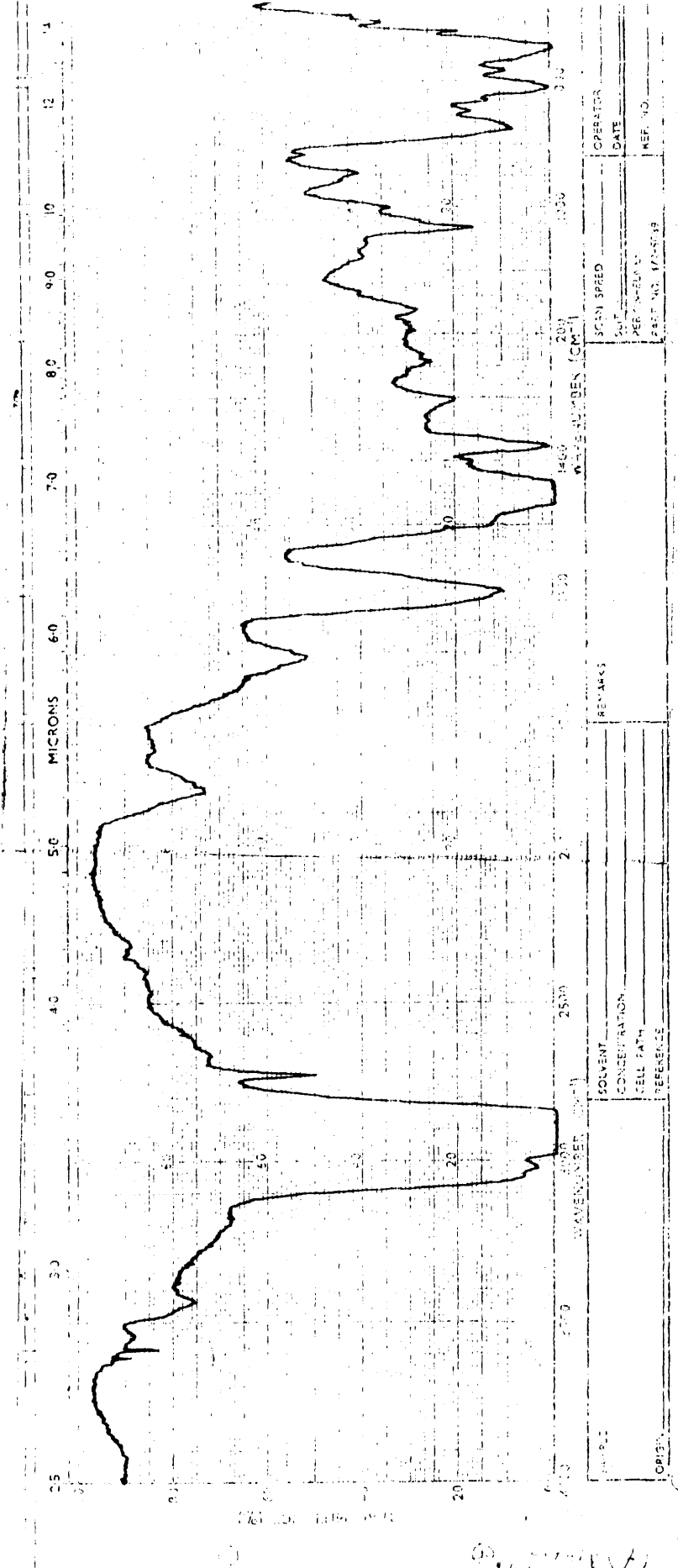
SAMPLE	SOLVENT	REMARKS	SCAN SPEED	OPERATOR
ORIGIN	CONCENTRATION		SLIT	DATE
	CELL PATH		PERKIN-ELMER	REF. NO.
	REFERENCE		PART NO. 472-5089	

Gráfica 100. Estirpe P-7. Cultivo sobre pentadecano.



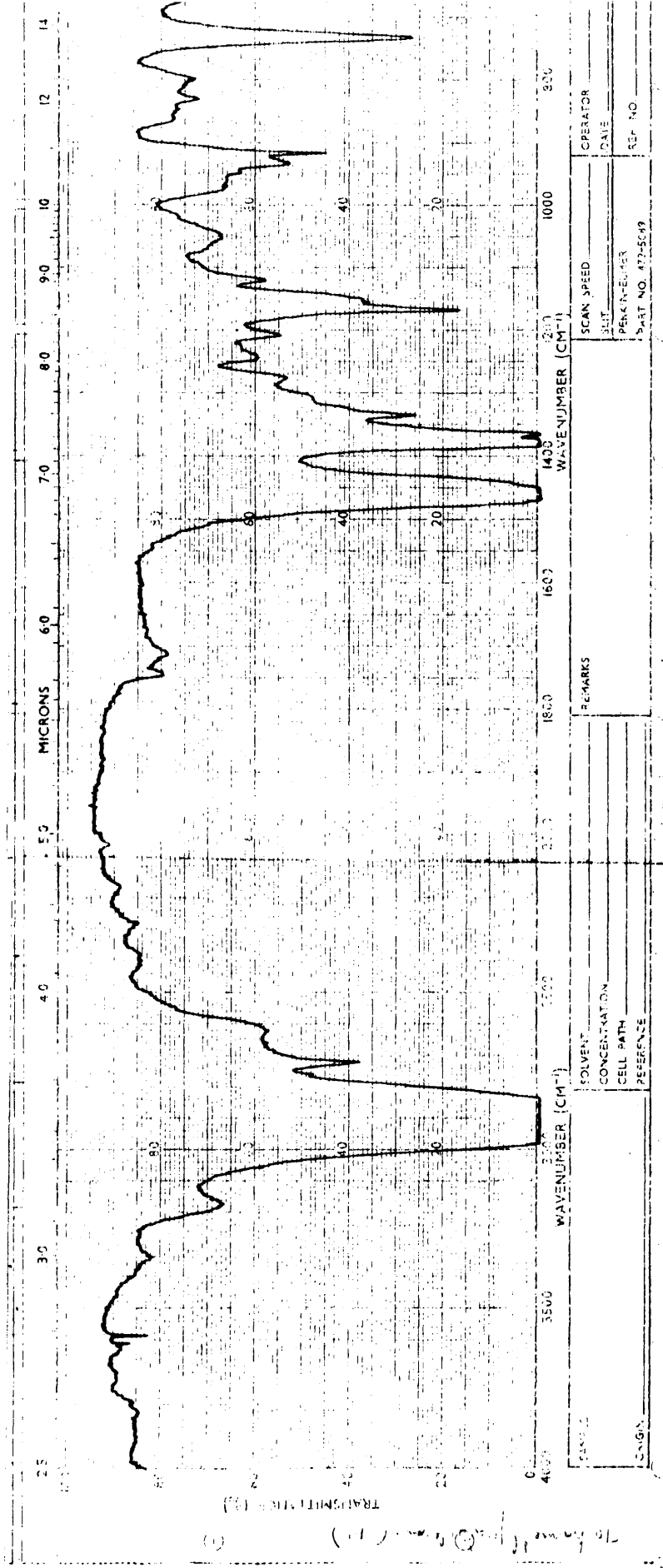
SAMPLE	SOLVENT	SCAN SPEED	OPERATOR
	CONCENTRATION	SLIT	DATE
ORIGIN	CELL PATH	PERKIN-ELMER	REF. NO.
	REFERENCE	PART NO. 472-5089	
REMARKS			

Gráfica 101. Estirpe P-7. Cultivo sobre tetrametilpentadecano.



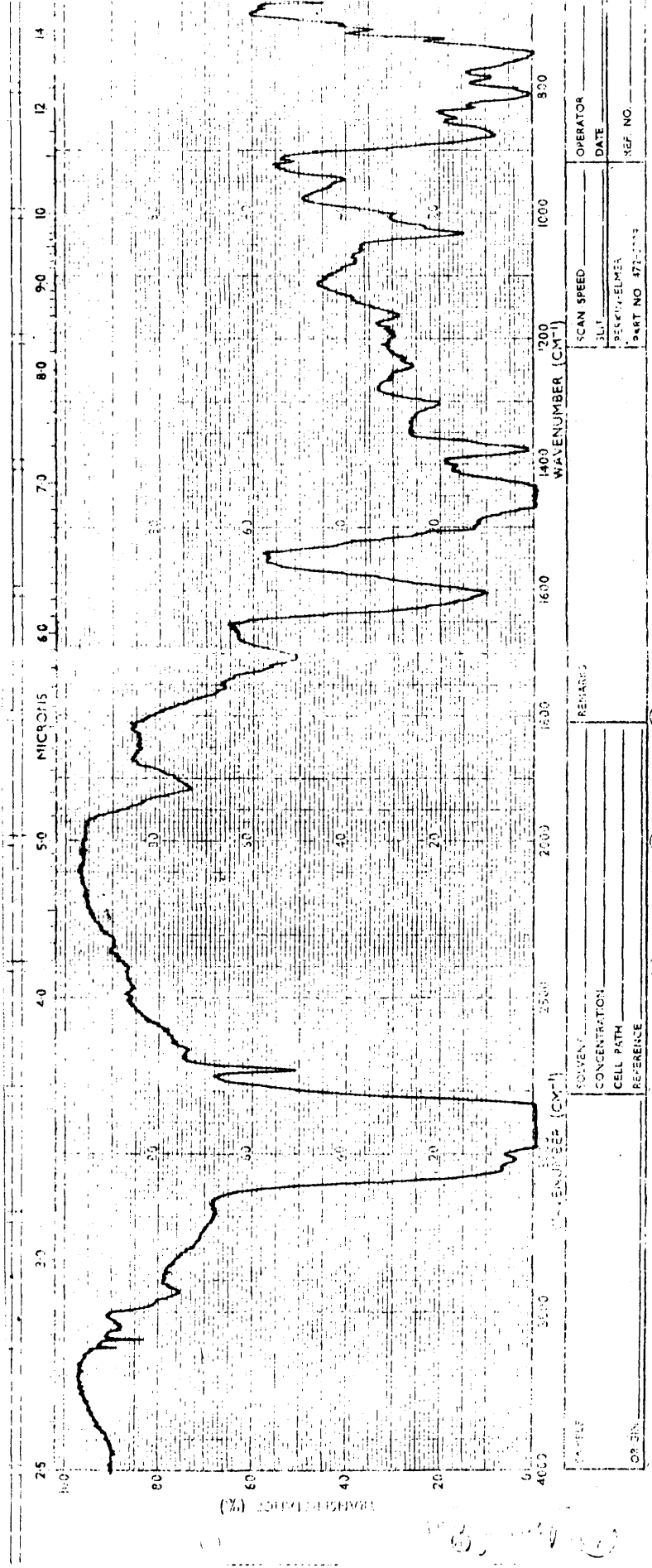
WAVENUMBER (CM-1)	2500	2000	1500	1000
MICRONS	4.0	5.0	6.7	10.0
SAMPLE NO.				
SOLVENT				
CONCENTRATION				
CELL PATH				
REFERENCE				
REMARKS				
SCAN SPEED	200			
DATE				
OPERATOR				
PERFORMER				
LAB. NO.				

Gráfica 102. Estirpe P-7. Cultivo sobre aromáticos.



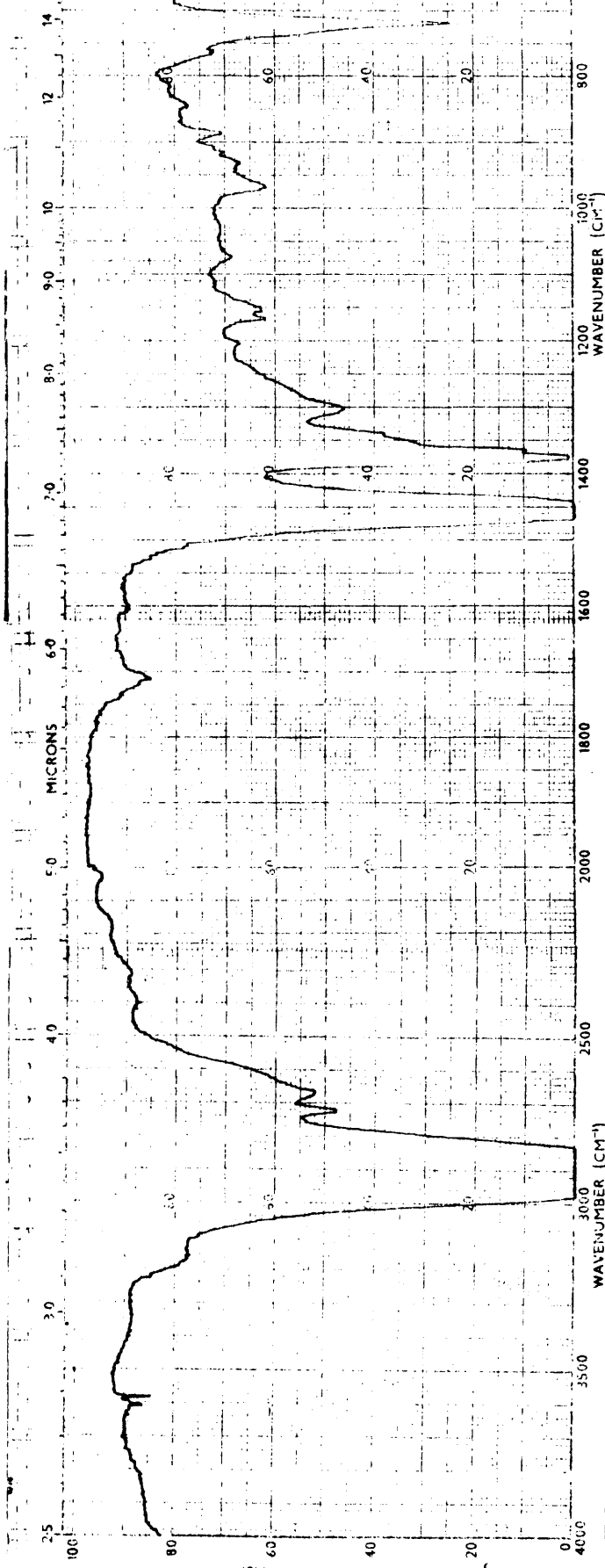
Gráfica 103. Estirpe K-10. Cultivo sobre tetrametilpentadecano.

SOLVENT CONCENTRATION CELL PATH REFERENCE	REMARKS	SCAN SPEED SCIT PERKIN-ELMER PART NO. 473-5049	OPERATOR DATE REP NO
--	---------	---	----------------------------



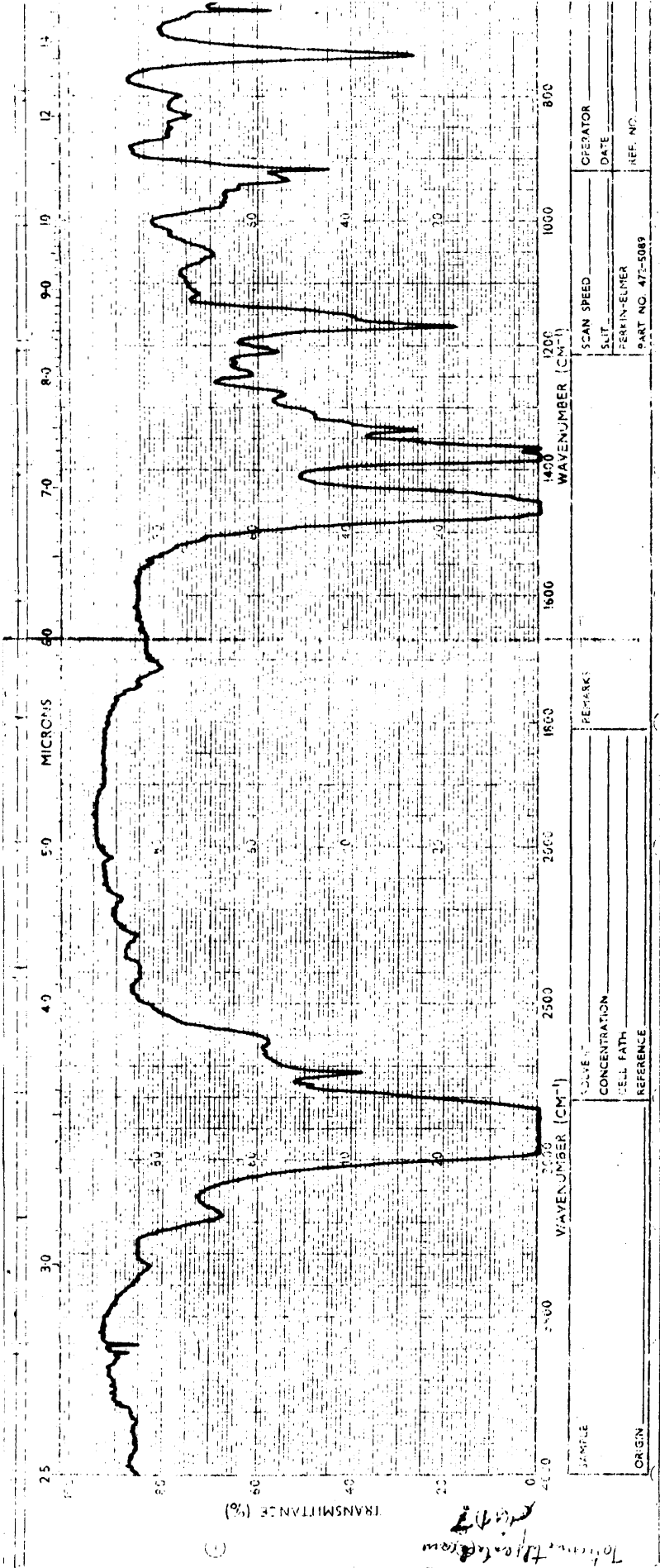
SAMPLE 02-314	SOLVENT CONCENTRATION CELL PATH REFERENCE	REMARKS	SCAN SPEED 3000 PERKIN-ELMER PART NO 471-1111	OPERATOR DATE REF. NO.
------------------	--	---------	--	------------------------------

Gráfica 104. Estirpe K-10. Cultivo sobre aromáticos.

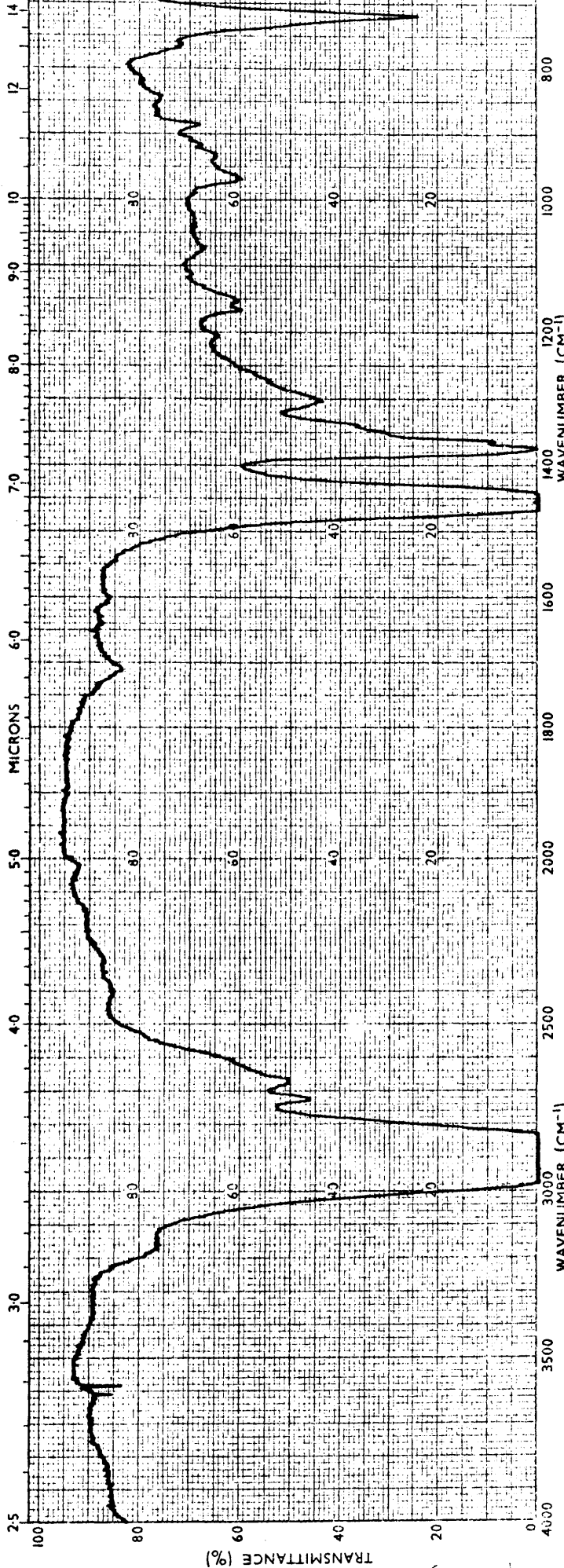


SAMPLE _____
 ORIGIN _____
 SOLVENT _____
 CONCENTRATION _____
 CELL PATH _____
 REFERENCE _____
 REMARKS _____
 PERKIN-ELMER PART No. 457-5001
 SLIT _____
 SCAN SPEED _____

Gráfica 105. Estirpe G-11. Cultivo sobre parafinas totales.

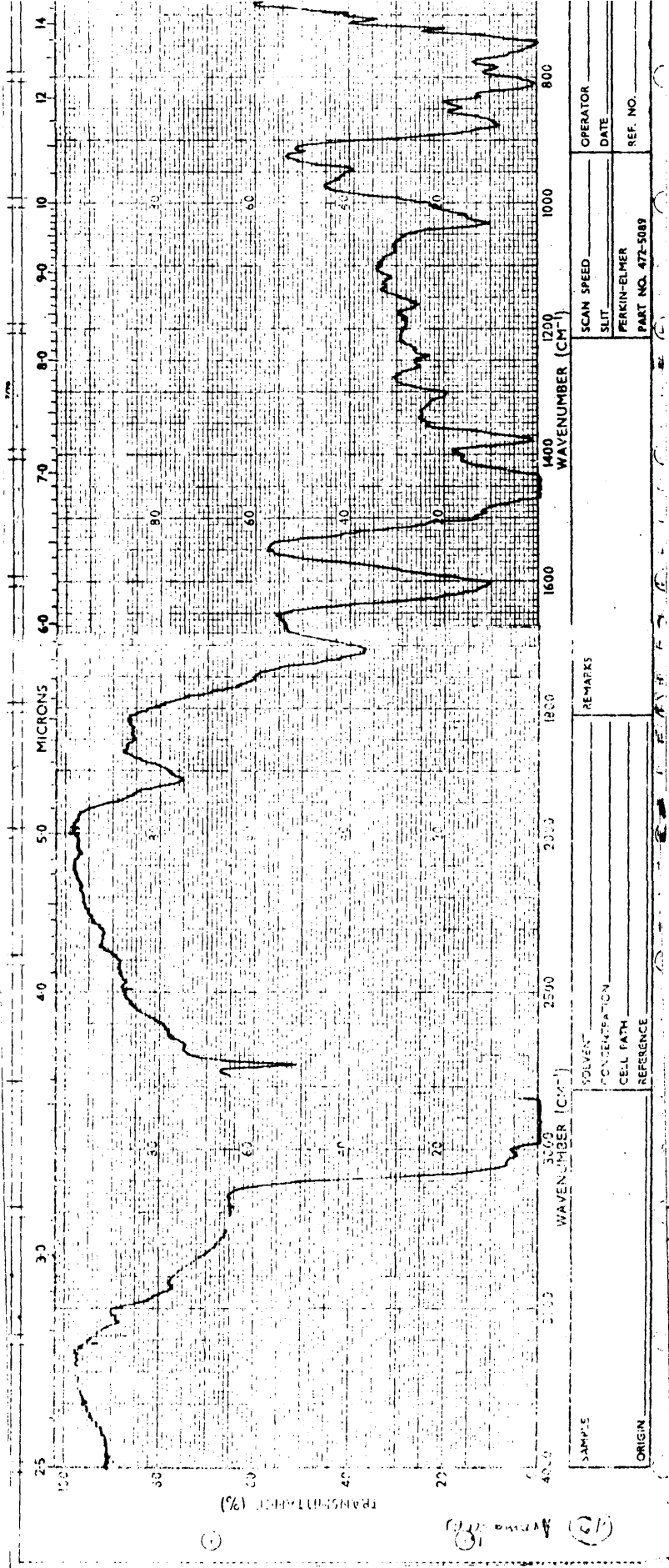


Gráfica 106. Estirpe G-11. Cultivo sobre tetrametilpentadecano.

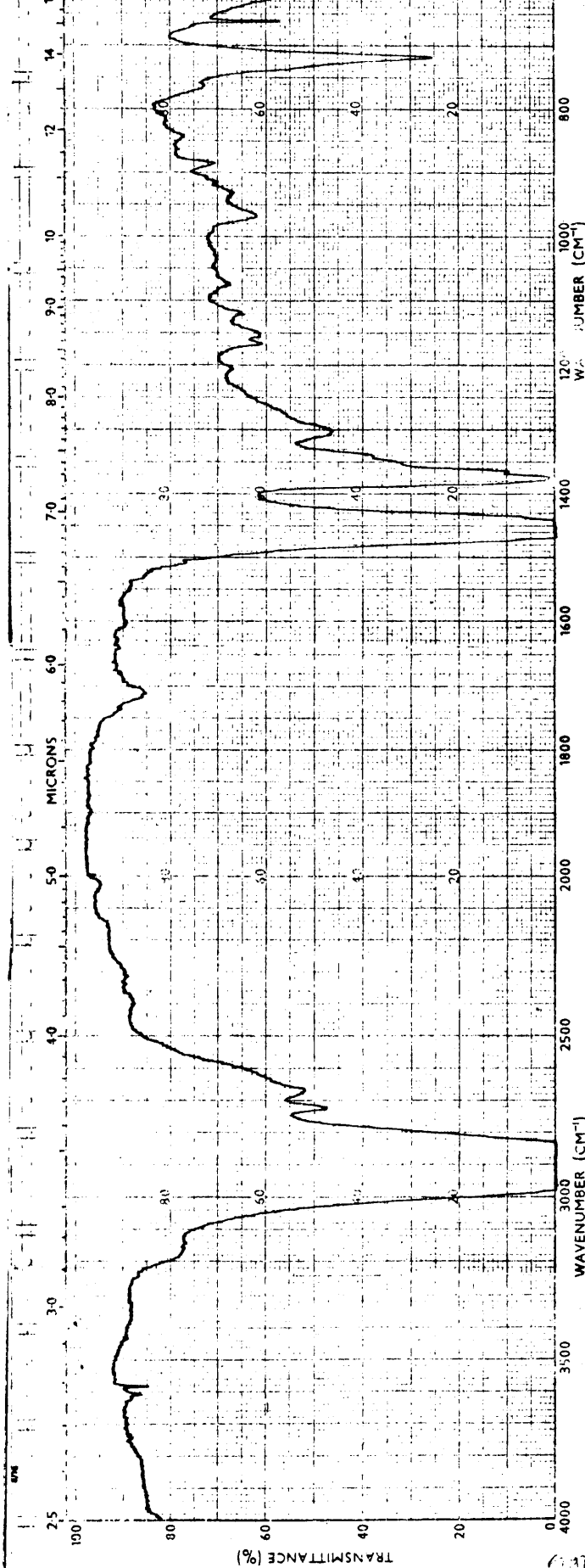


SAMPLE		REMARKS		OPERATOR	
ORIGIN		CONCENTRATION		DATE	
CELL PATH		REFERENCE		SCAN SPEED	
PERKIN-ELMER		PART NO. 472-5089		SLIT	

Gráfica 108. Estirpe G-12. Cultivo sobre parafinas totales.

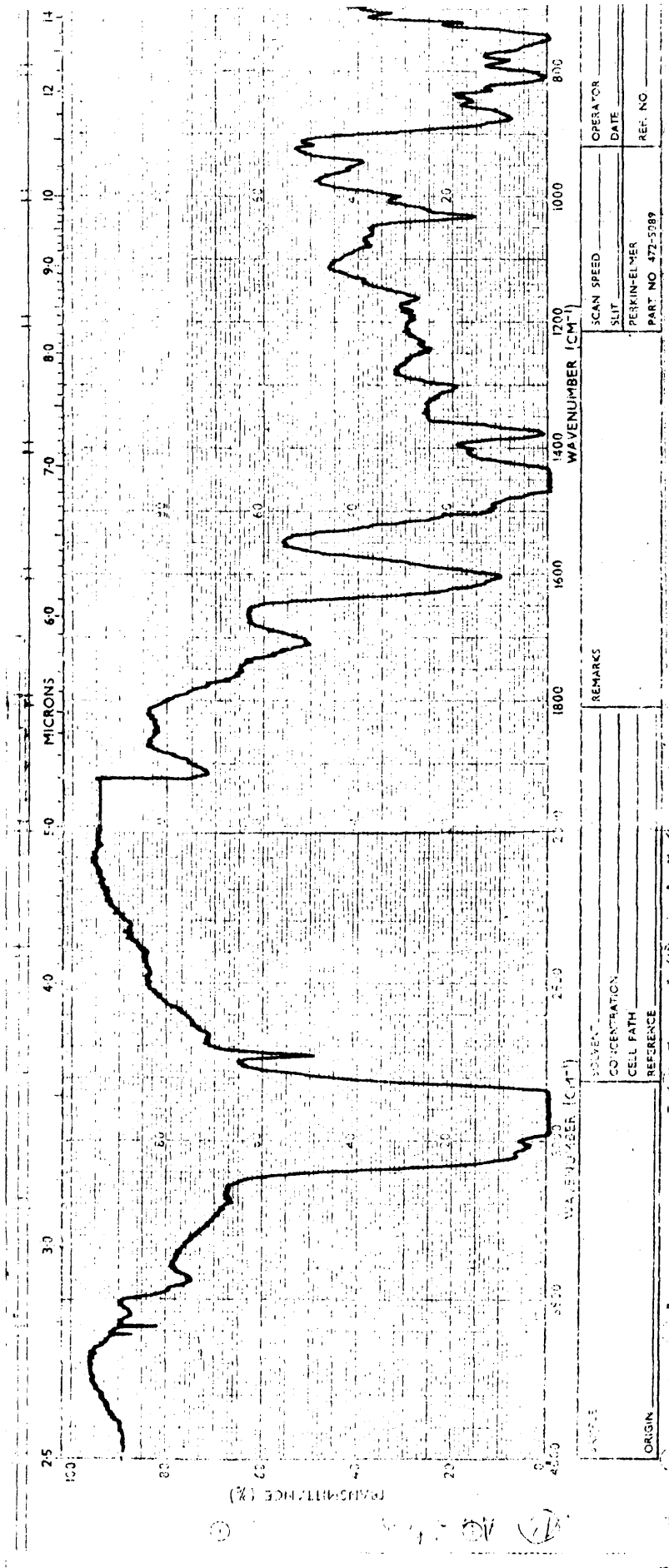


Gráfica 110. Estirpe G-12. Cultivo sobre aromáticos.



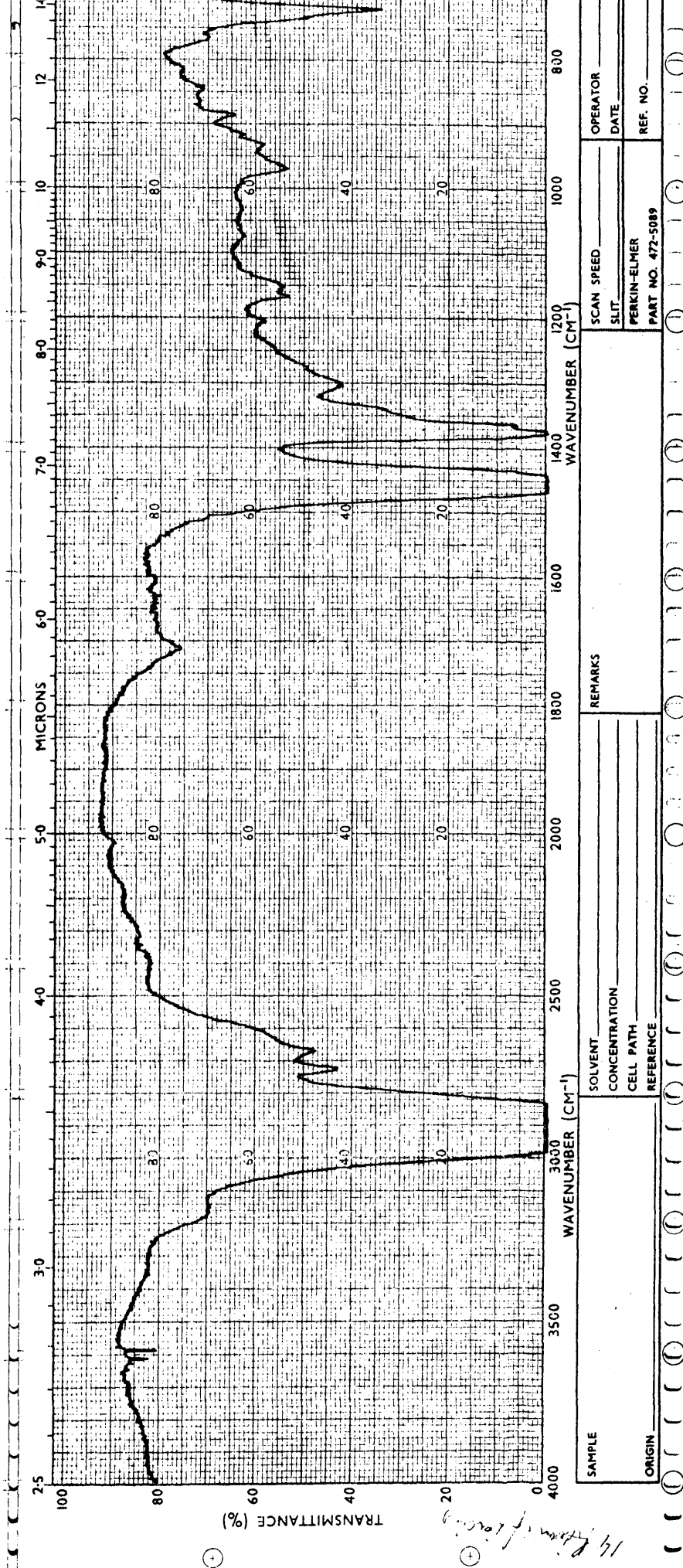
SAMPLE _____
 ORIGIN _____
 SOLVENT _____
 CONCENTRATION _____
 CELL PATH _____
 REFERENCE _____
 REMARKS _____
 WAVELENGTH (CM⁻¹) _____
 WAVELENGTH (MICRONS) _____
 SCAN SPEED _____
 SLIT _____
 PERKIN-ELMER
 PART No. 457-5001

Gráfica 111. Estirpe A-13. Cultivo sobre parafinas totales.



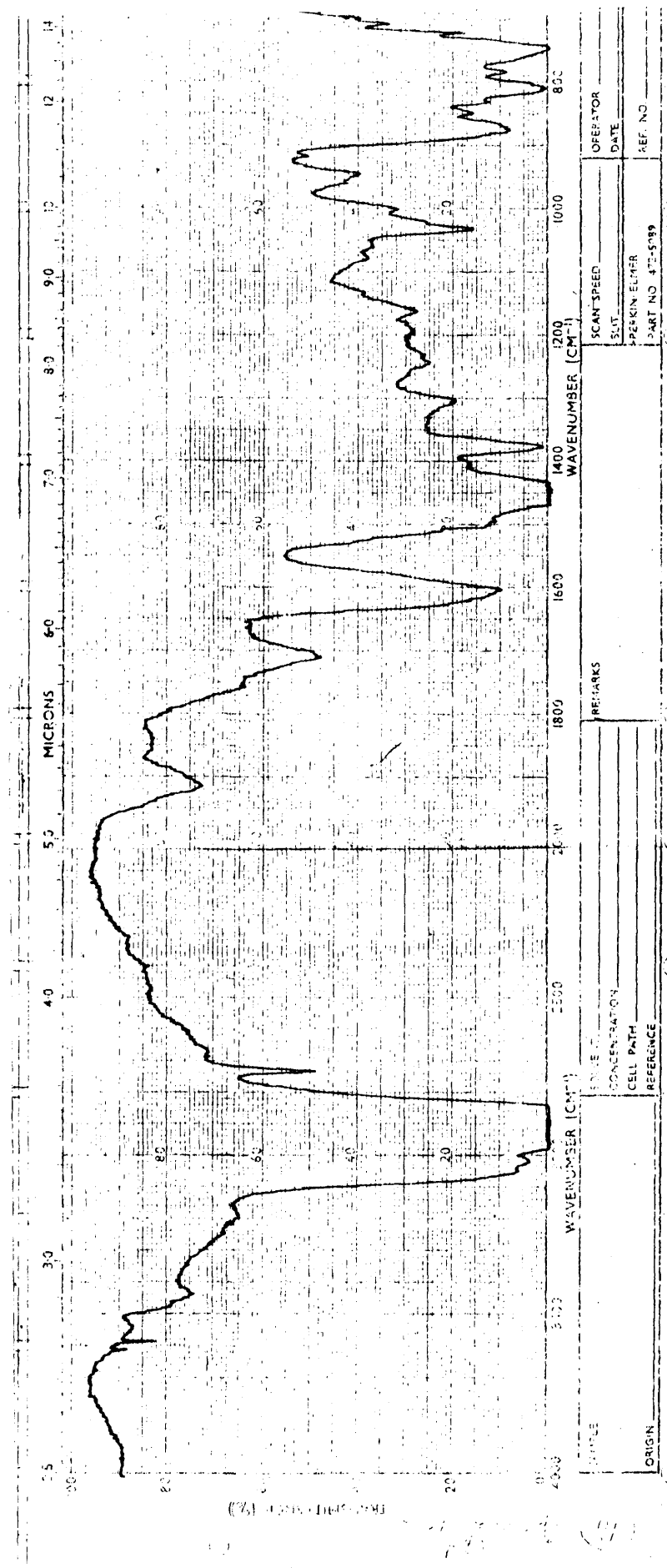
ORIGIN	PERKIN-ELMER	OPERATOR
CONCENTRATION	PERKIN-ELMER	DATE
CELL PATH	PART NO 472-5789	REF. NO
REFERENCE		
REMARKS	SCAN SPEED	
	SLIT	

Gráfica 112. Estirpe A-13. Cultivo sobre aromáticos.



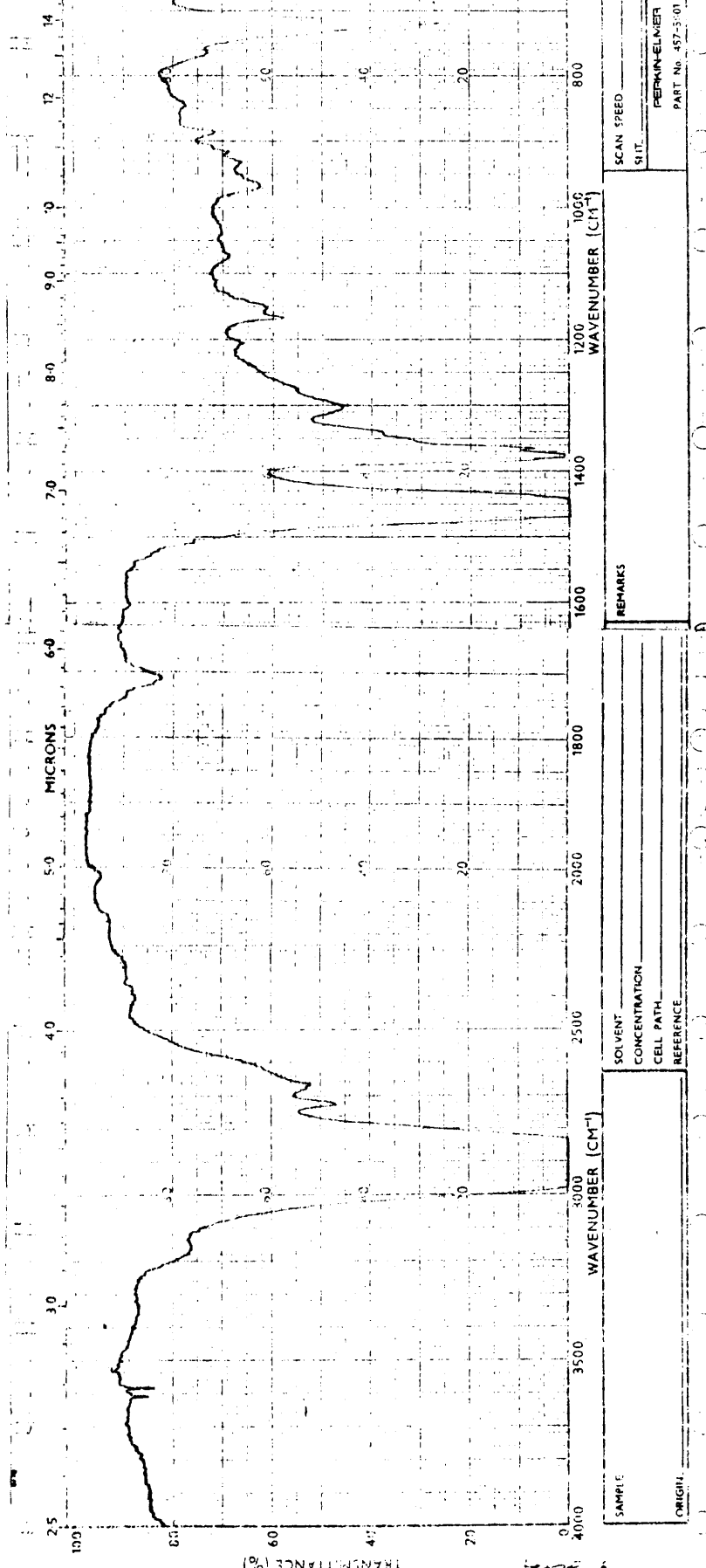
SAMPLE	SOLVENT	REMARKS	SCAN SPEED	OPERATOR
	CONCENTRATION		SLIT	DATE
ORIGIN	CELL PATH		PERKIN-ELMER	REF. NO.
	REFERENCE		PART NO. 472-5089	

Gráfica 114. Estirpe A-14. Cultivo sobre parafinas ramificadas.
(Control:Gráfica 9).



ORIGIN	SCANNING SPEED	OPERATOR
CONCENTRATION	SLOT	DATE
CELL PATH	PERKIN-ELMER	REF. NO.
REFERENCE	PART NO. 472-5789	

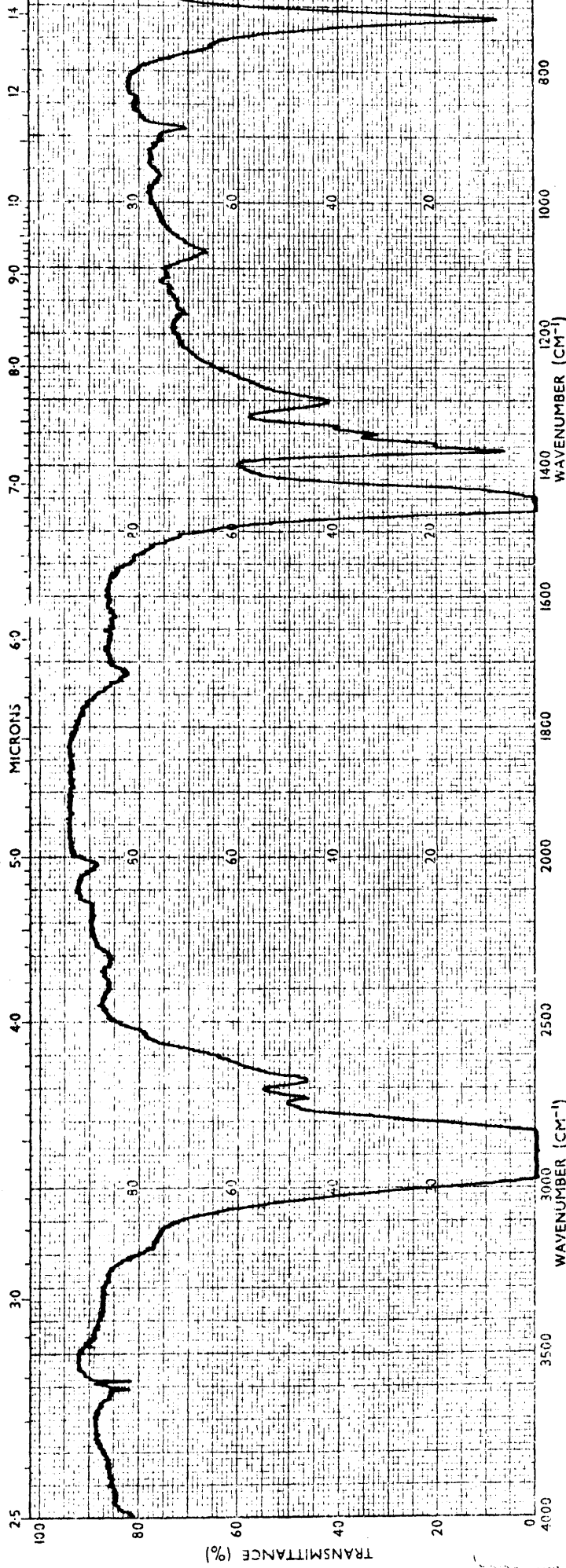
Gráfica 115. Estirpe A-14. Cultivo sobre aromáticos.



SAMPLE _____
 ORIGIN _____
 SOLVENT _____
 CONCENTRATION _____
 CELL PATH _____
 REFERENCE _____
 REMARKS _____
 PERKIN-ELMER
 PART No. 457-5101
 SCAN SPEED _____
 S.I.T. _____

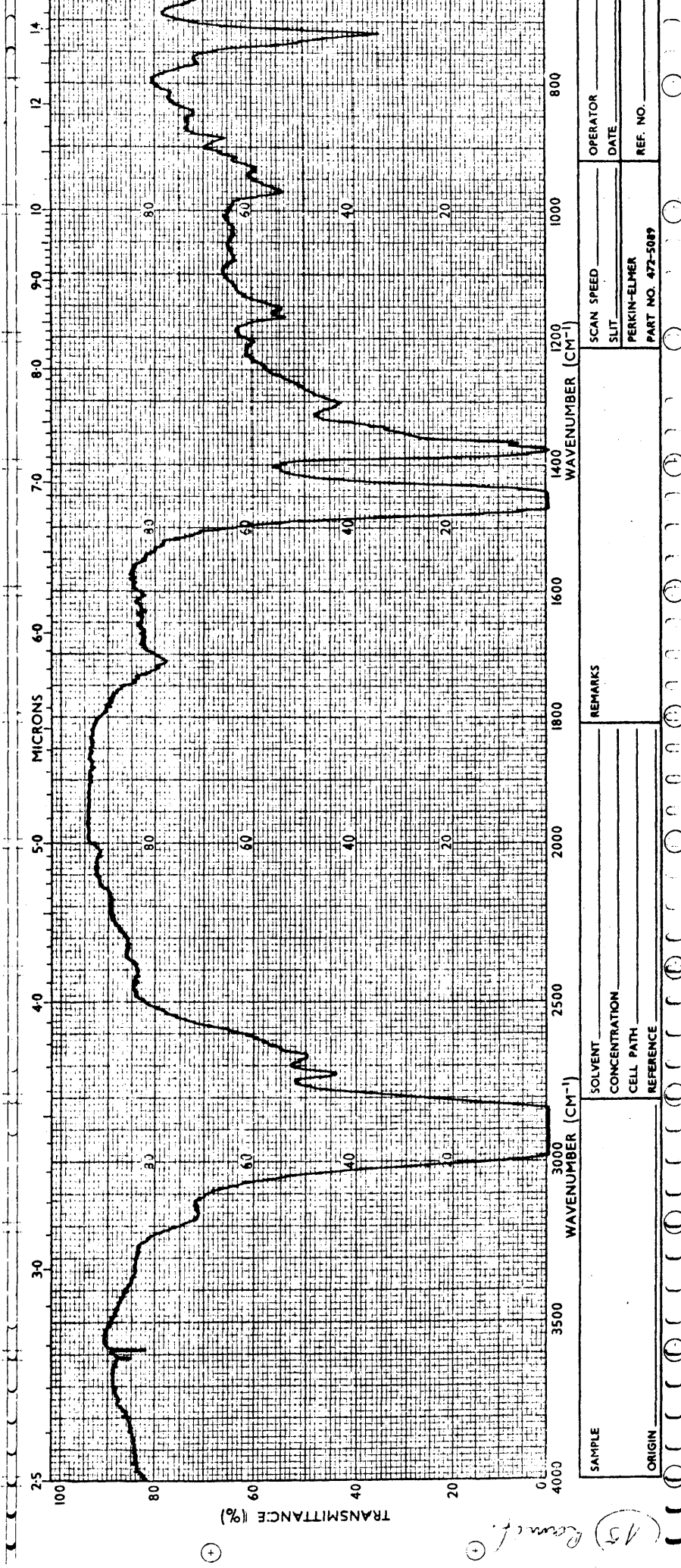
Gráfica 116. Estirpe K-15. Cultivo sobre parafinas totales.

15
 15000.60
 15000.60



SAMPLE	SOLVENT	REMARKS	OPERATOR
ORIGIN	CONCENTRATION		DATE
	CELL PATH		PERKIN-ELMER
	REFERENCE		PART NO. 472-5089
			SCAN SPEED
			SLIT

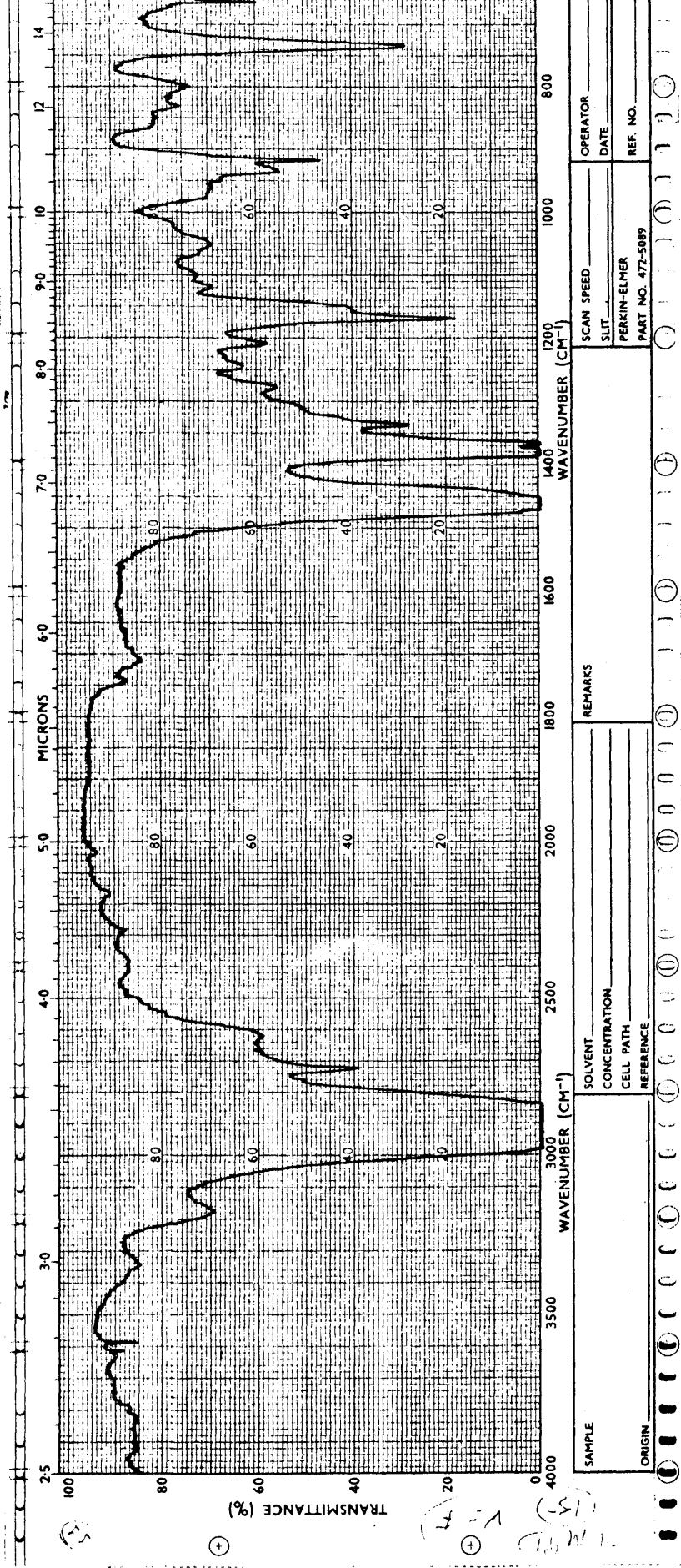
Gráfica 117. Estirpe K-15. Cultivo sobre parafinas lineales.
(Control:Gráfica 9).



SAMPLE	SOLVENT	REMARKS	SCAN SPEED	OPERATOR
	CONCENTRATION		SLIT	DATE
ORIGIN	CELL PATH		PERKIN-ELMER	REF. NO.
	REFERENCE		PART NO. 472-5089	

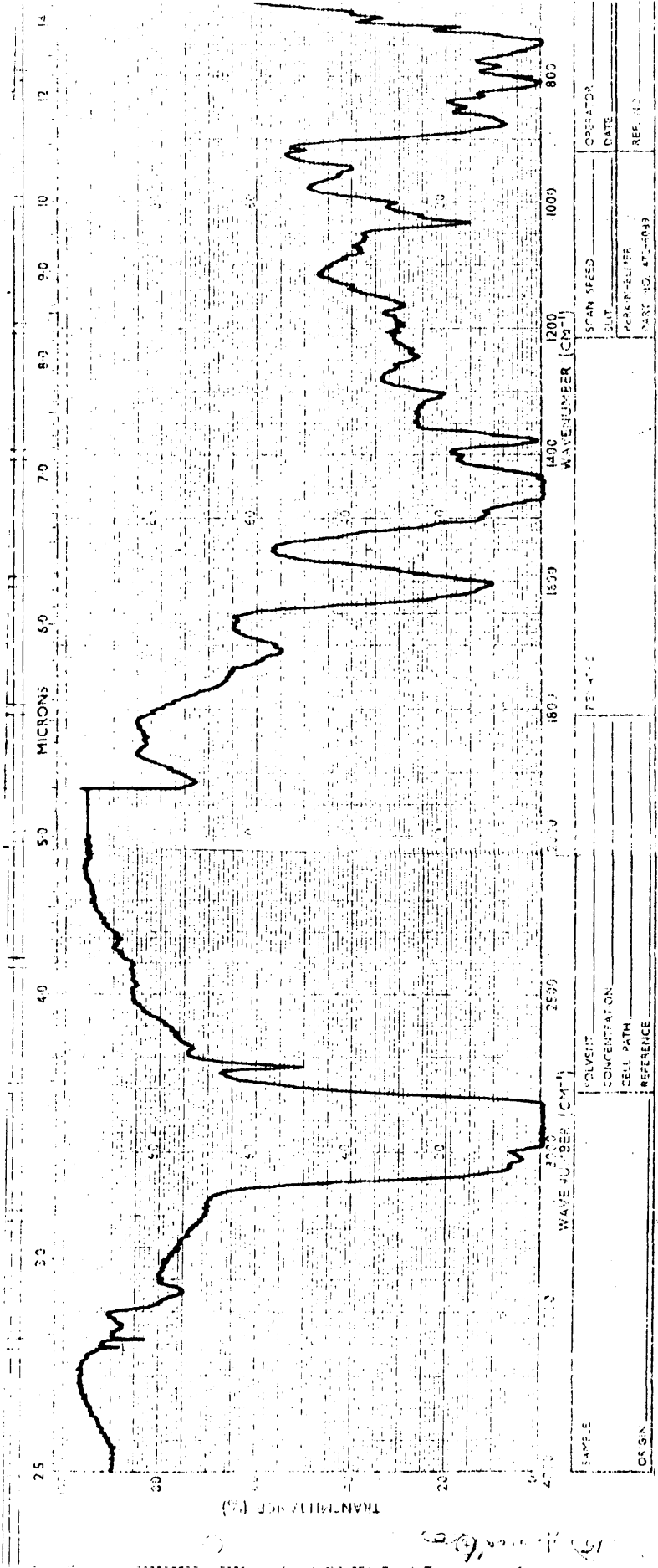
Gráfica 118. Estirpe K-15. Cultivo sobre parafinas ramificadas.
(Control:Gráfica 9).

(15) Recm. f.

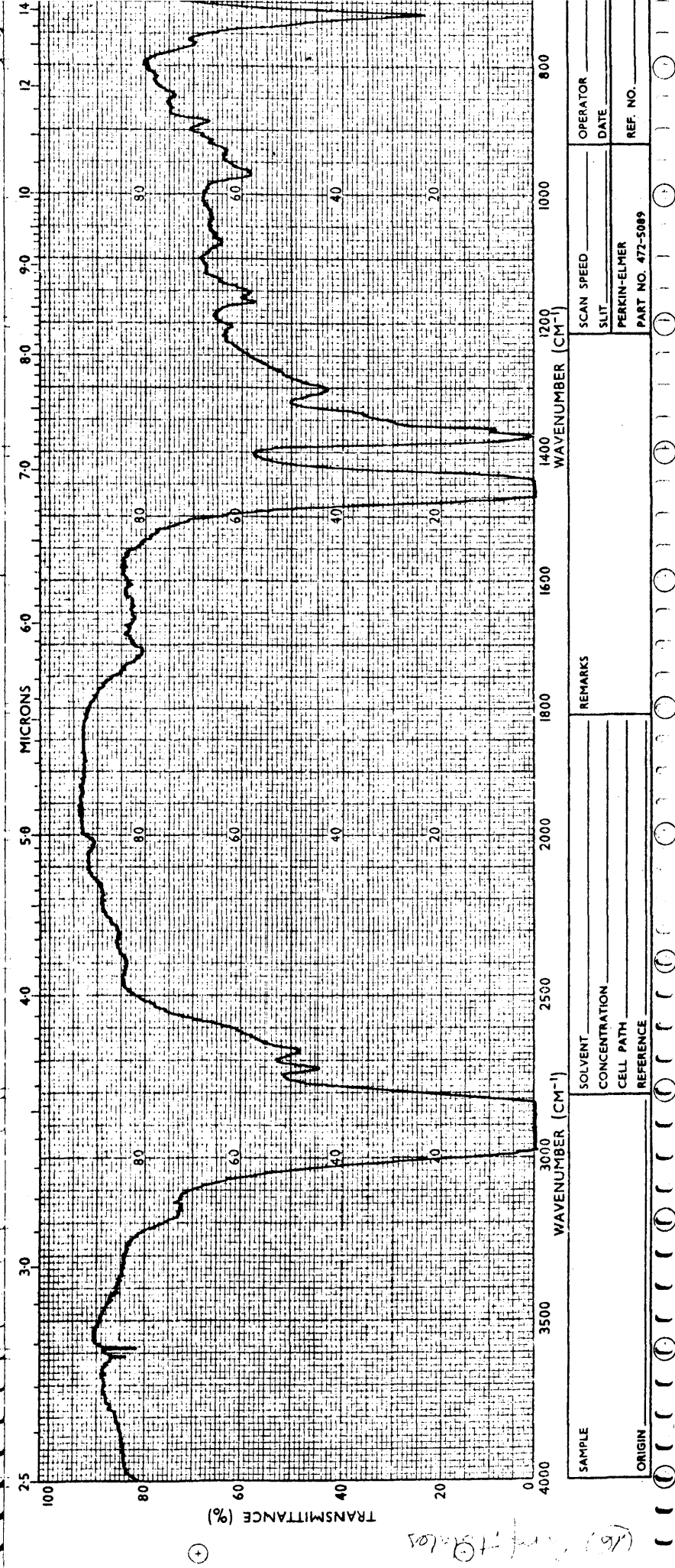


SAMPLE		REMARKS	
ORIGIN		SOLVENT	
		CONCENTRATION	
		CELL PATH	
		REFERENCE	
SCAN SPEED	OPERATOR	PERKIN-ELMER	
SPLIT	DATE	PART NO. 472-5089	
		REF. NO.	

Gráfica 119. Estirpe K-15. Cultivo sobre tetrametilpentadecano.



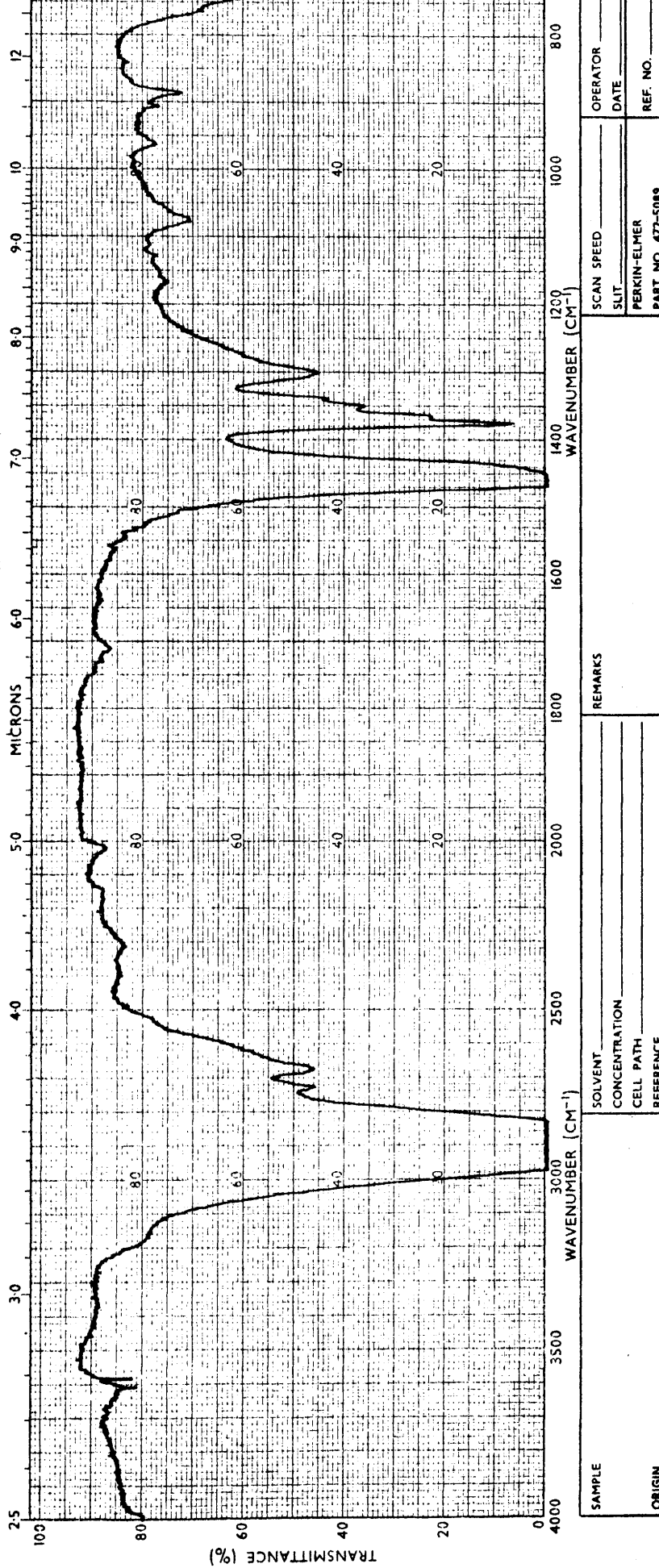
Gráfica 120. Estirpe K-15. Cultivo sobre aromáticos.



SAMPLE	SOLVENT	SCAN SPEED	OPERATOR
ORIGIN	CONCENTRATION	SLIT	DATE
	CELL PATH	PERKIN-ELMER	REF. NO.
	REFERENCE	PART NO. 472-5089	

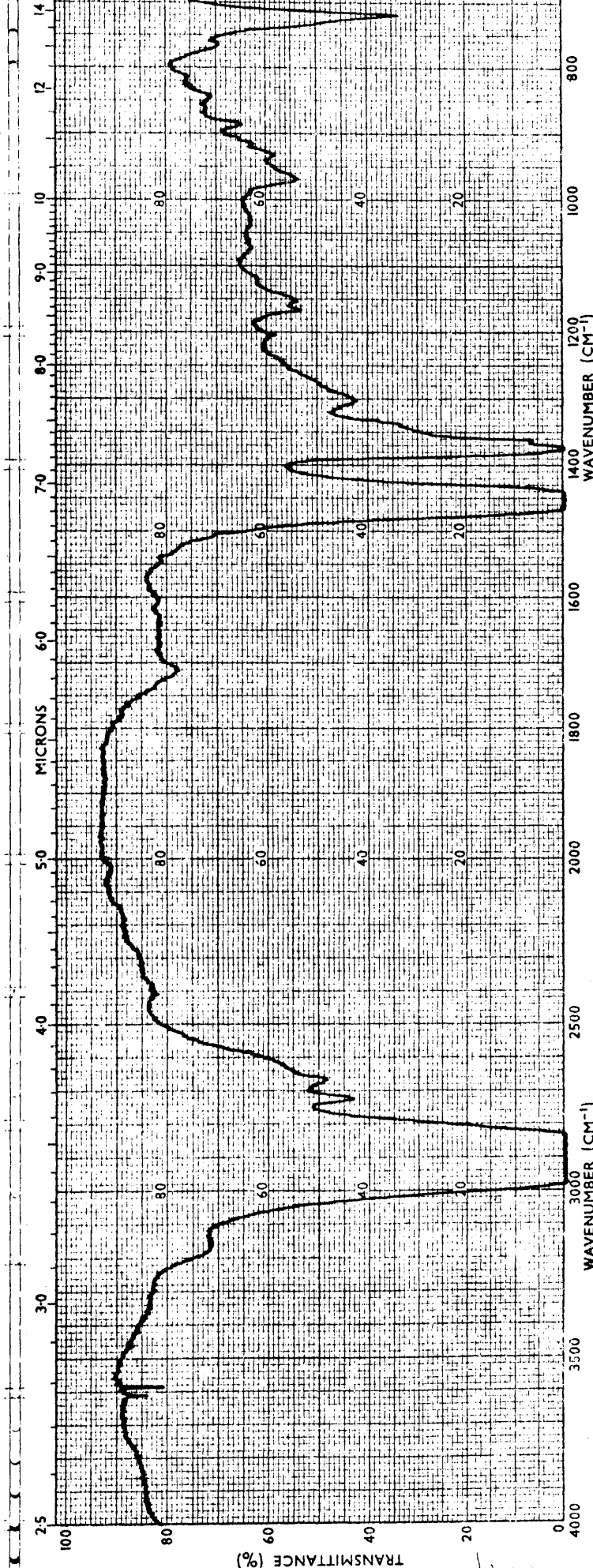
Gráfica 121. Estirpe G-16. Cultivo sobre parafinas totales.

(16) *[Handwritten signature]*



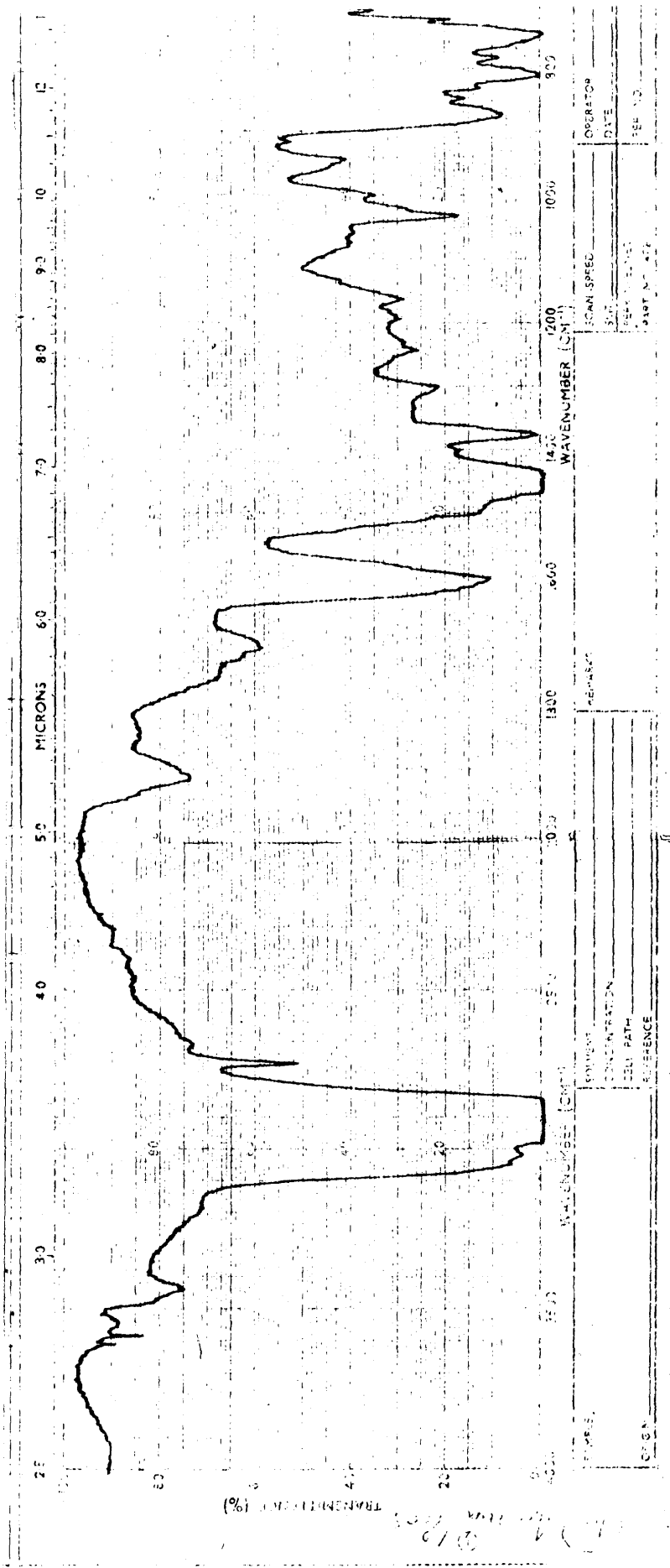
SAMPLE		SCAN SPEED		OPERATOR	
ORIGIN		SLIT		DATE	
SOLVENT		PERKIN-ELMER		REF. NO.	
CONCENTRATION		PART NO. 472-5089			
CELL PATH					
REFERENCE					
REMARKS					

Gráfica 122. Estirpe G-16. Cultivo sobre parafinas lineales.
(Control:Gráfica 9).

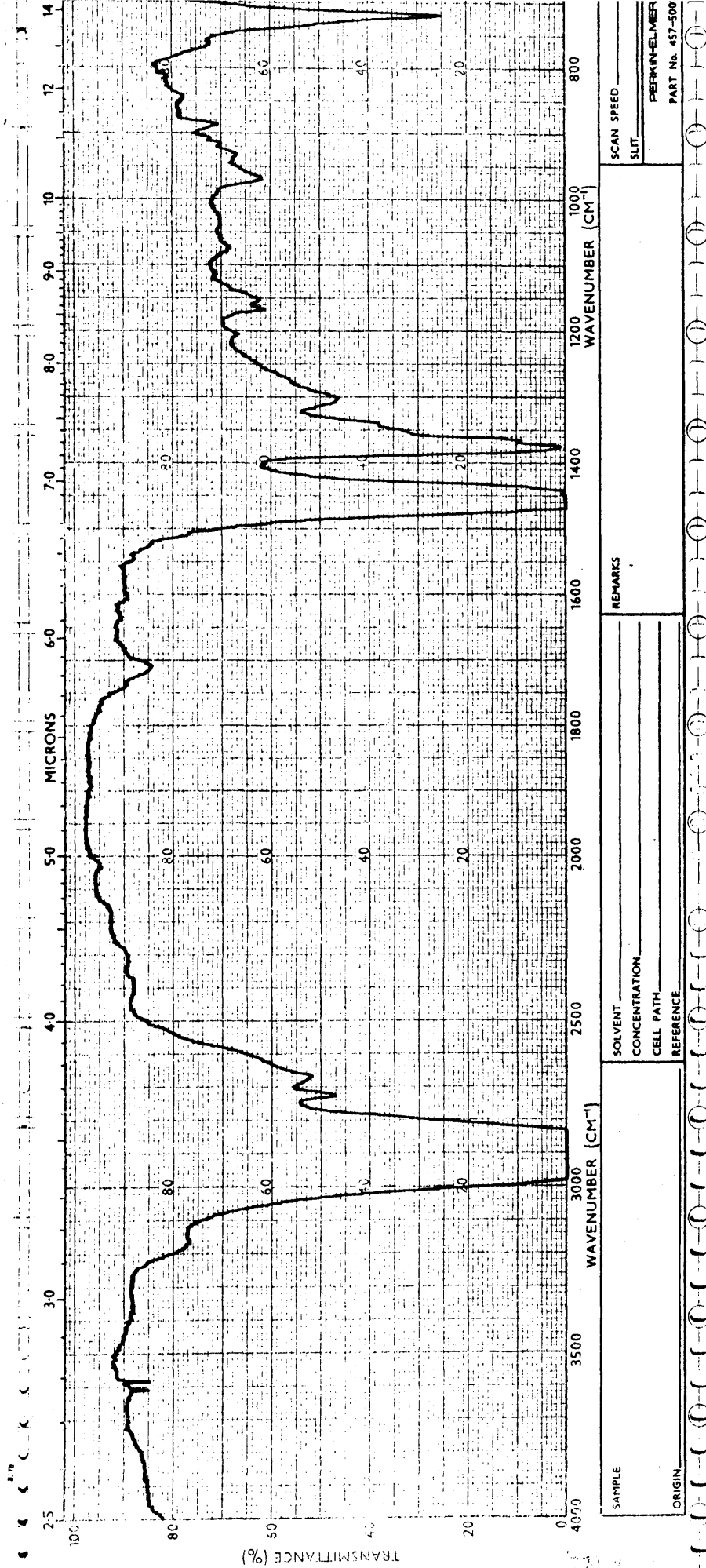


SAMPLE		SCAN SPEED		OPERATOR	
ORIGIN		SLIT		DATE	
SOLVENT		PERKIN-ELMER		REF. NO.	
CONCENTRATION		PART NO. 472-5089			
CELL PATH					
REFERENCE					
REMARKS					

Gráfica 123. Estirpe G-16. Cultivo sobre parafinas ramificadas.
(Control:Gráfica 9).

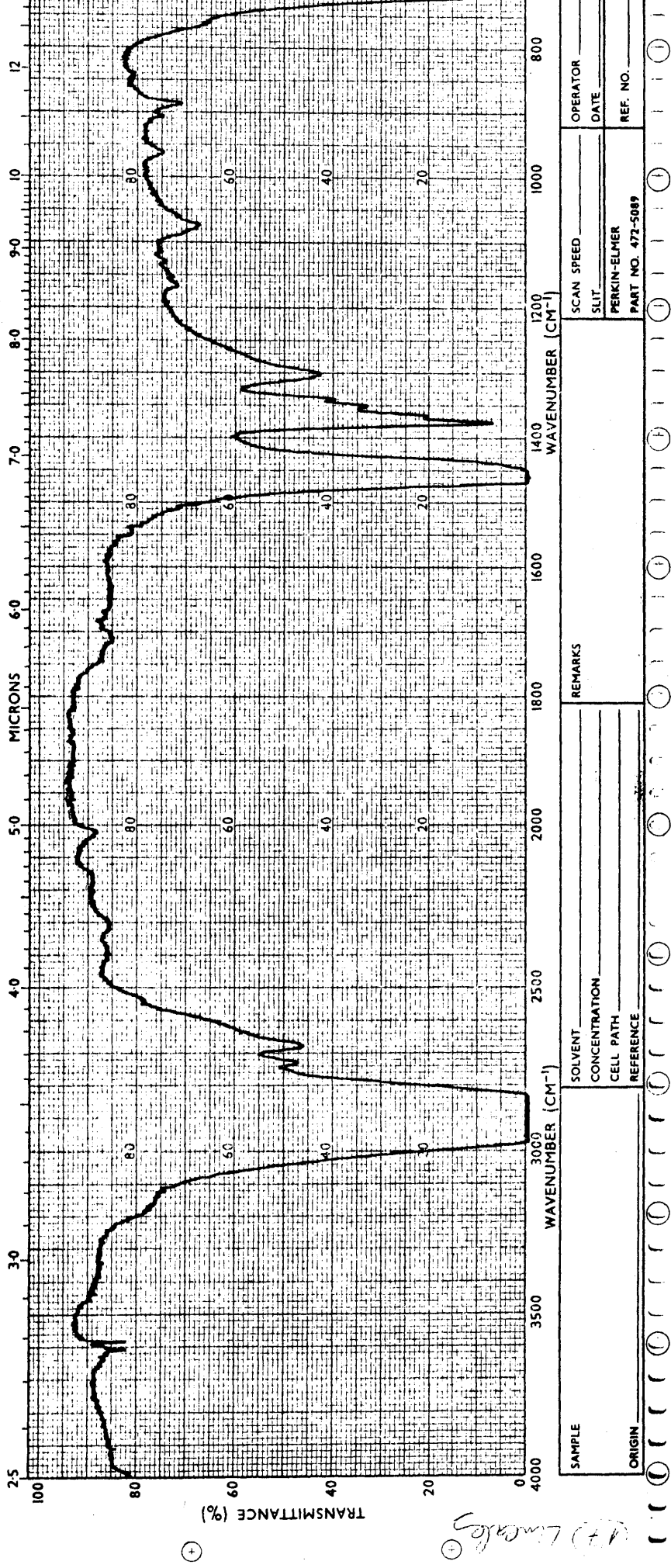


Gráfica 124. Estirpe G-16. Cultivo sobre aromáticos.



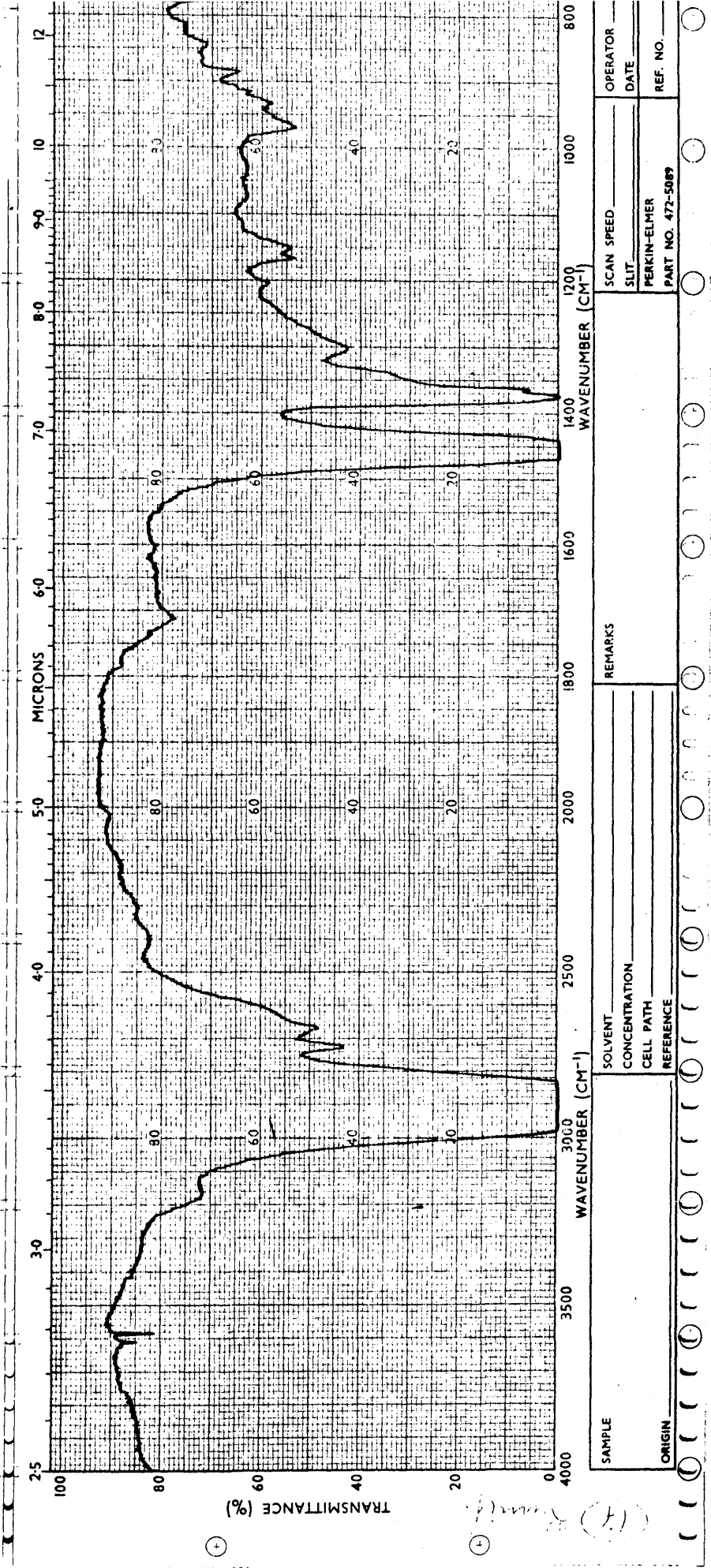
SAMPLE		REMARKS	
ORIGIN			
SOLVENT			
CONCENTRATION			
CELL PATH			
REFERENCE			
PERKIN-ELMER		SCAN SPEED	
PART No. 457-500		SLIT	

Gráfica 125. Estirpe Pa-17. Cultivo sobre parafinas totales.



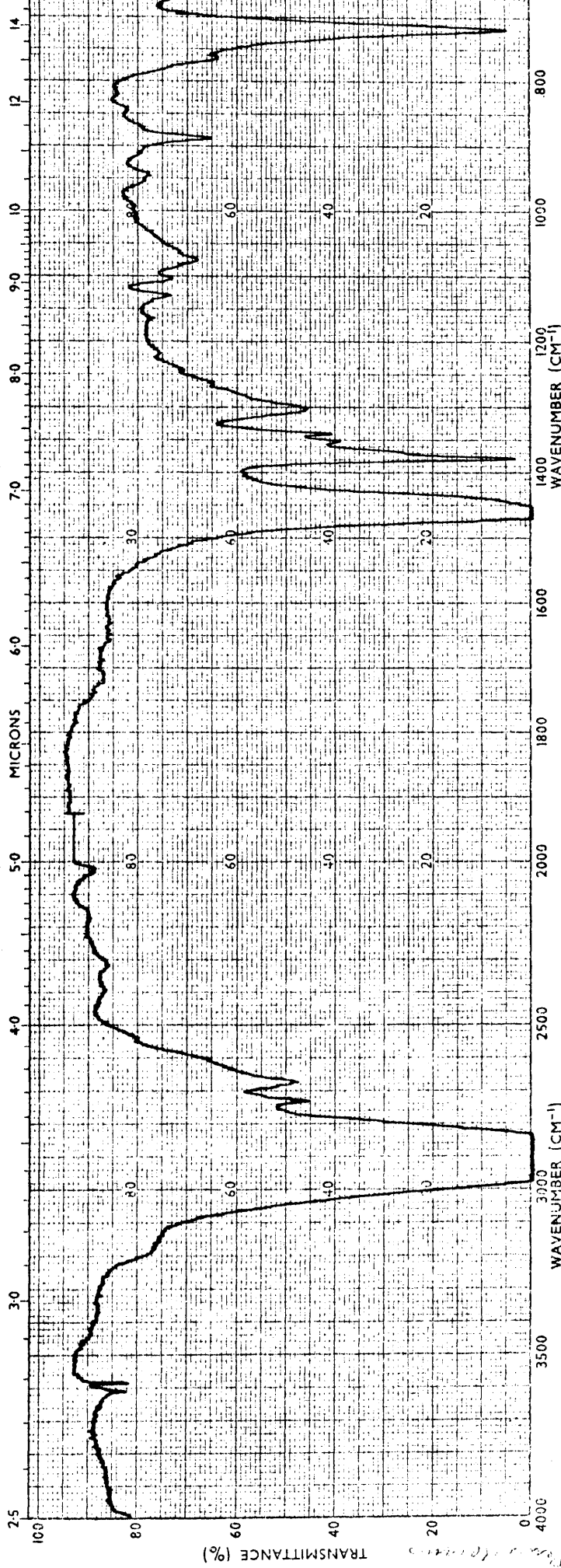
SAMPLE		REMARKS	
ORIGIN		SCAN SPEED	
SOLVENT		SLIT	
CONCENTRATION		PERKIN-ELMER	
CELL PATH		PART NO. 472-5089	
REFERENCE		OPERATOR	
		DATE	
		REF. NO.	

Gráfica 126. Estirpe Pa-17. Cultivo sobre parafinas lineales.
(Control: Gráfica 9).



SAMPLE	SOLVENT	SCAN SPEED	OPERATOR
	CONCENTRATION	SLIT	DATE
ORIGIN	CELL PATH	PERKIN-ELMER	REF. NO.
	REFERENCE	PART NO. 472-5089	

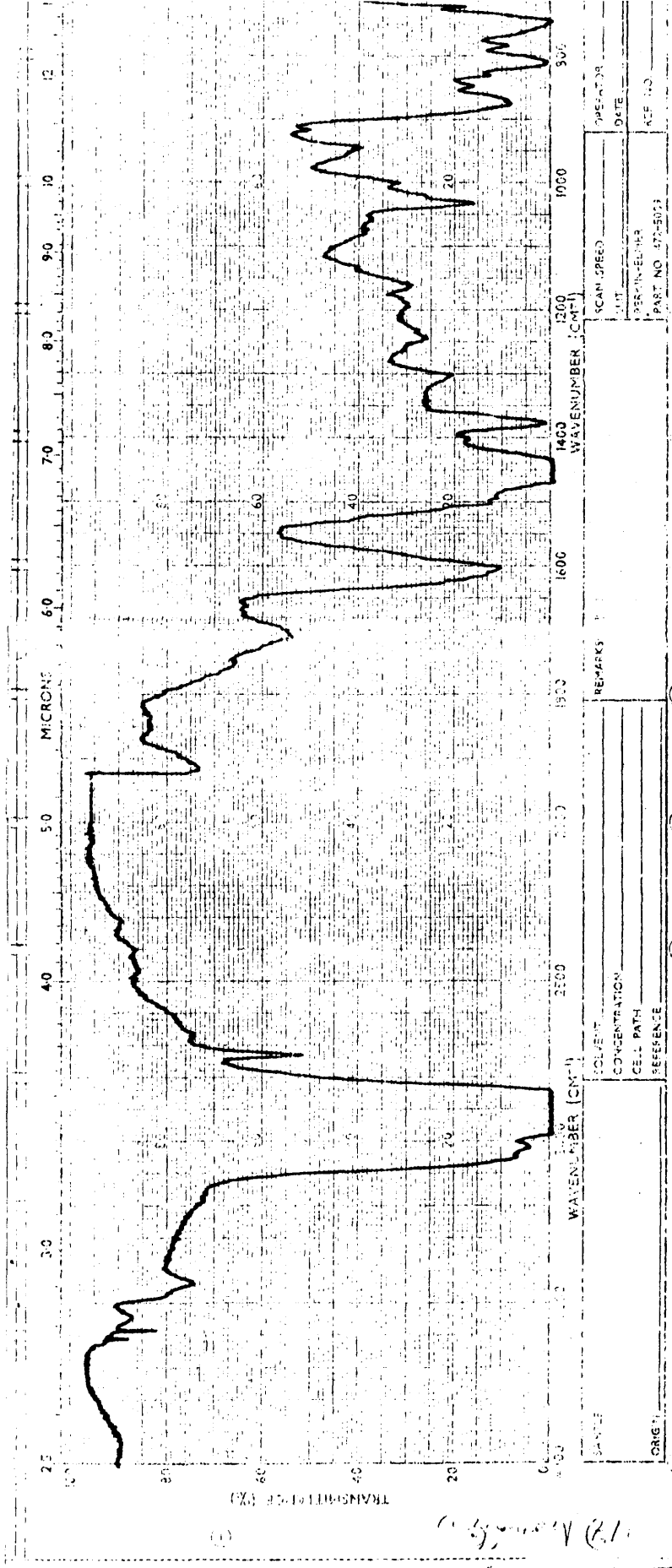
Gráfica 127. Estirpe Pa-17. Cultivo sobre parafinas ramificadas.
 (Control: Gráfica 9).



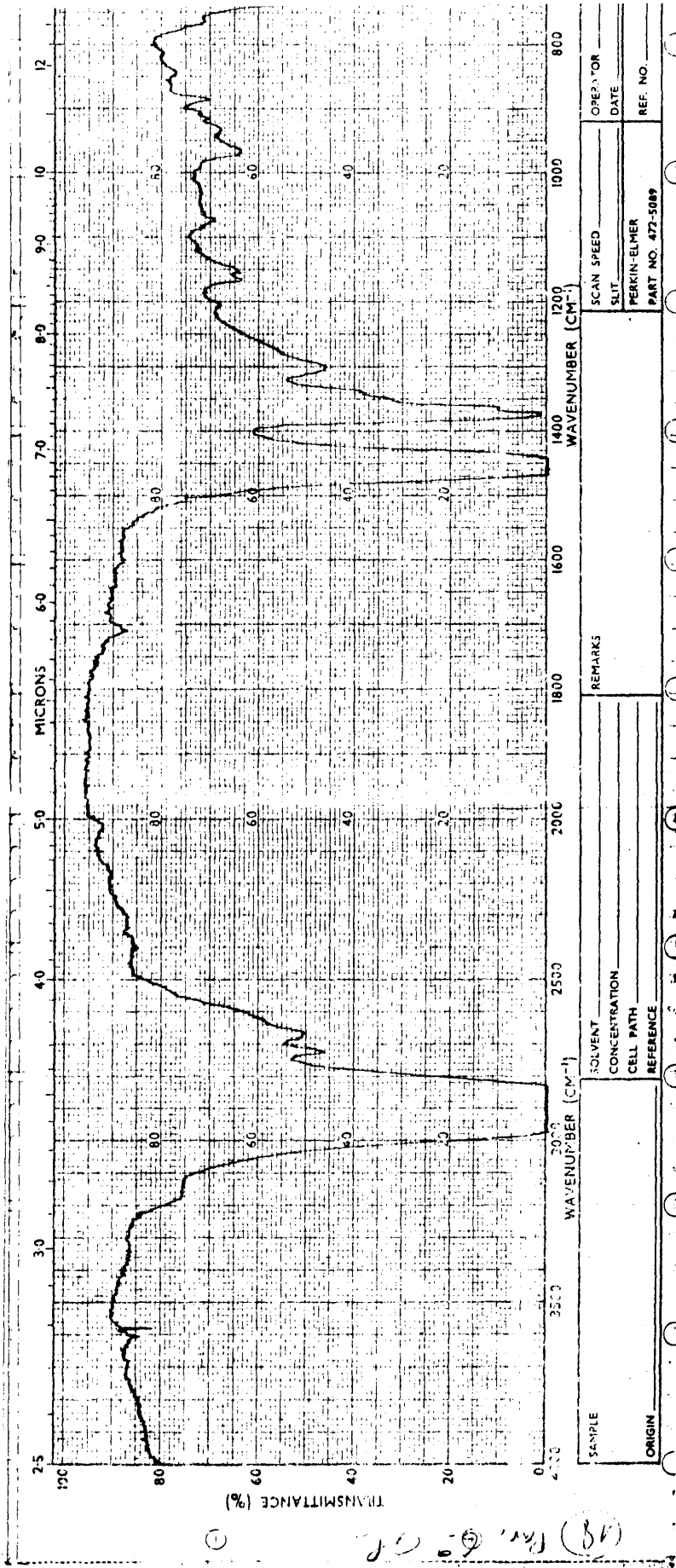
SAMPLE	SCAN SPEED		OPERATOR
	SLIT		DATE
ORIGIN	PERKIN-ELMER		REF. NO.
	PART NO. 472-5089		

SOLVENT	REMARKS
CONCENTRATION	
CELL PATH	
REFERENCE	

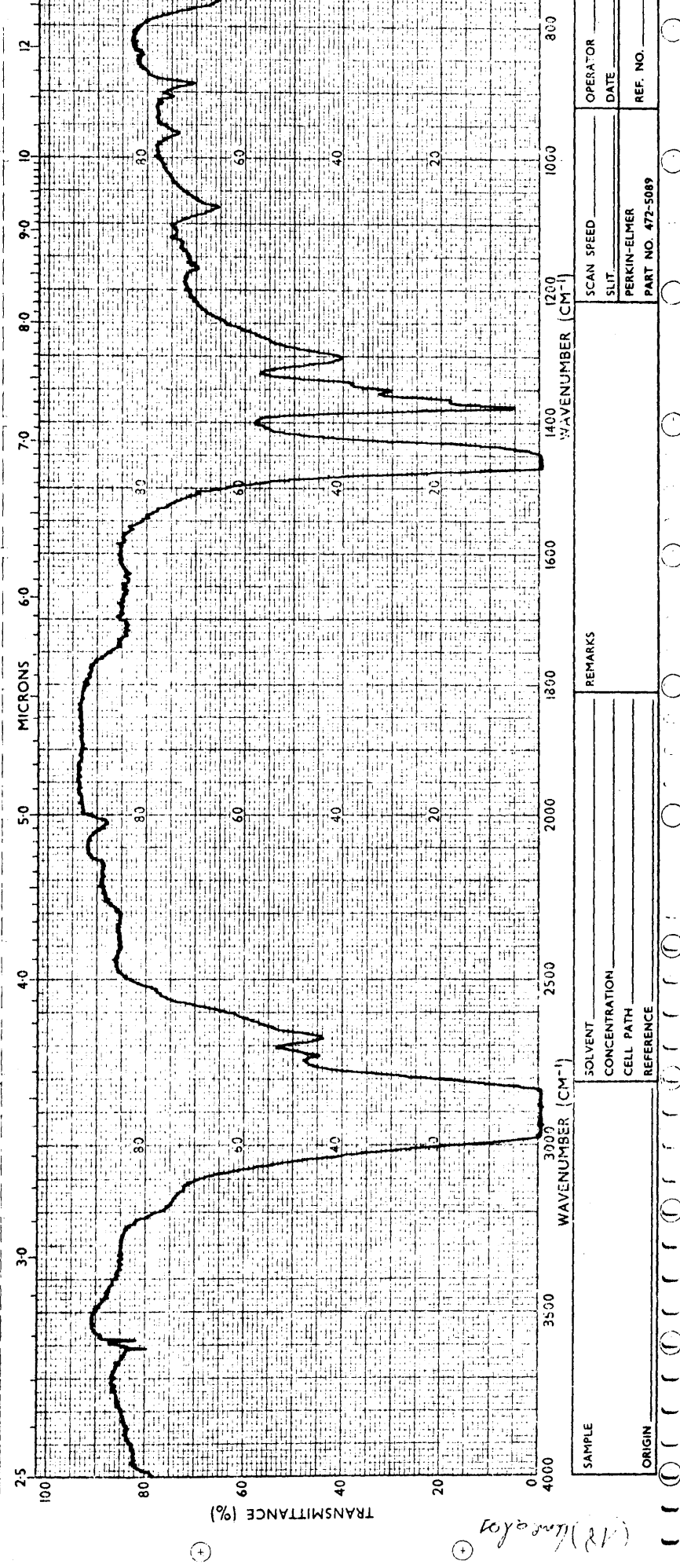
Gráfica 128. Estirpe Pa-17. Cultivo sobre pentadecano.



Gráfica 129. Estirpe Pa-17. Cultivo sobre aromáticos.

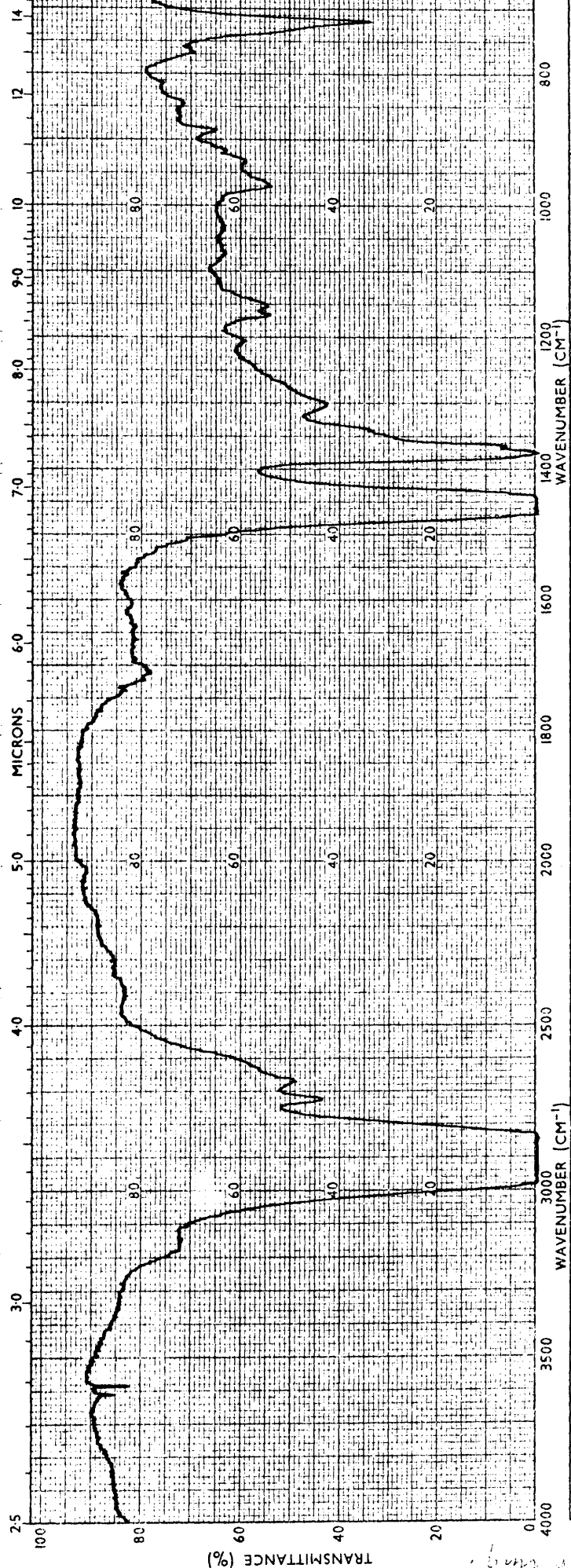


Gráfica 130. Estirpe Pa-18. Cultivo sobre parafinas totales.



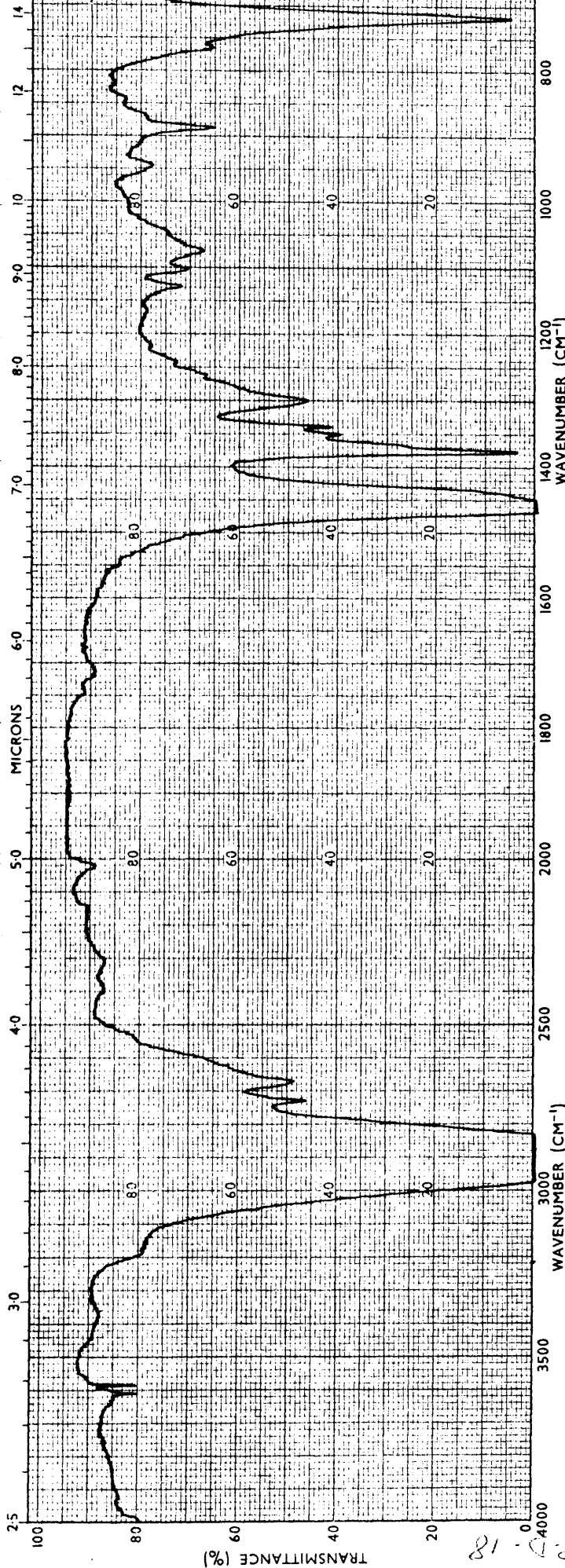
SAMPLE	SOLVENT	REMARKS	OPERATOR
ORIGIN	CONCENTRATION		DATE
	CELL PATH		PERKIN-ELMER
	REFERENCE		PART NO. 472-5089
			SCAN SPEED
			SLIT
			REF. NO.

Gráfica 131. Estirpe Pa-18. Cultivo sobre parafinas lineales.
(Control:Gráfica 9).



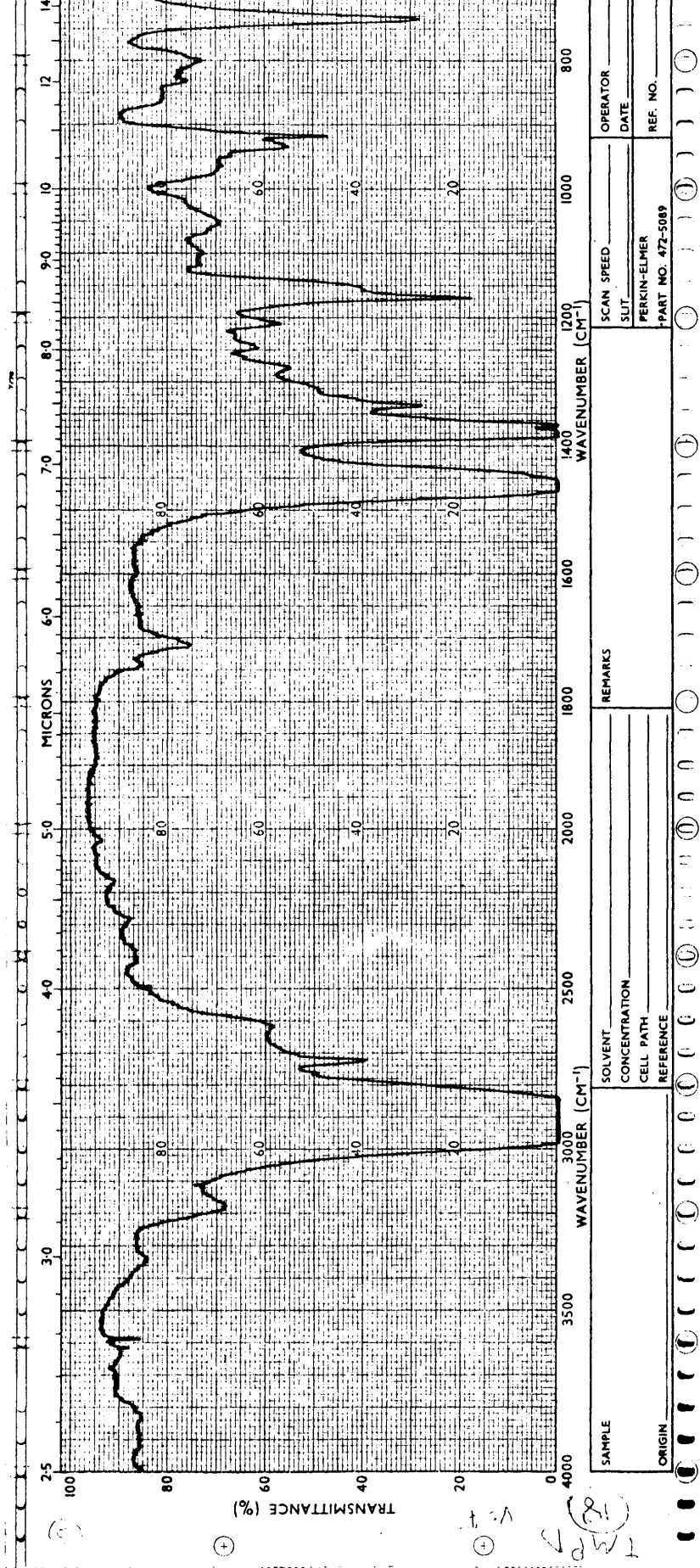
SAMPLE		REMARKS		OPERATOR	
ORIGIN		CONCENTRATION		DATE	
		CELL PATH		SCAN SPEED	
		REFERENCE		SLIT	
				PERKIN-ELMER	
				PART NO. 472-5089	
				REF. NO.	

Gráfica 132. Estirpe Pa-18. Cultivo sobre parafinas ramificadas.
 (Control:Gráfica 9).



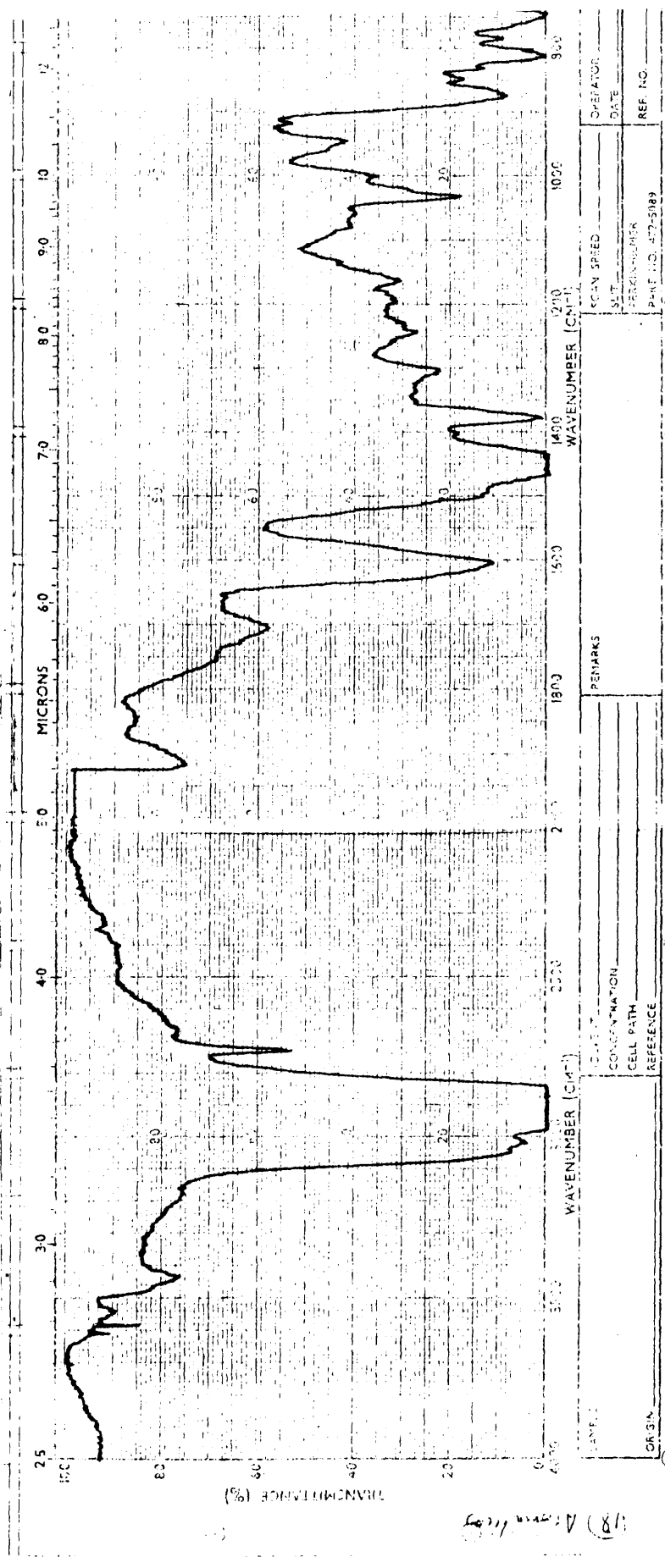
SAMPLE		SOLVENT		REMARKS	
ORIGIN		CONCENTRATION		SCAN SPEED	
		CELL PATH		SLIT	
		REFERENCE		PERKIN-ELMER	
				PART NO. 472-5089	
				OPERATOR	
				DATE	
				REF. NO.	

Gráfica 133. Estirpe Pa-18. Cultivo sobre pentadecano.



SAMPLE	SOLVENT	CONCENTRATION	CELL PATH	REFERENCE	REMARKS	SCAN SPEED	OPERATOR
						SPLIT	DATE
ORIGIN						PERKIN-ELMER	REF. NO.
						PART NO. 472-5089	

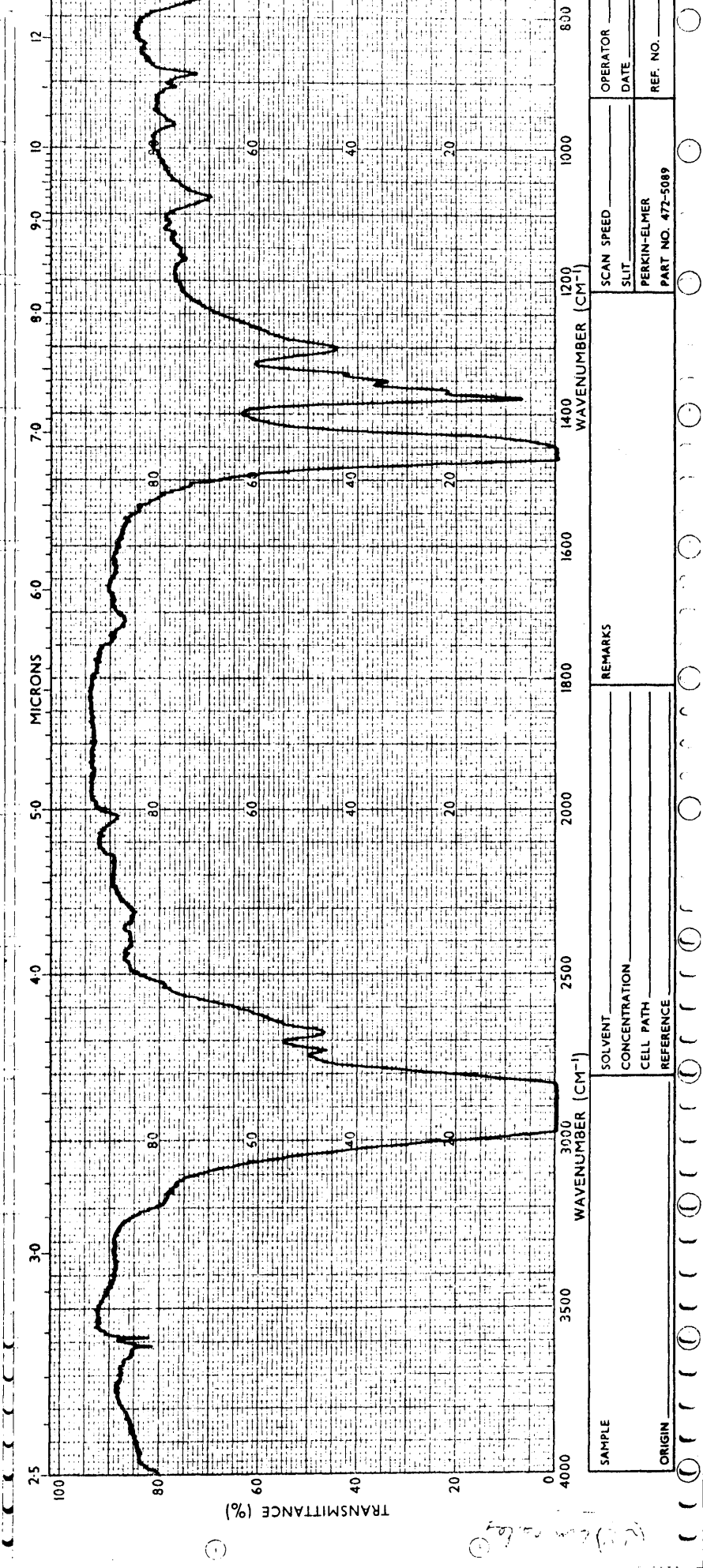
Gráfica 134. Estirpe Pa-18. Cultivo sobre tetrametilpentadecano.



Gráfica 135. Estirpe Pa-18. Cultivo sobre aromáticos.

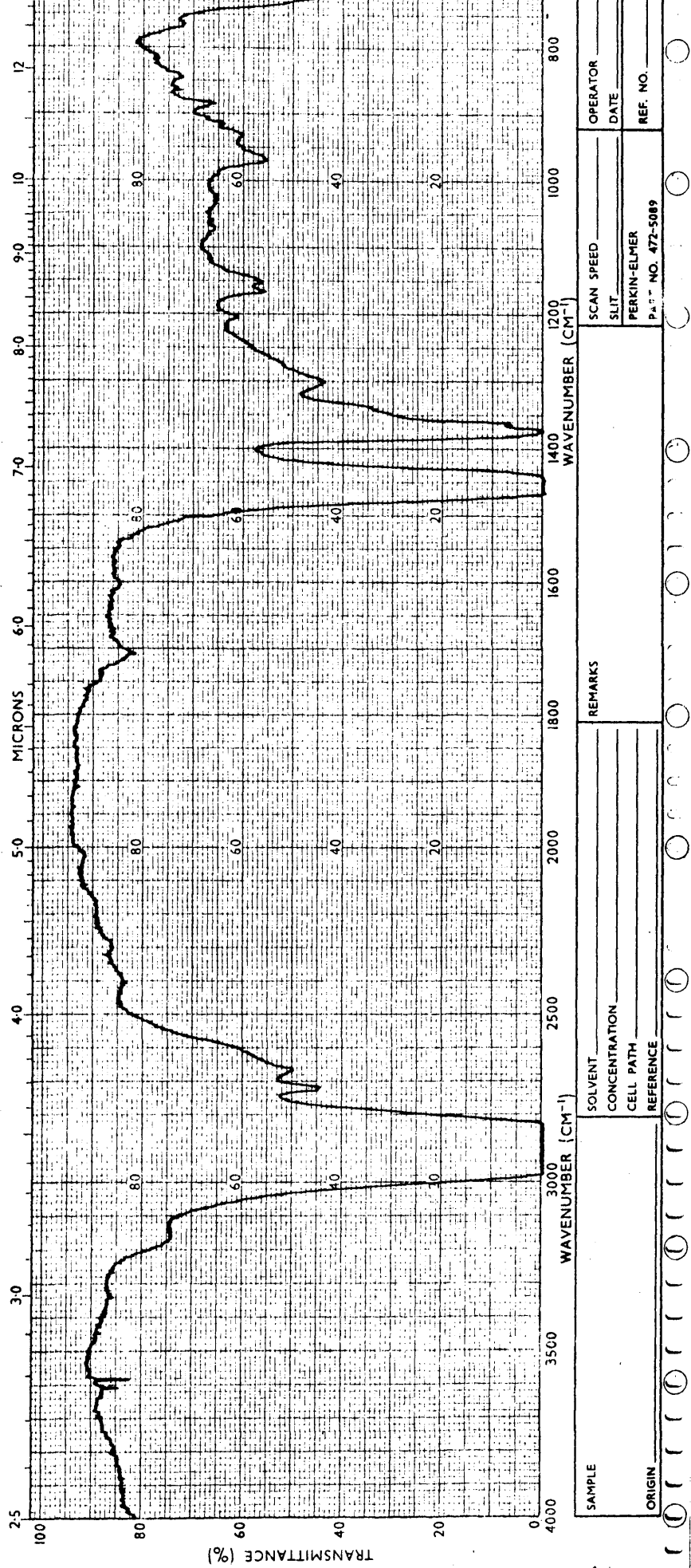
DATE	OPERATOR
CONCENTRATION	DATE
CELL PATH	SCAN SPEED
REFERENCE	SALT
	PERCENTAGE
	PART NO. 477-5189
	REF. NO.

REMARKS



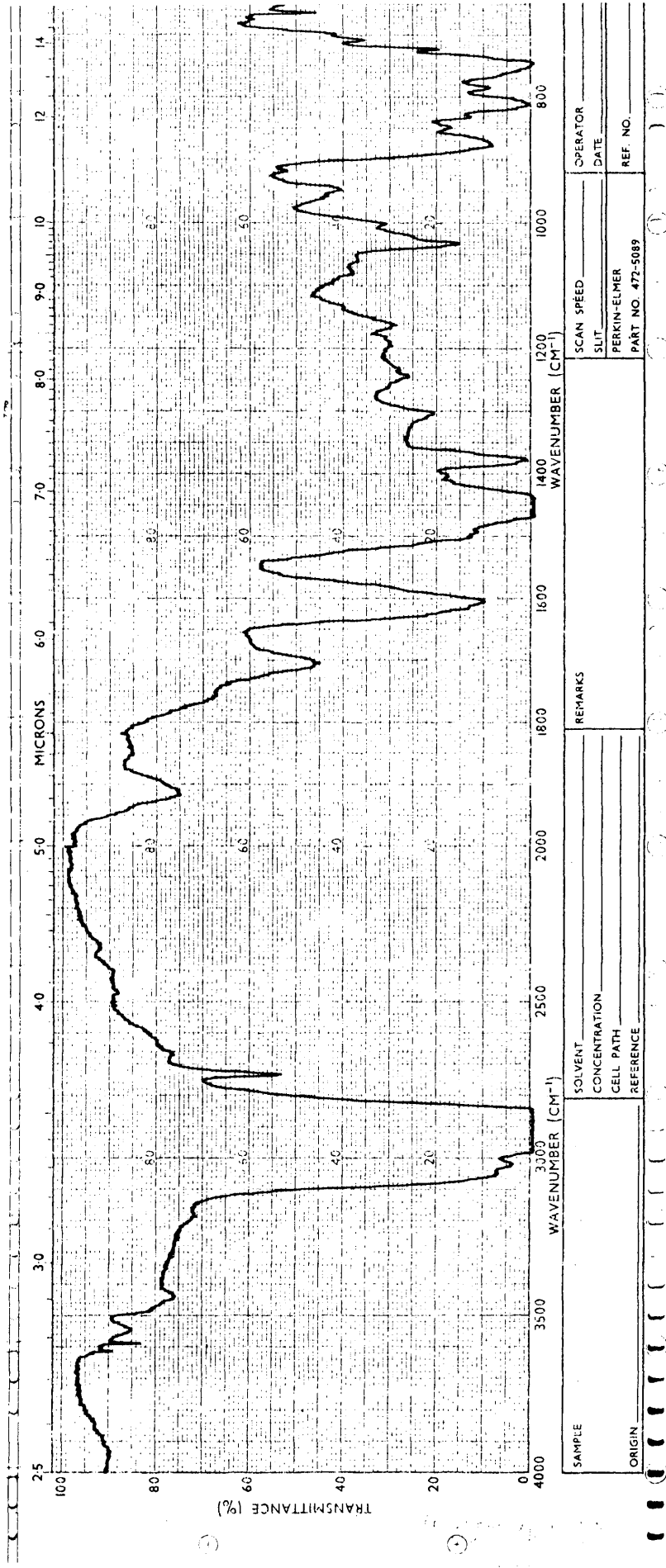
SAMPLE		REMARKS		SCAN SPEED	OPERATOR
ORIGIN		REMARKS		SLIT	DATE
SOLVENT		REMARKS		PERKIN-ELMER	REF. NO.
CONCENTRATION		REMARKS		PART NO. 472-5089	
CELL PATH		REMARKS			
REFERENCE		REMARKS			

Gráfica 136. Estirpe K-22. Cultivo sobre parafinas lineales.
 (Control:Gráfica 9).



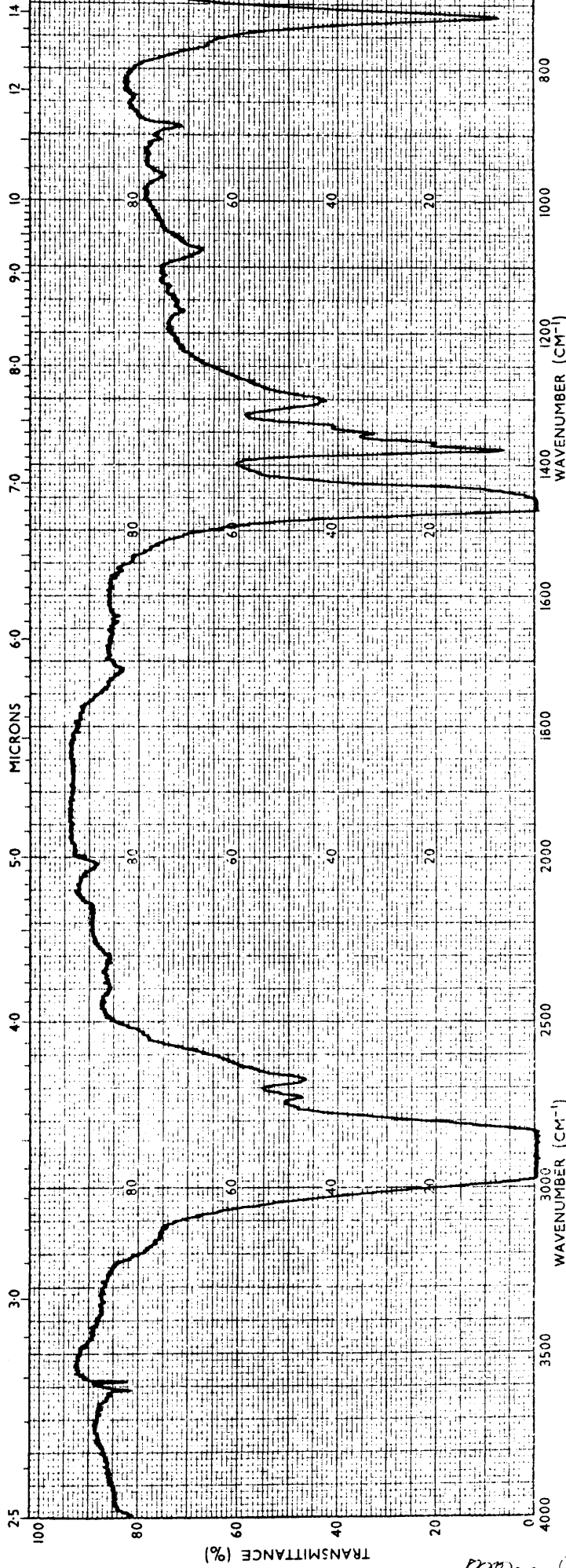
SAMPLE		SCAN SPEED		OPERATOR
ORIGIN		SLIT		DATE
		PERKIN-ELMER		REF. NO.
		PART NO. 472-5089		

Gráfica 137. Estirpe K-22. Cultivo sobre parafinas ramificadas.
 (Control:Gráfica 9).



SAMPLE		REMARKS		OPERATOR
ORIGIN		SOLVENT		DATE
		CONCENTRATION		SCAN SPEED
		CELL PATH		SPLIT
		REFERENCE		PERKIN-ELMER
				PART NO. 472-5089
				REF. NO.

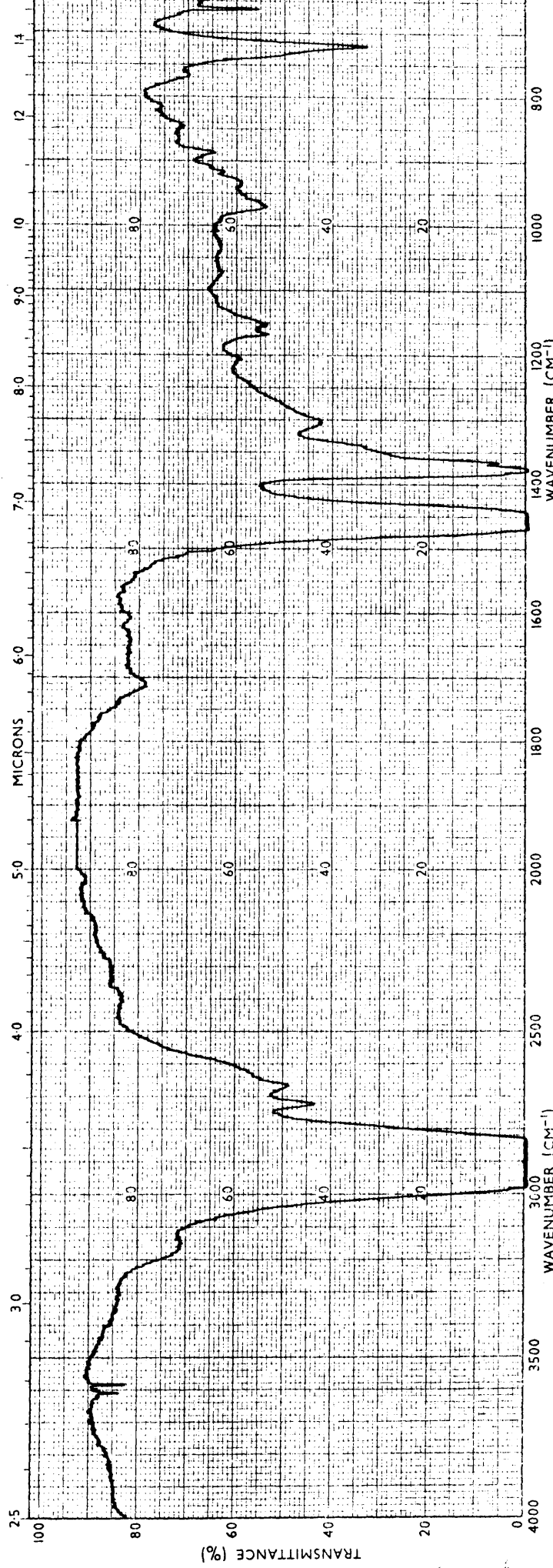
Gráfica 139. Estirpe K-22. Cultivo sobre aromáticos.



SAMPLE	REMARKS		SCAN SPEED	OPERATOR
	SOLVENT	CONCENTRATION	SLIT	DATE
ORIGIN	CELL PATH	PERKIN-ELMER	PART NO. 472-5089	
	REFERENCE	REF. NO.		

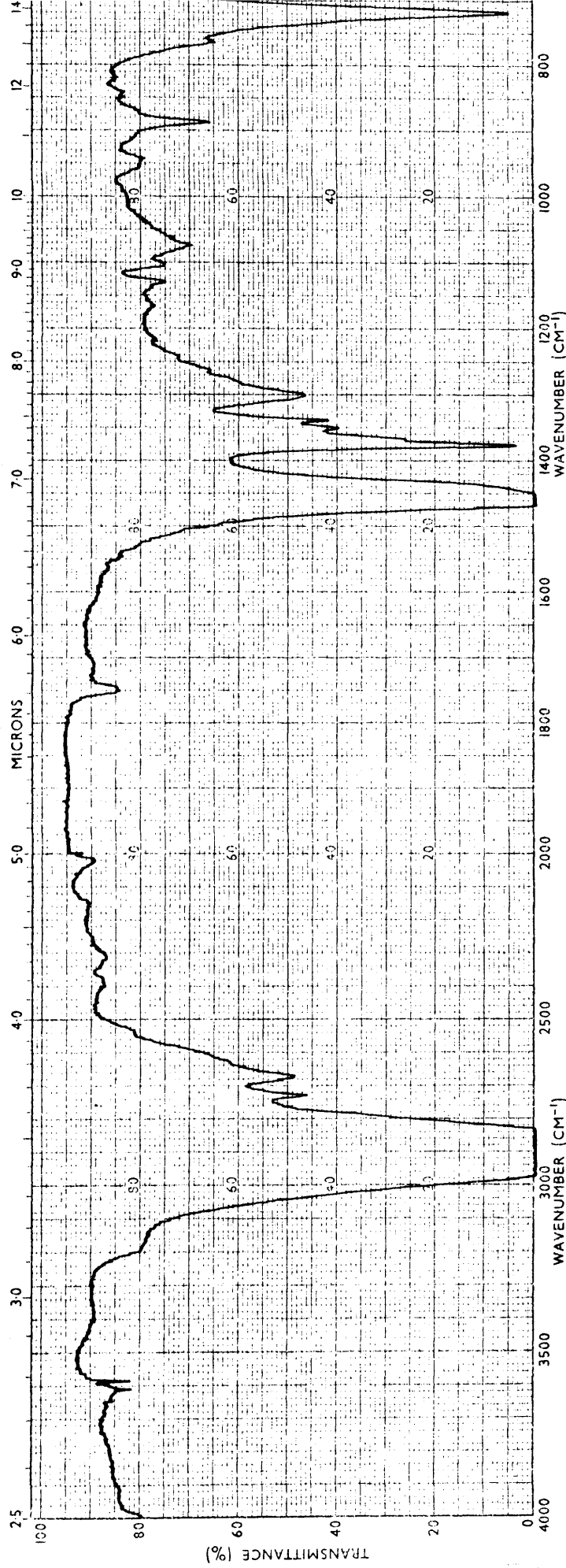
Gráfica 140. Estirpe Pa-23. Cultivo sobre parafinas lineales.
(Control:Gráfica 9).

Control



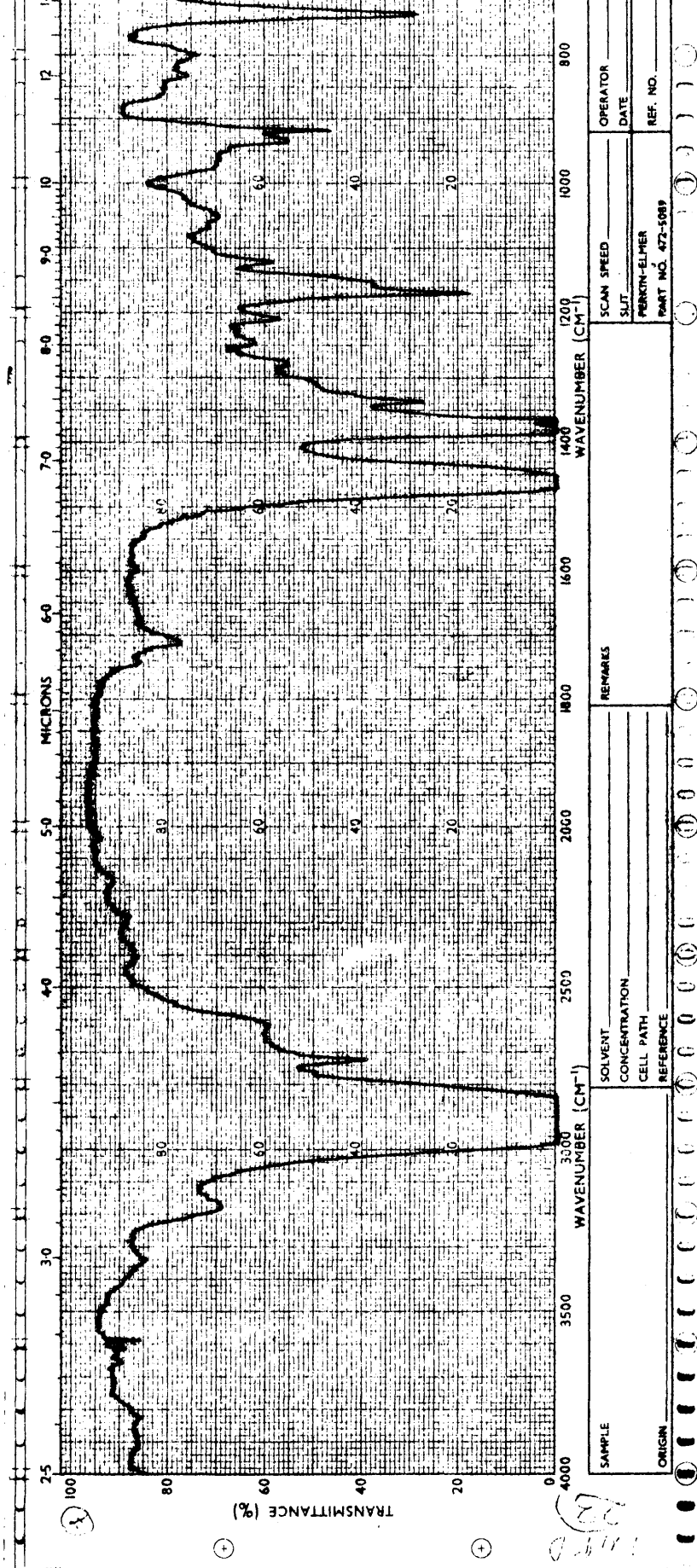
SAMPLE	SOLVENT	SCAN SPEED	OPERATOR
	CONCENTRATION	SLIT	DATE
ORIGIN	CELL PATH	PERKIN-ELMER	REF. NO.
	REFERENCE	PART NO. 472-5089	

Gráfica 141. Estirpe Pa-23. Cultivo sobre parafinas ramificadas.
 (Control:Gráfica 9).



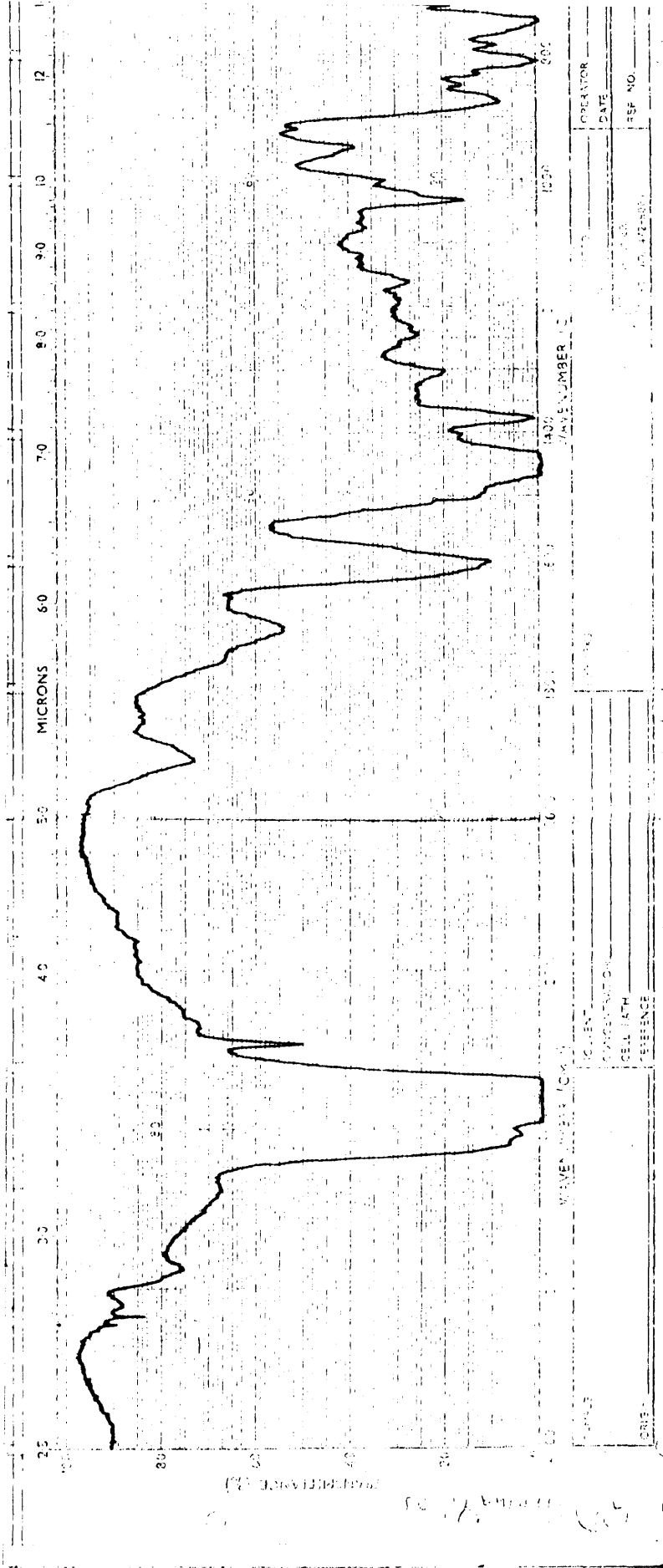
SAMPLE	SOLVENT	REMARKS	SCAN SPEED	OPERATOR
	CONCENTRATION		SLIT	DATE
ORIGIN	CELL PATH		PERKIN-ELMER	REF. NO.
	REFERENCE		PART NO. 472-5089	

Gráfica 142. Estirpe Pa-23. Cultivo sobre pentadecano.

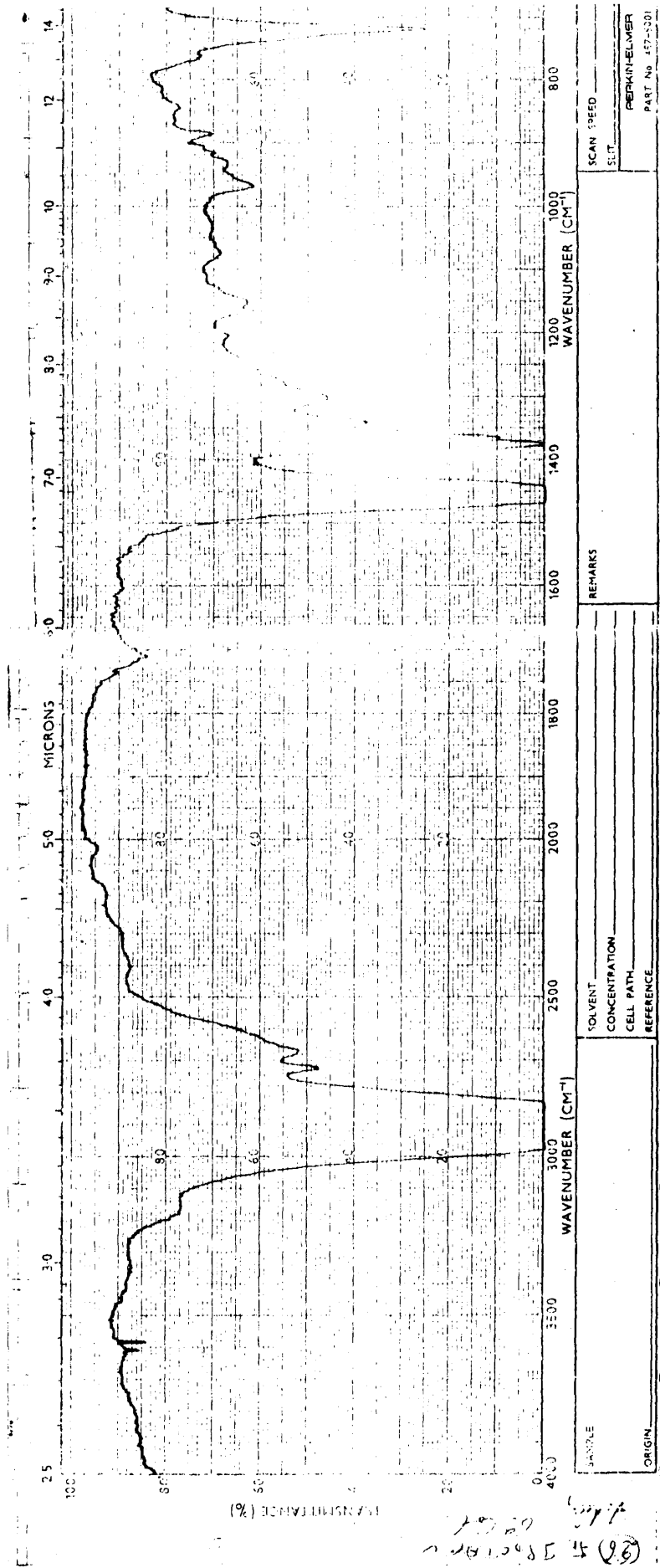


SAMPLE	SOLVENT	OPERATOR
	CONCENTRATION	DATE
ORIGIN	CELL PATH	SCAN SPEED
	REFERENCE	SPLIT
REMARKS		PERKIN-ELMER
		PART NO. 472-5089
		REF. NO.

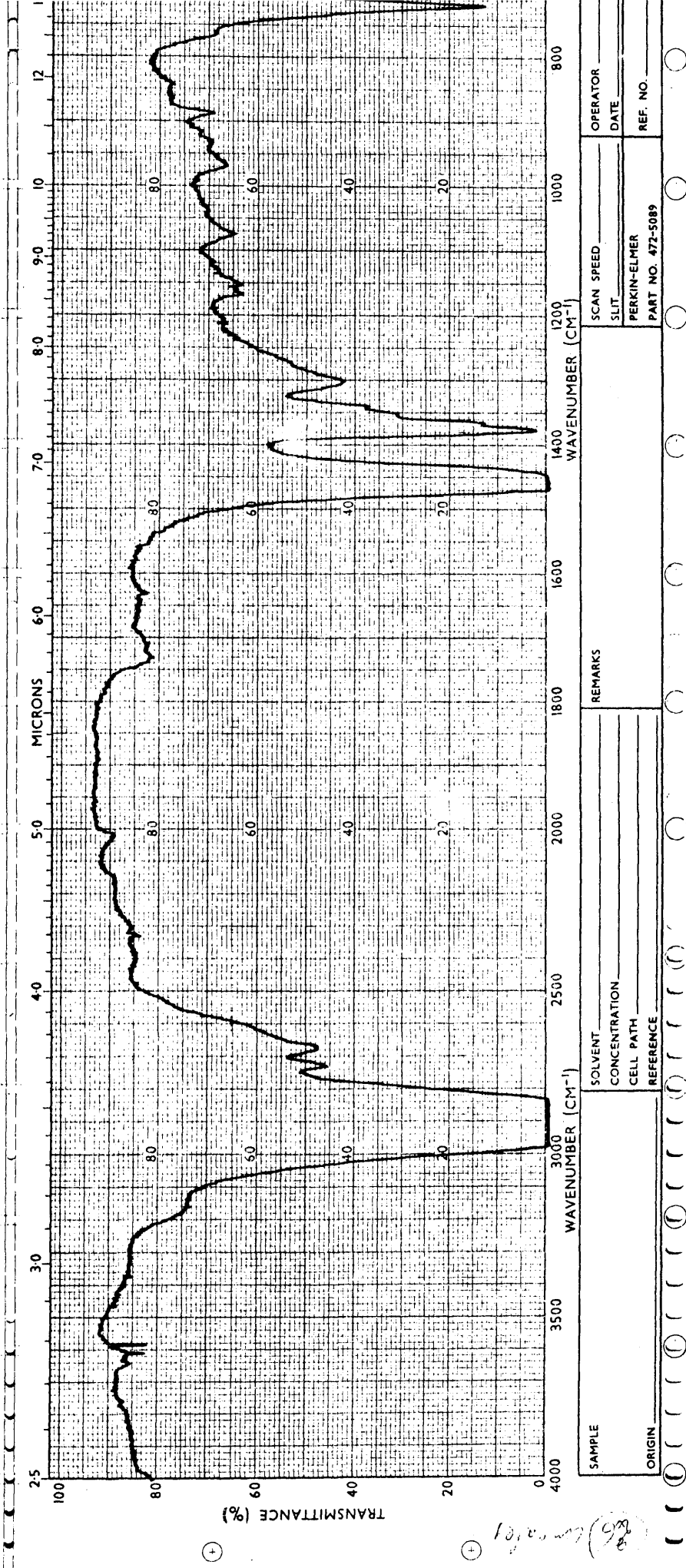
Gráfica 143. Estirpe Pa-23. Cultivo sobre tetrametilpentadecano.



Gráfica 144. Estirpe Pa-23. Cultivo sobre aromáticos.

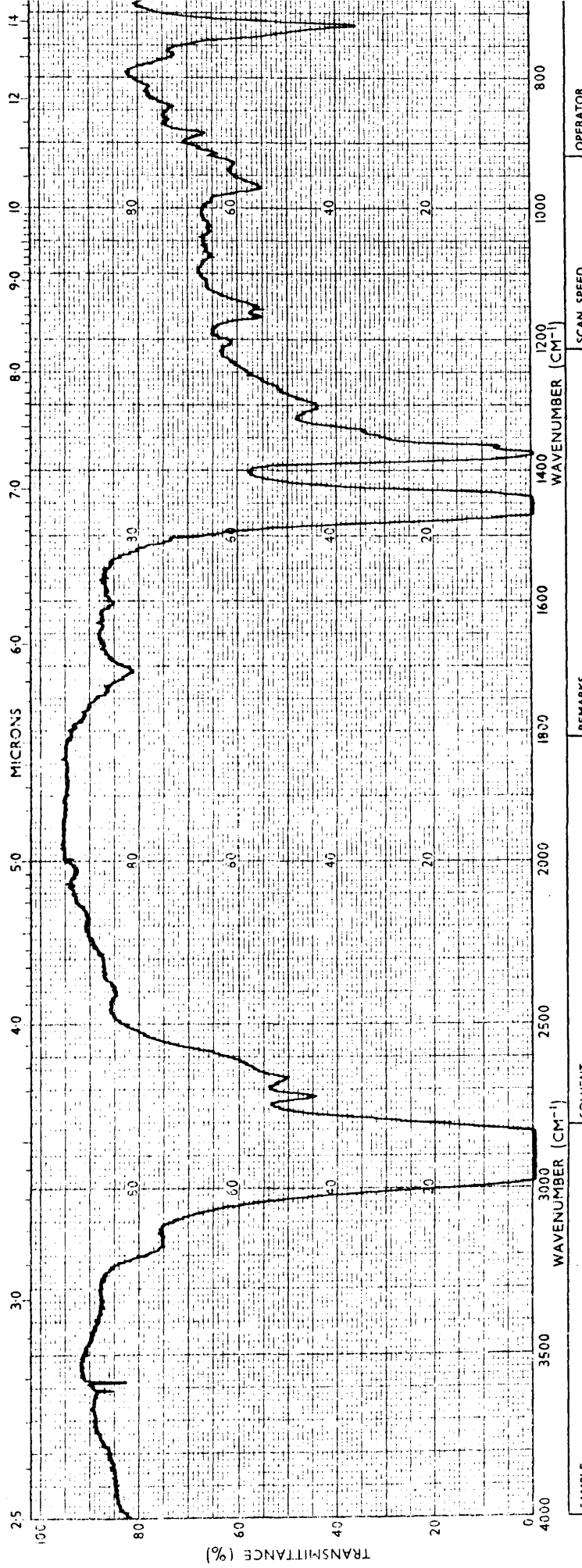


Gráfica 145. Estirpe G-26. Cultivo sobre parafinas totales.



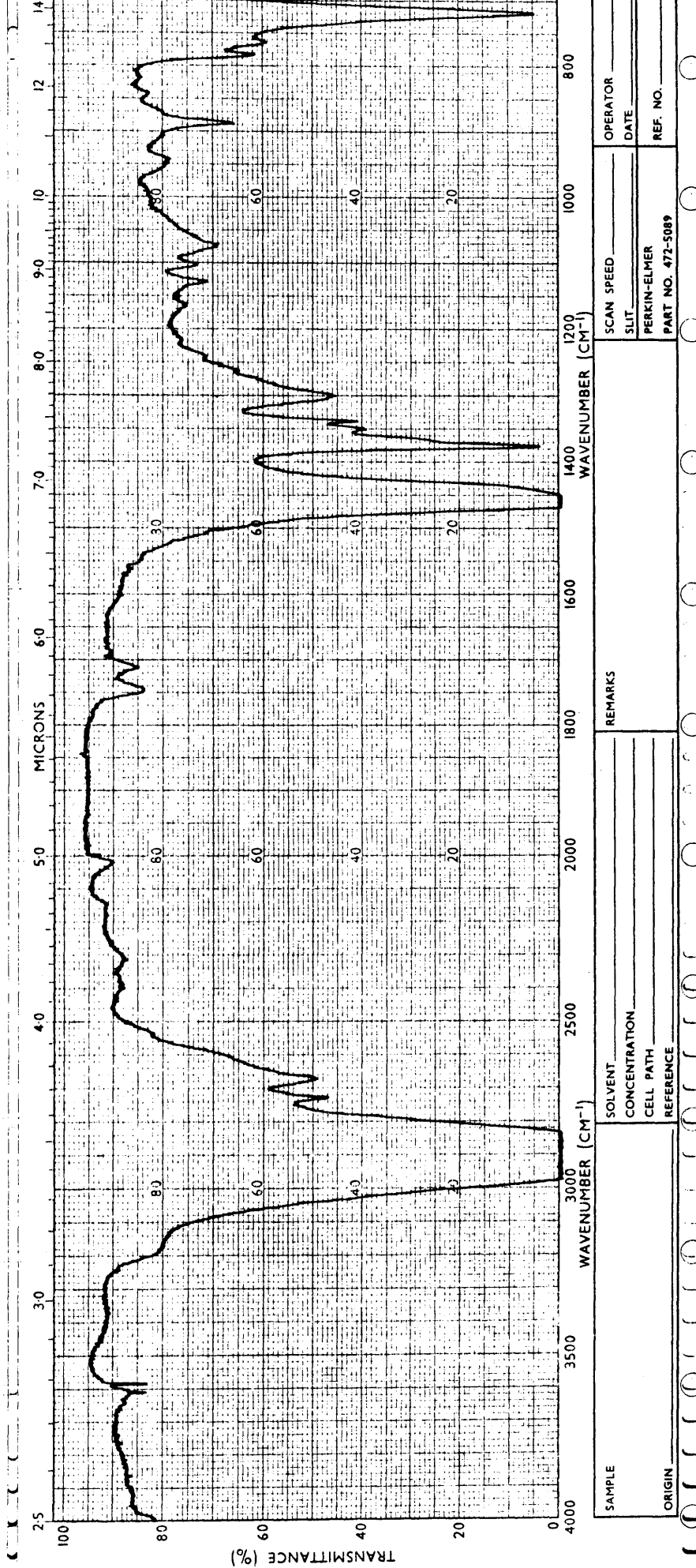
SAMPLE	SOLVENT	SCAN SPEED	OPERATOR
ORIGIN	CONCENTRATION	SLIT	DATE
	CELL PATH	PERKIN-ELMER	REF. NO.
	REFERENCE	PART NO. 472-5089	

Gráfica 146. Estirpe G-26. Cultivo sobre parafinas lineales.
 (Control:Gráfica 10).



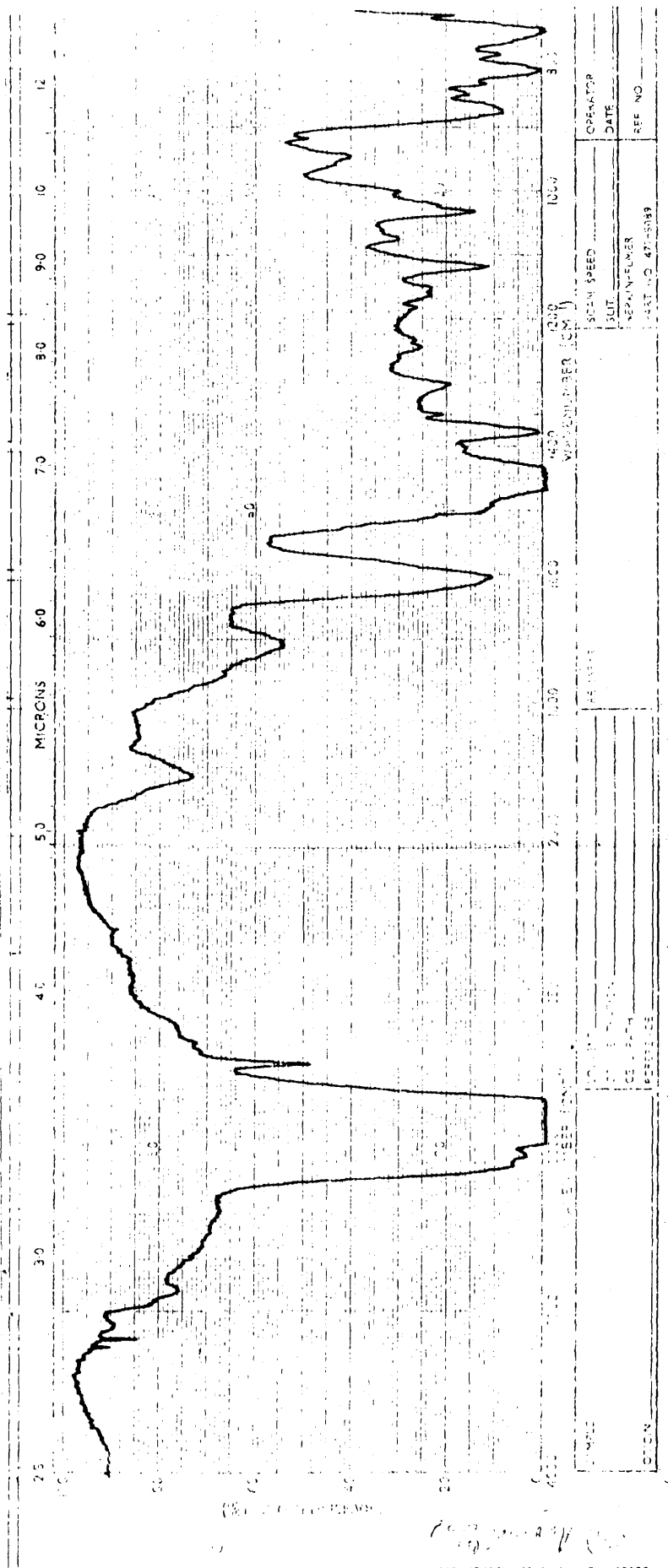
SAMPLE	SOLVENT	SCAN SPEED	OPERATOR
ORIGIN	CONCENTRATION	SLIT	DATE
	CELL PATH	PERKIN-ELMER	REF. NO.
	REFERENCE	PART NO. 472-5089	

Gráfica 147. Estirpe G-26. Cultivo sobre parafinas ramificadas.
 (Control:Gráfica 9).

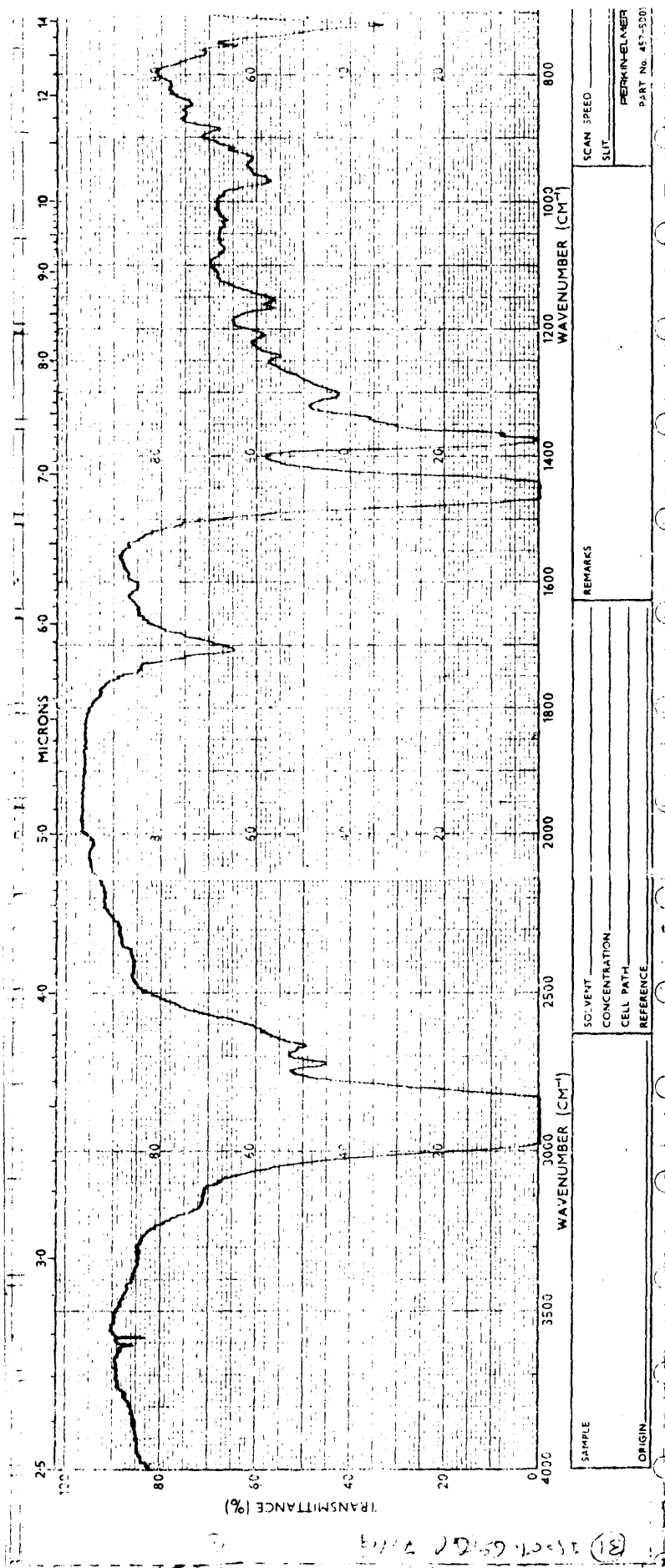


SAMPLE		REMARKS		OPERATOR	
ORIGIN		CONCENTRATION		DATE	
CELL PATH		REFERENCE		SCAN SPEED	
				SLIT	
				PERKIN-ELMER	
				PART NO. 472-5089	
				REF. NO.	

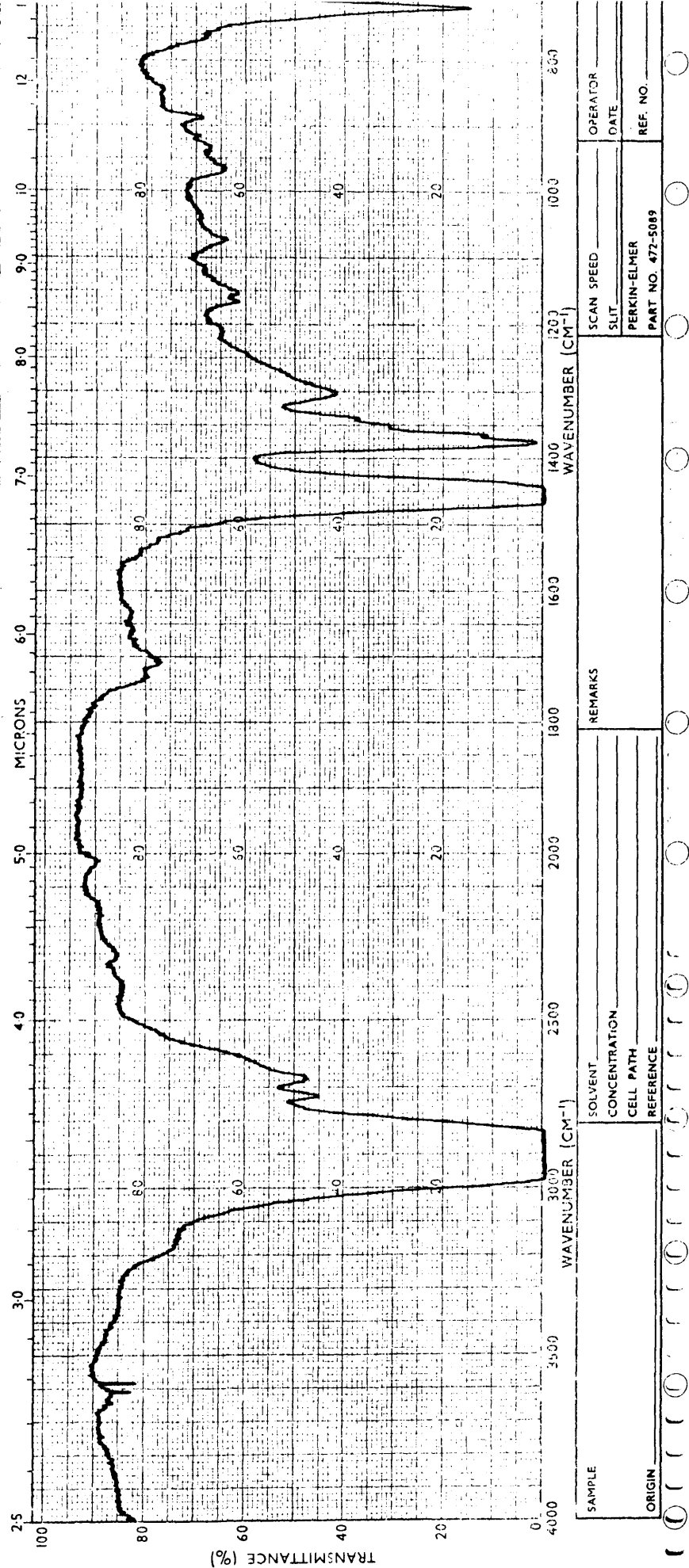
Gráfica 148. Estirpe G-26. Cultivo sobre pentadecano.



Gráfica 149. Estirpe G-26. Cultivo sobre aromáticos.

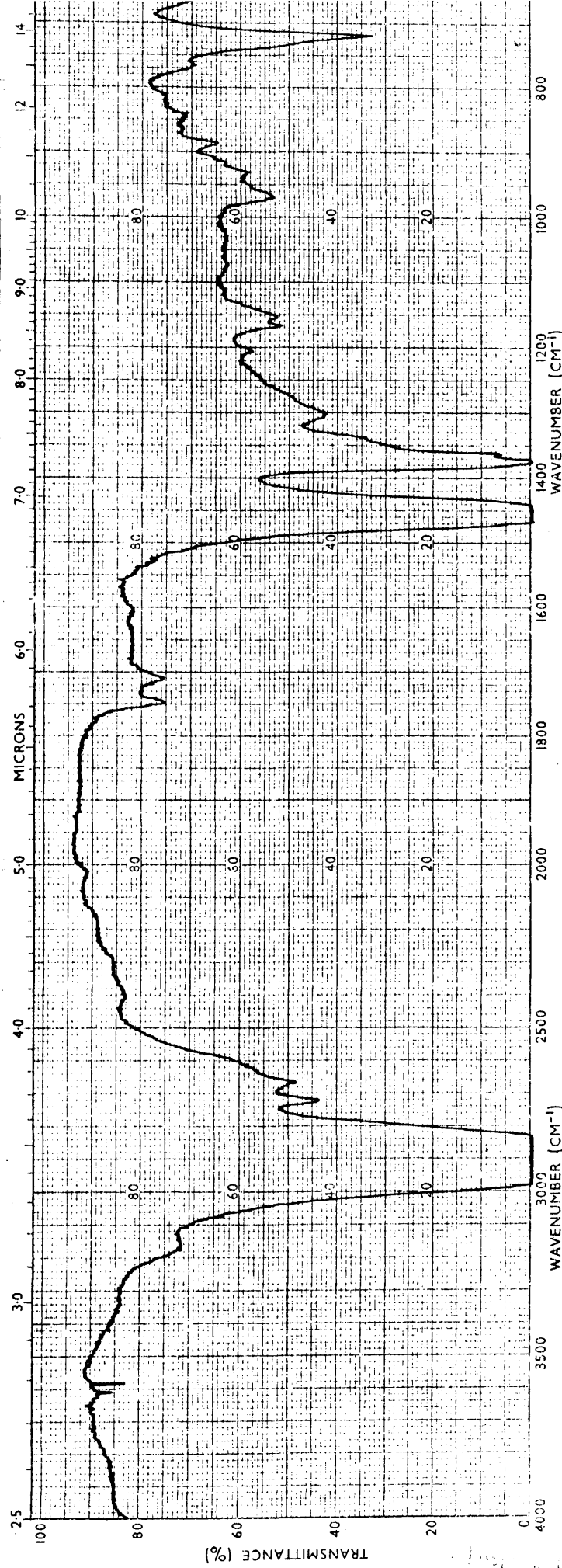


Gráfica 150. Estirpe G-31. Cultivo sobre parafinas totales.



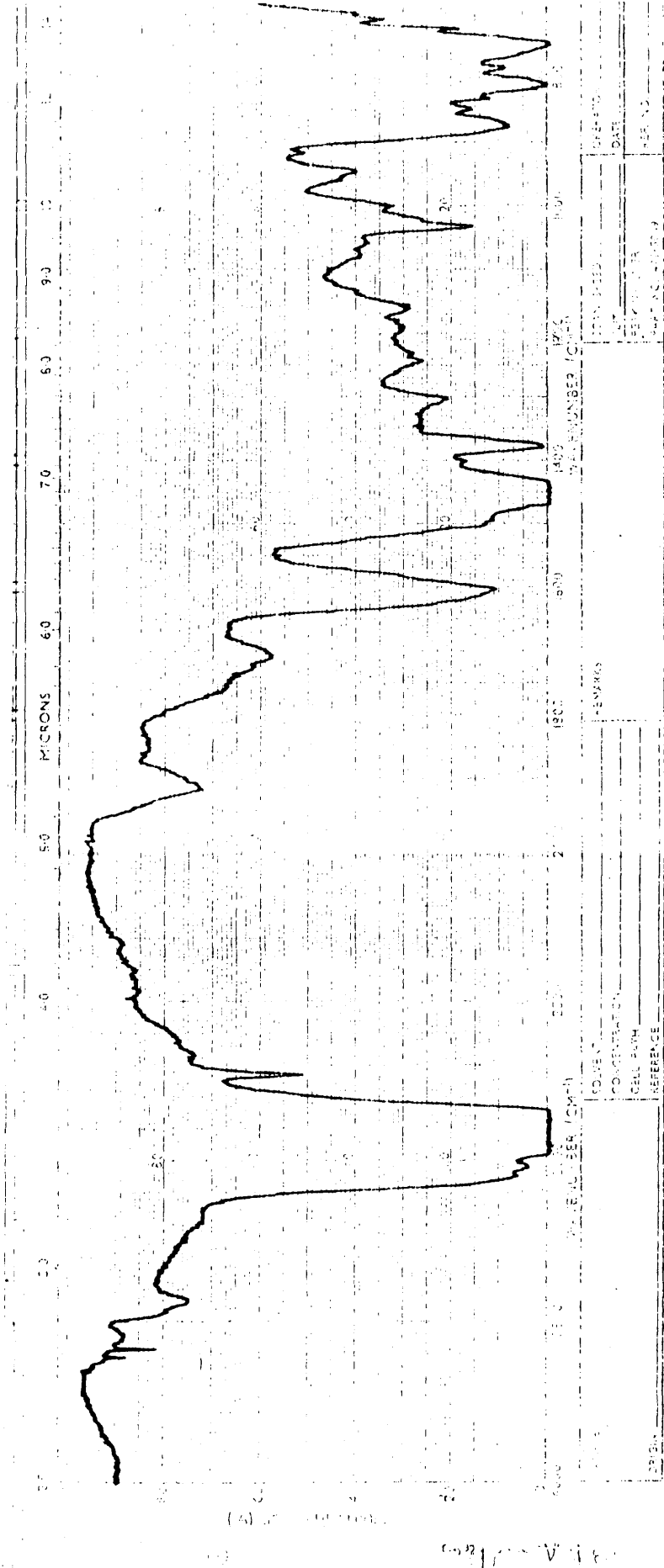
SAMPLE	SOLVENT	REMARKS	OPERATOR
ORIGIN	CONCENTRATION		DATE
	CELL PATH		PERKIN-ELMER
	REFERENCE		PART NO. 472-5089
			SCAN SPEED
			SLIT
			1000
			1400
			WAVENUMBER (CM ⁻¹)
			200
			1600
			2000
			3000
			WAVENUMBER (CM ⁻¹)
			2500
			3000
			3400
			4000
			WAVENUMBER (CM ⁻¹)
			2500
			3000
			3400
			4000
			TRANSMITTANCE (%)
			0
			20
			40
			60
			80
			100
			TRANSMITTANCE (%)
			2.5
			3.0
			4.0
			5.0
			6.0
			7.0
			8.0
			9.0
			10.0
			12.0
			MICRONS

Gráfica 151. Estirpe G-31. Cultivo sobre parafinas lineales.
 (Control: Gráfica 10).



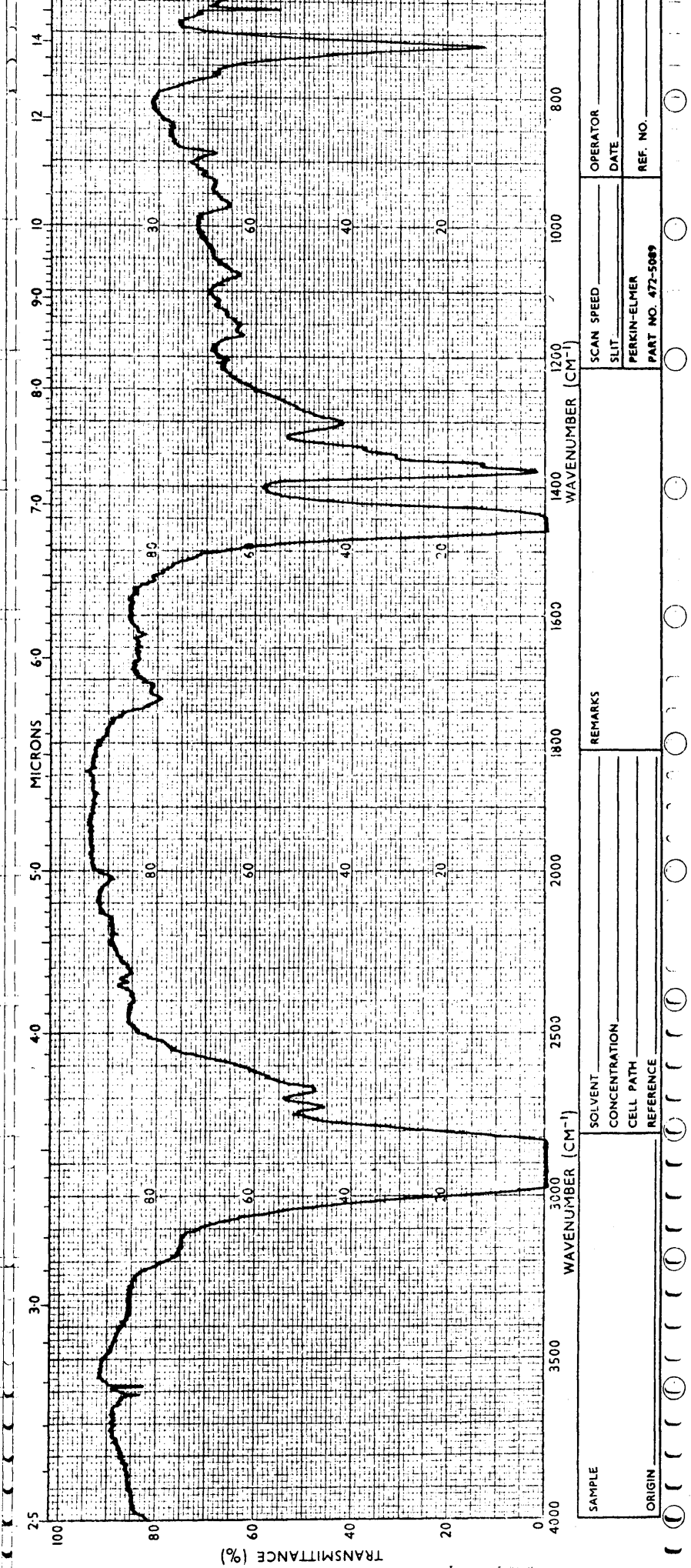
SAMPLE	SOLVENT	REMARKS	OPERATOR
ORIGIN	CONCENTRATION		DATE
	CELL PATH		REF. NO.
	REFERENCE		
		SCAN SPEED	
		SLIT	
		PERKIN-ELMER	
		PART NO. 472-5089	

Gráficas 152. Estirpe G-31. Cultivo sobre parafinas ramificadas.
 (Control: Grafica 9).

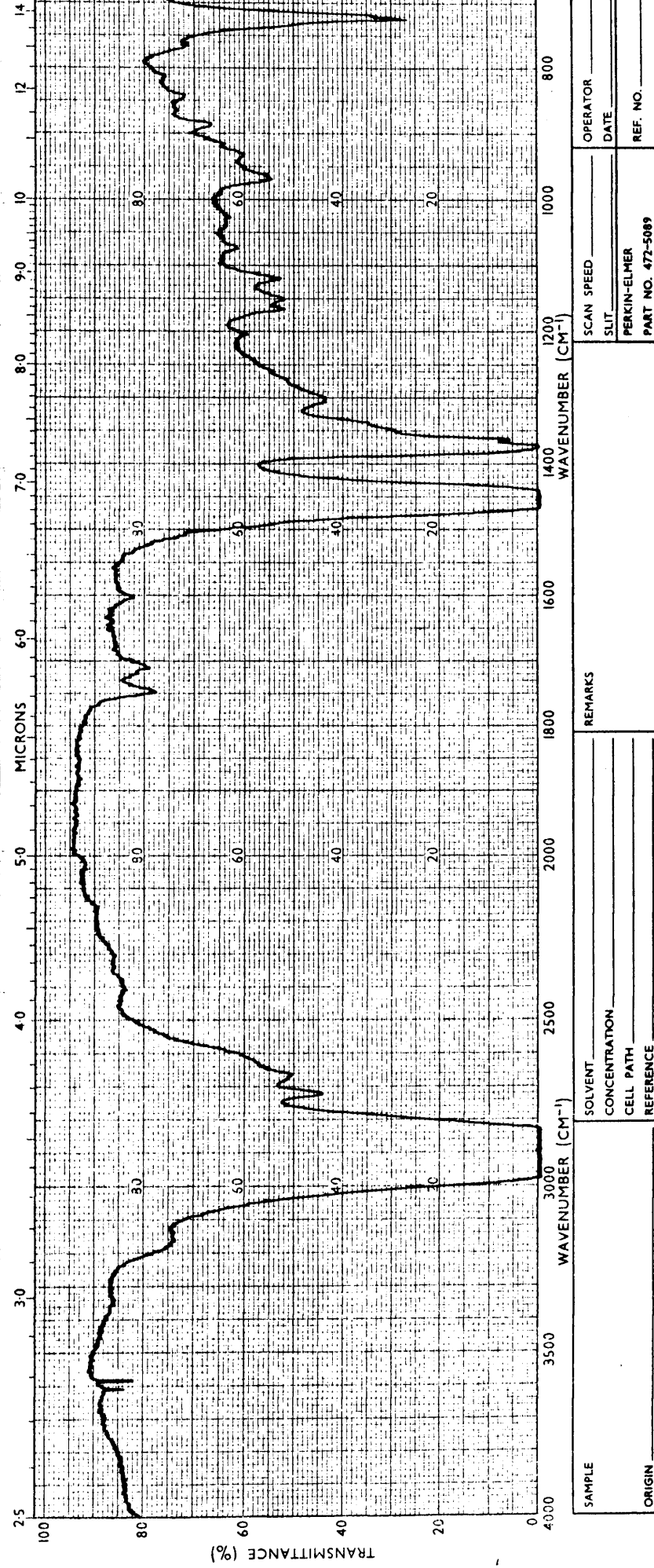


Gráfica 153. Estirpe G-31. Cultivo sobre aromáticos.

DATE	1972
LABORATORY	153
ANALYST	
PREPARED BY	
DATE	
REVISION	
APPROVED BY	
REMARKS	
SOLVENT	
CONCENTRATION	
CELL PATH	
REFERENCE	
ORIGIN	



Gráfica 154. Estirpe G-33. Cultivo sobre parafinas lineales.
 (Control:Gráfica 10).

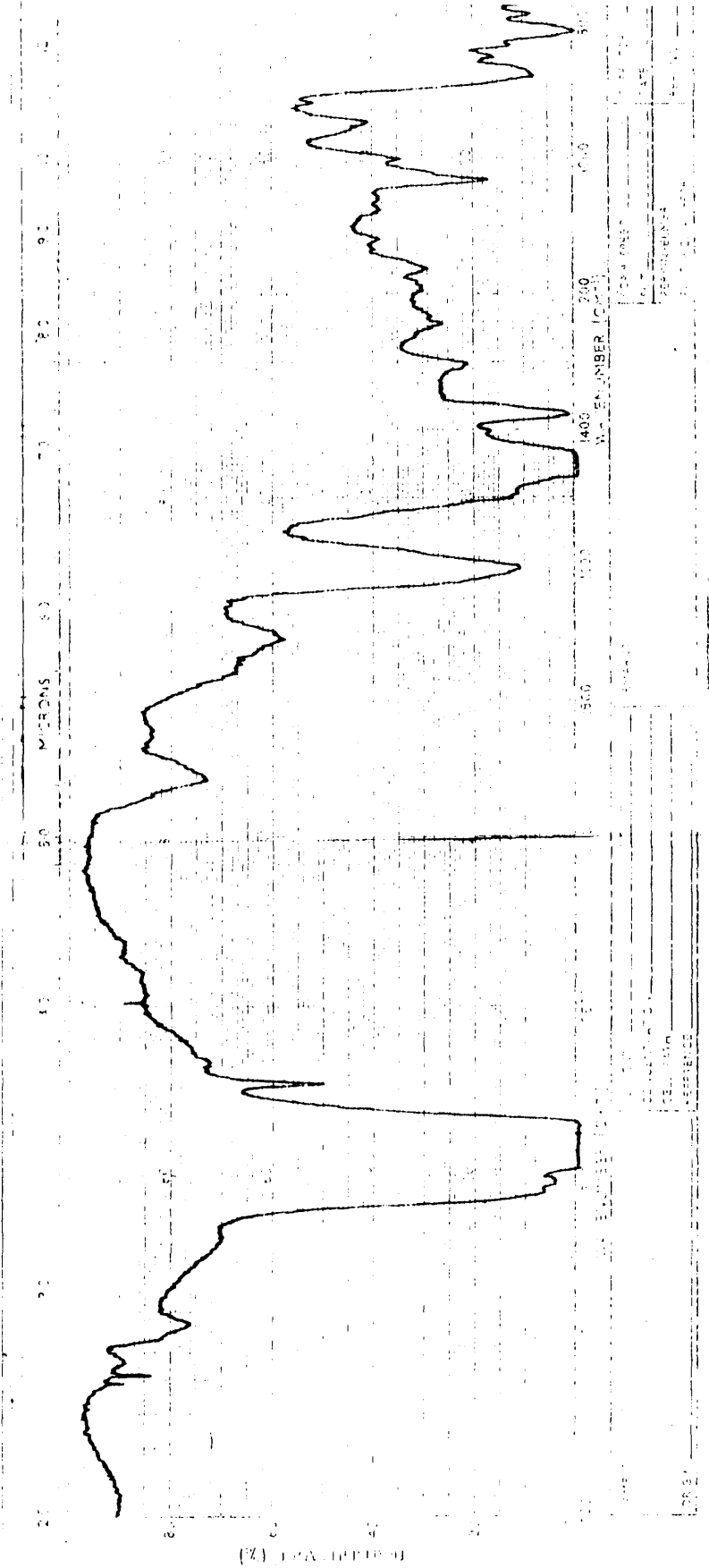


SAMPLE _____
 SOLVENT _____
 CONCENTRATION _____
 CELL PATH _____
 REFERENCE _____
 ORIGIN _____

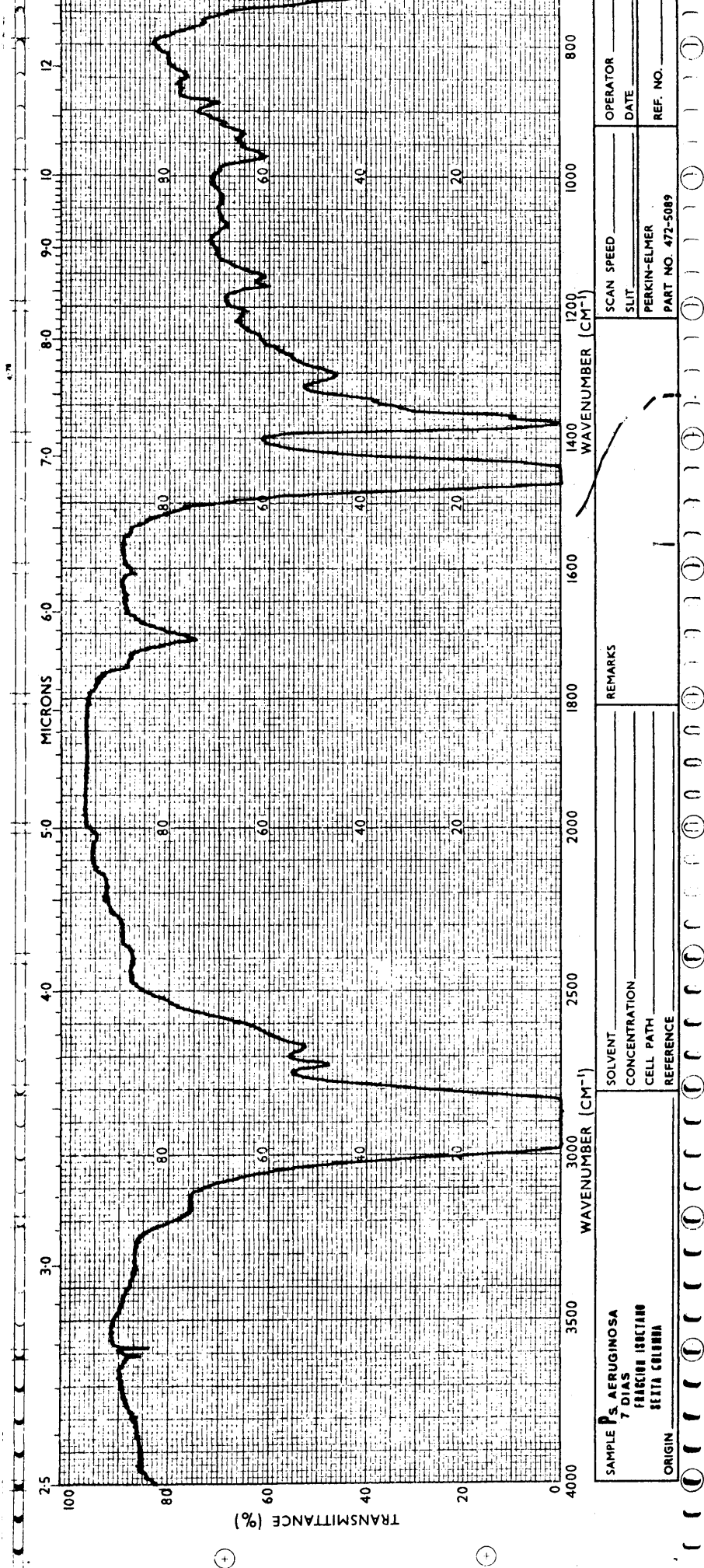
REMARKS _____

SCAN SPEED _____
 SLIT _____
 PERKIN-ELMER
 PART NO. 472-5089
 OPERATOR _____
 DATE _____
 REF. NO. _____

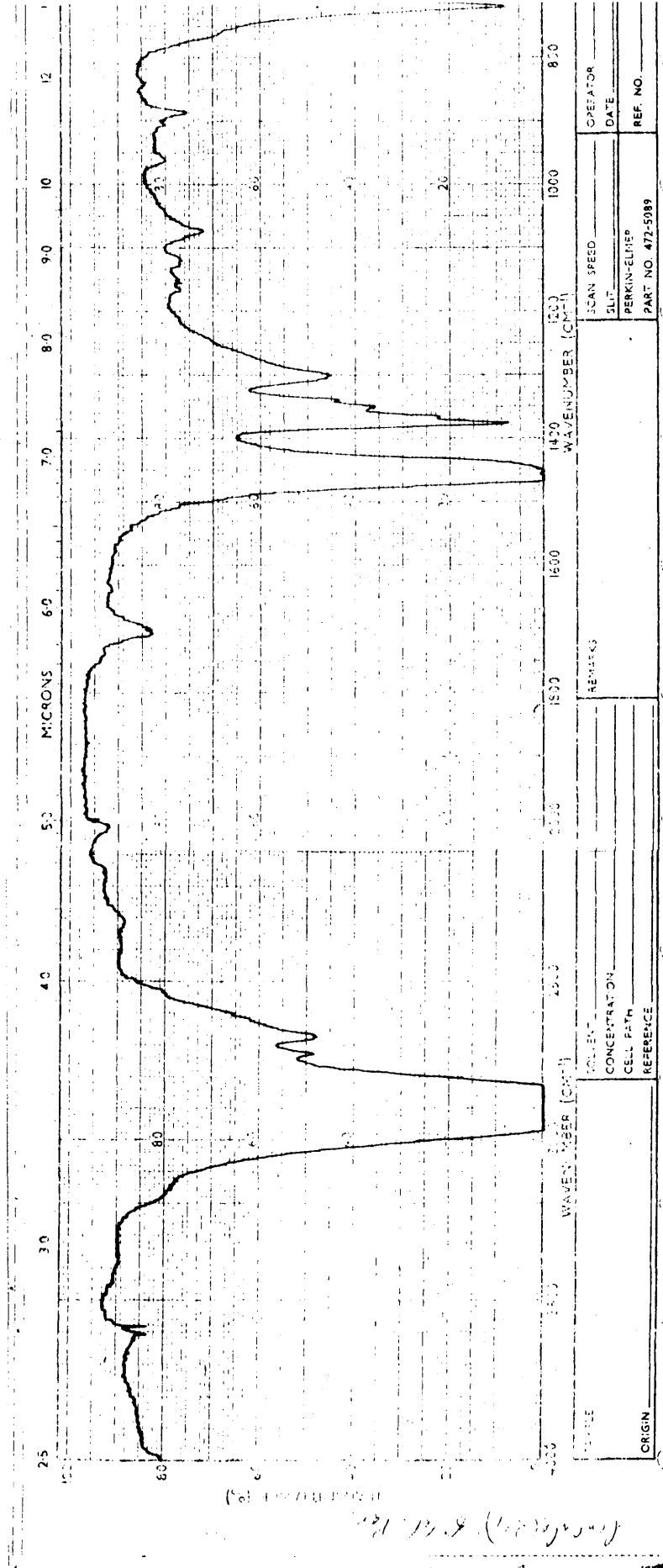
Gráfica 155. Estirpe G-33. Cultivo sobre parafinas ramificadas.
 (Control: Gráfica 9).



Gráfica 156. Estirpe G-33. Cultivo sobre aromáticos.



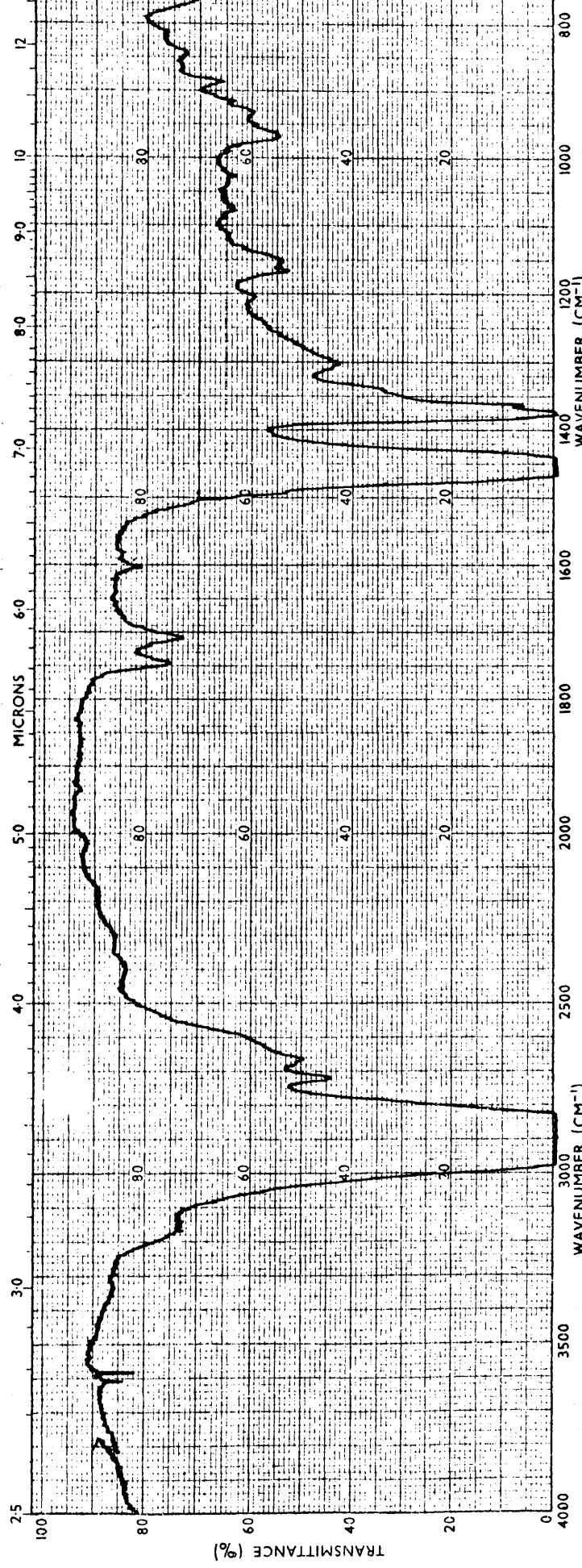
Gráfica 157. Estirpe P-34. Cultivo sobre parafinas totales..



Gráfica 158. Estirpe P-34. Cultivo sobre parafinas lineales.
 (Control:Gráfica 9).

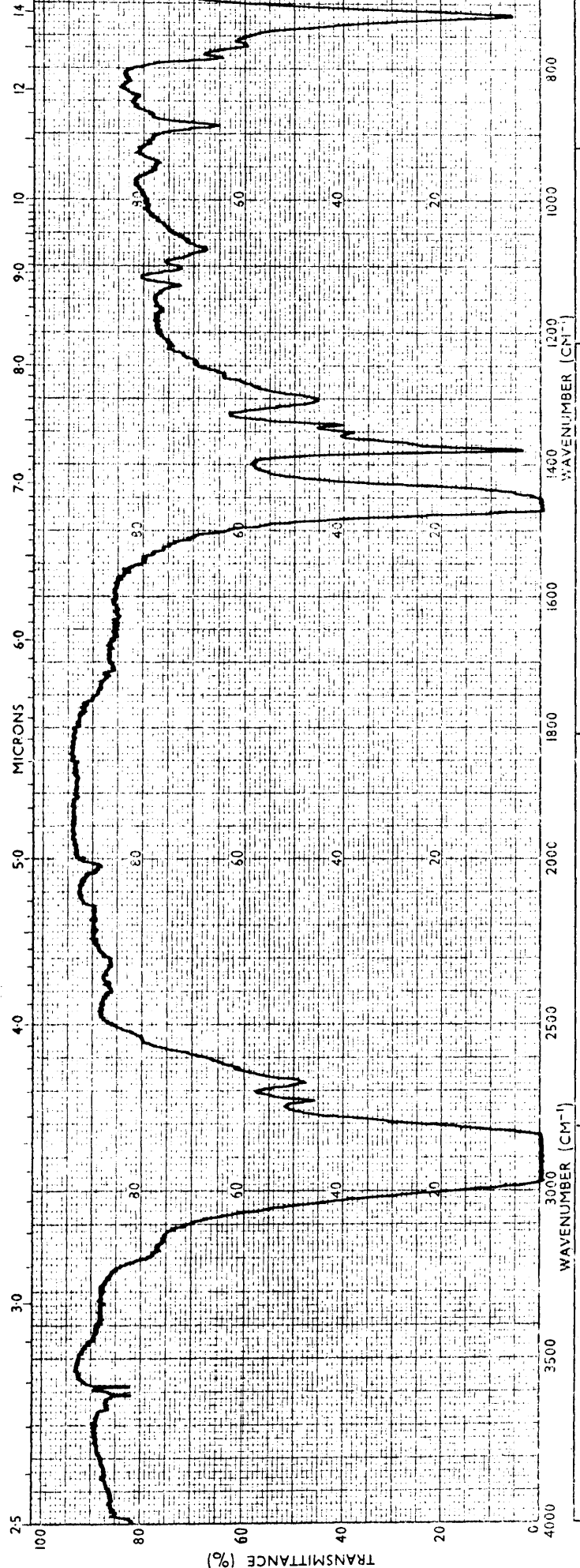
ORIGIN	PERKIN-ELMER	SCAN SPEED	OPERATOR
SAMPLE	REMARKS	SPLIT	DATE
SOLVENT		PERKIN-ELMER	REF. NO.
CONCENTRATION		PART NO. 472-5089	
CELL PATH			
REFERENCE			

(Handwritten signature)



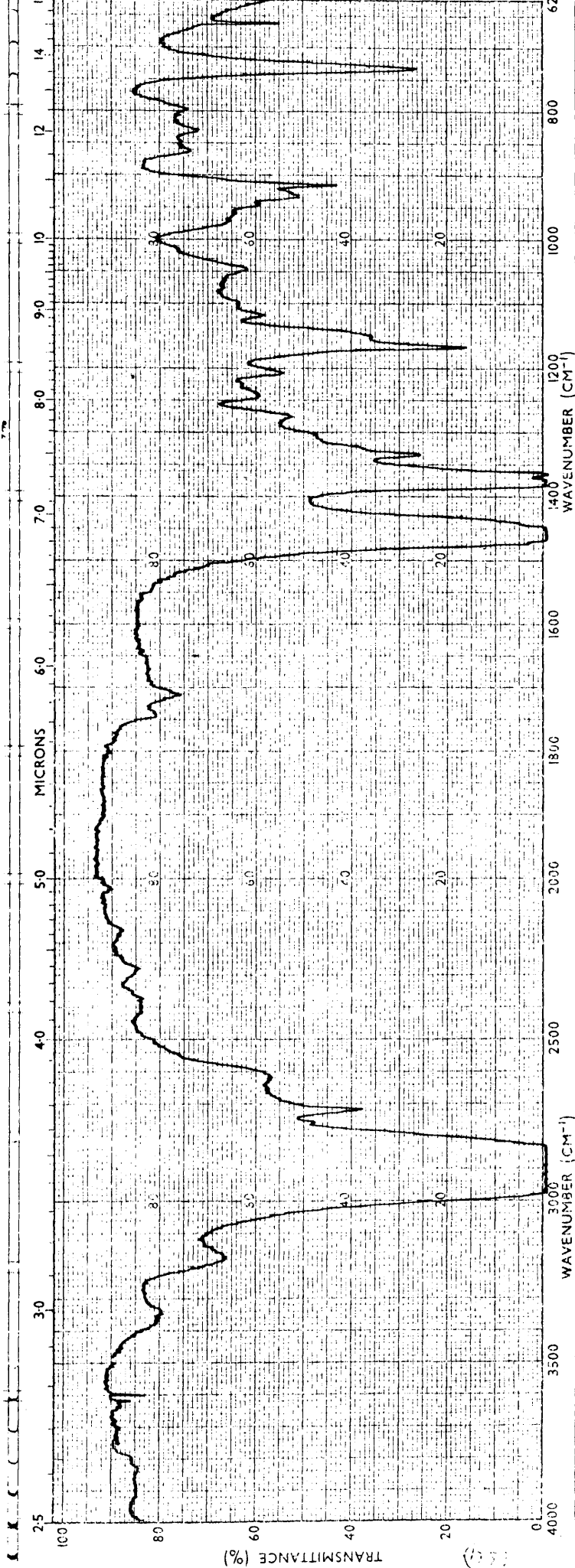
SAMPLE	SOLVENT	SCAN SPEED	OPERATOR
ORIGIN	CONCENTRATION	SLIT	DATE
	CELL PATH	PERKIN-ELMER	REF. NO.
	REFERENCE	PART NO. 472-5089	
REMARKS			

Gráfica 159. Estirpe P-34. Cultivo sobre parafinas ramificadas.
 (Control:Gráfica 9).



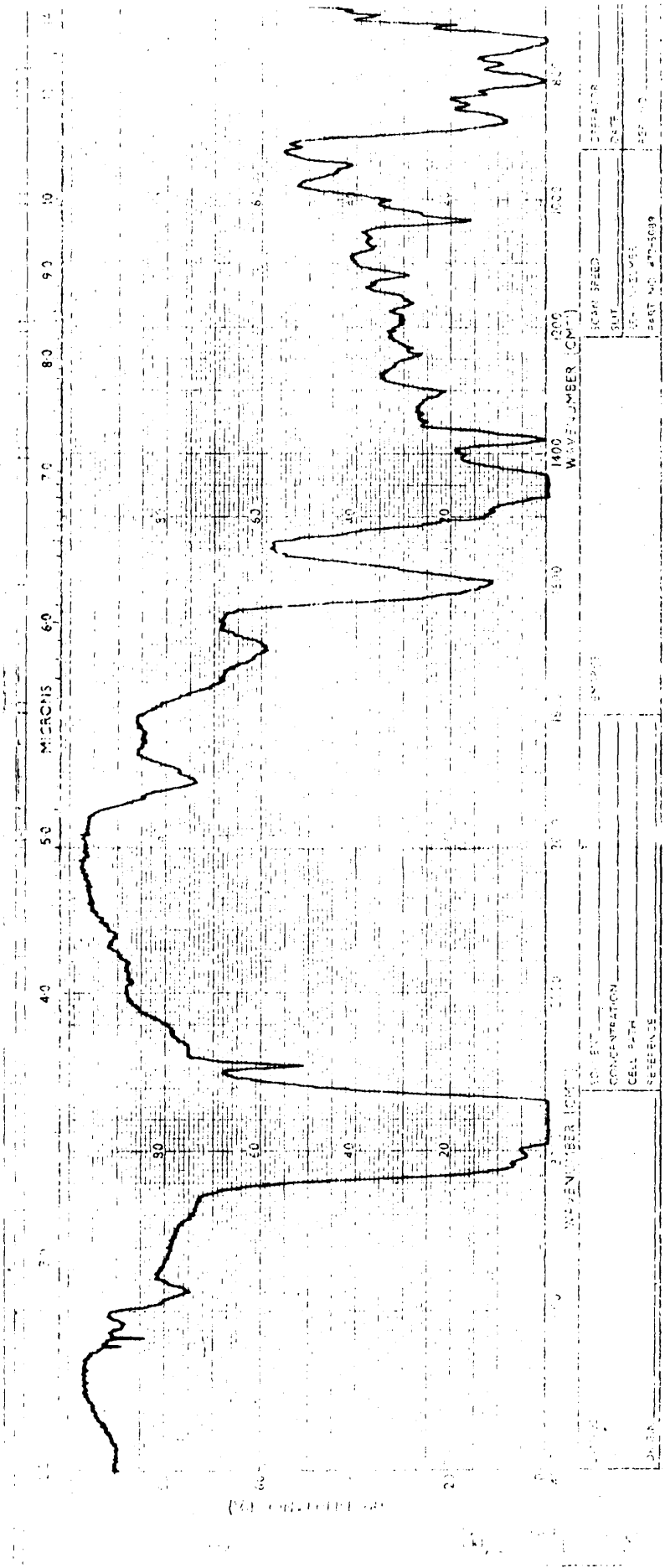
SAMPLE	SOLVENT	REMARKS	OPERATOR
ORIGIN	CONCENTRATION		DATE
	CELL PATH		PERKIN-ELMER
	REFERENCE		PART NO. 472-5089
			SCAN SPEED
			SLIT

Gráfica 160. Estirpe P-34. Cultivo sobre pentadecano.

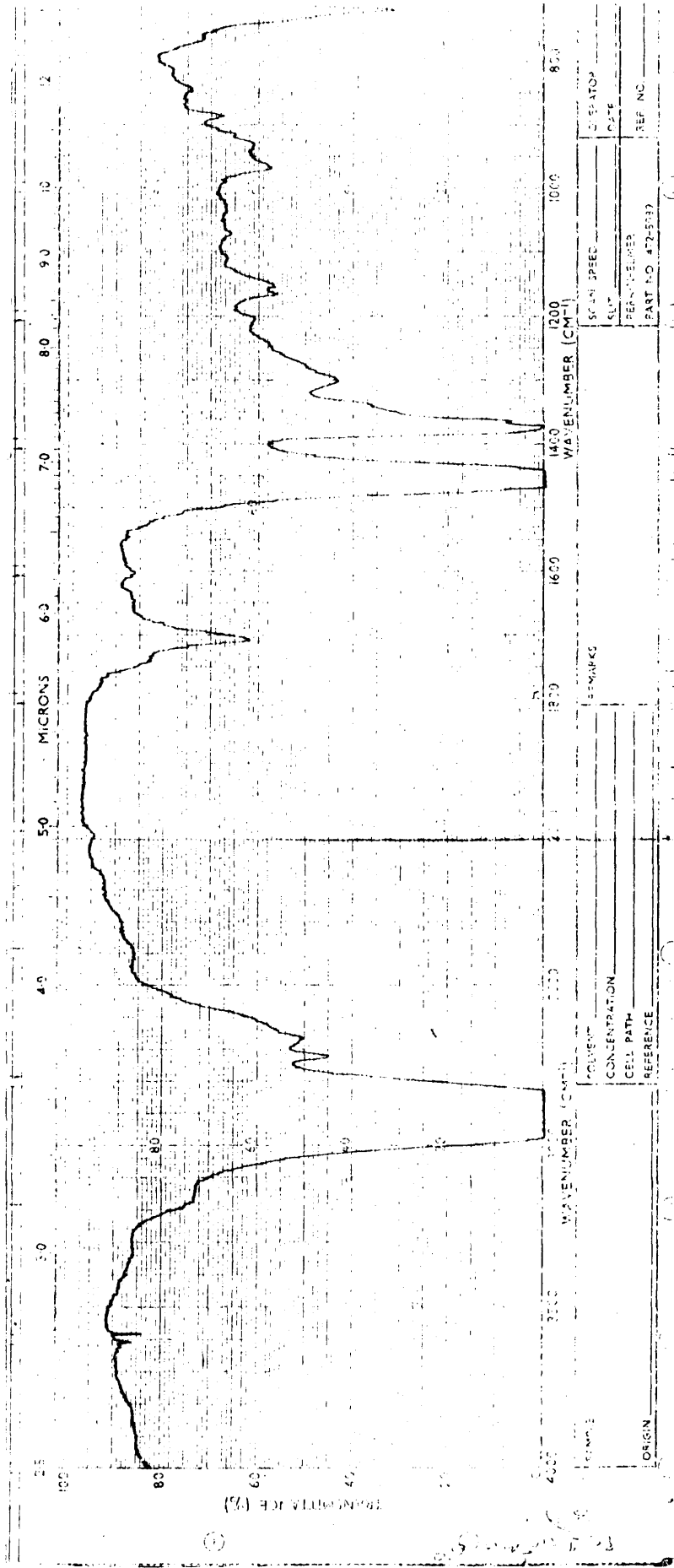


SAMPLE		SCAN SPEED		OPERATOR	
ORIGIN		SLIT		DATE	
SOLVENT		PERKIN-ELMER		REF. NO.	
CONCENTRATION		PART NO. 472-5089			
CELL PATH					
REFERENCE					
REMARKS					

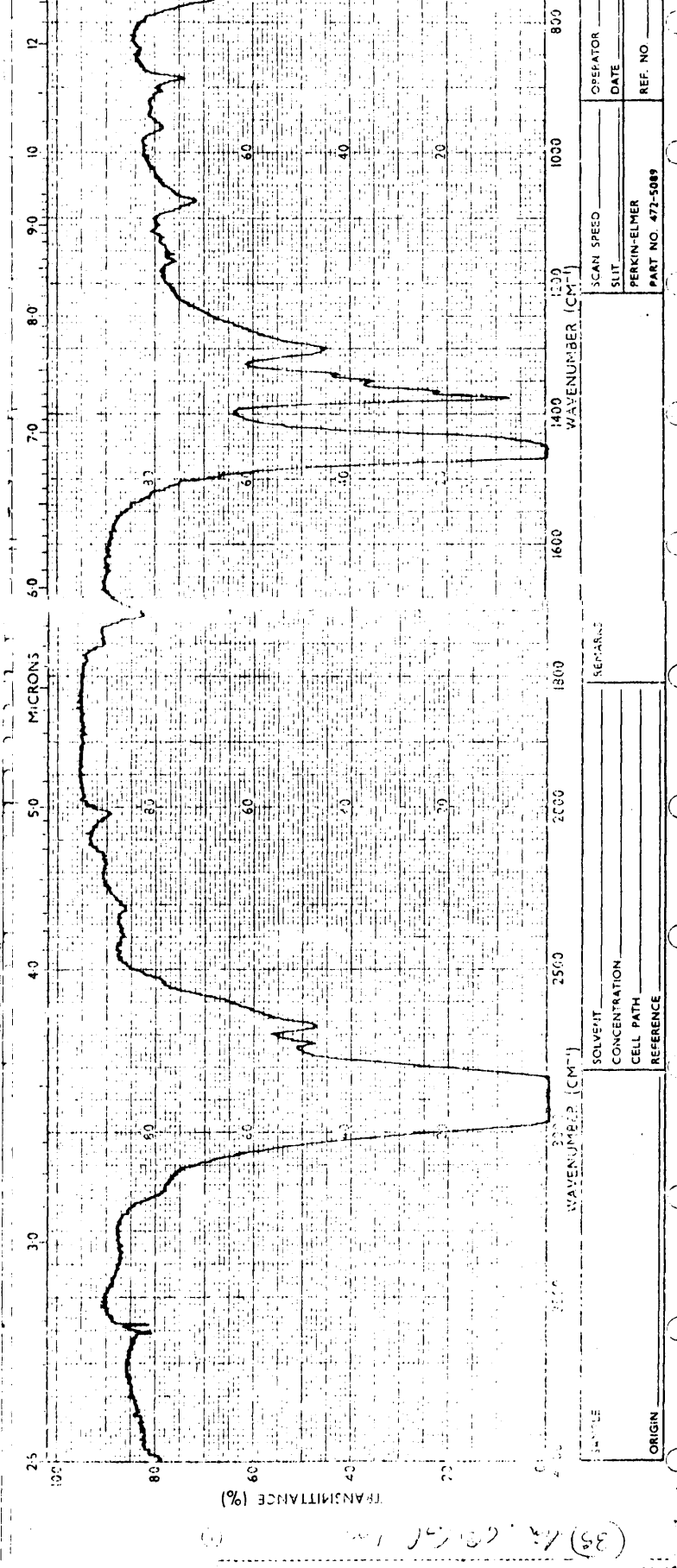
Gráfica 161. Estirpe P-34. Cultivo sobre tetrametilpentadecano.



Gráfica 162. Estirpe P-34. Cultivo sobre aromáticos.

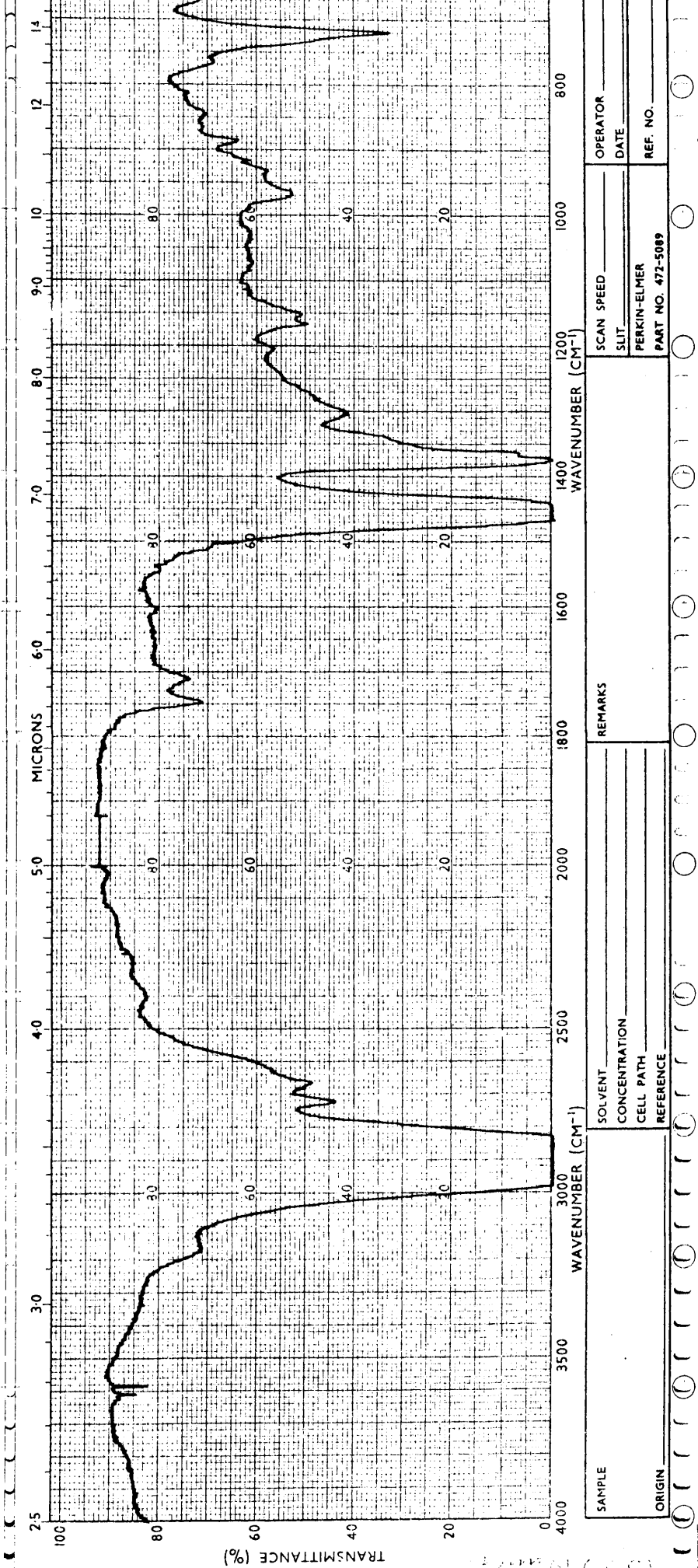


Gráfica 163. Estirpe P-35. Cultivo sobre parafinas totales.

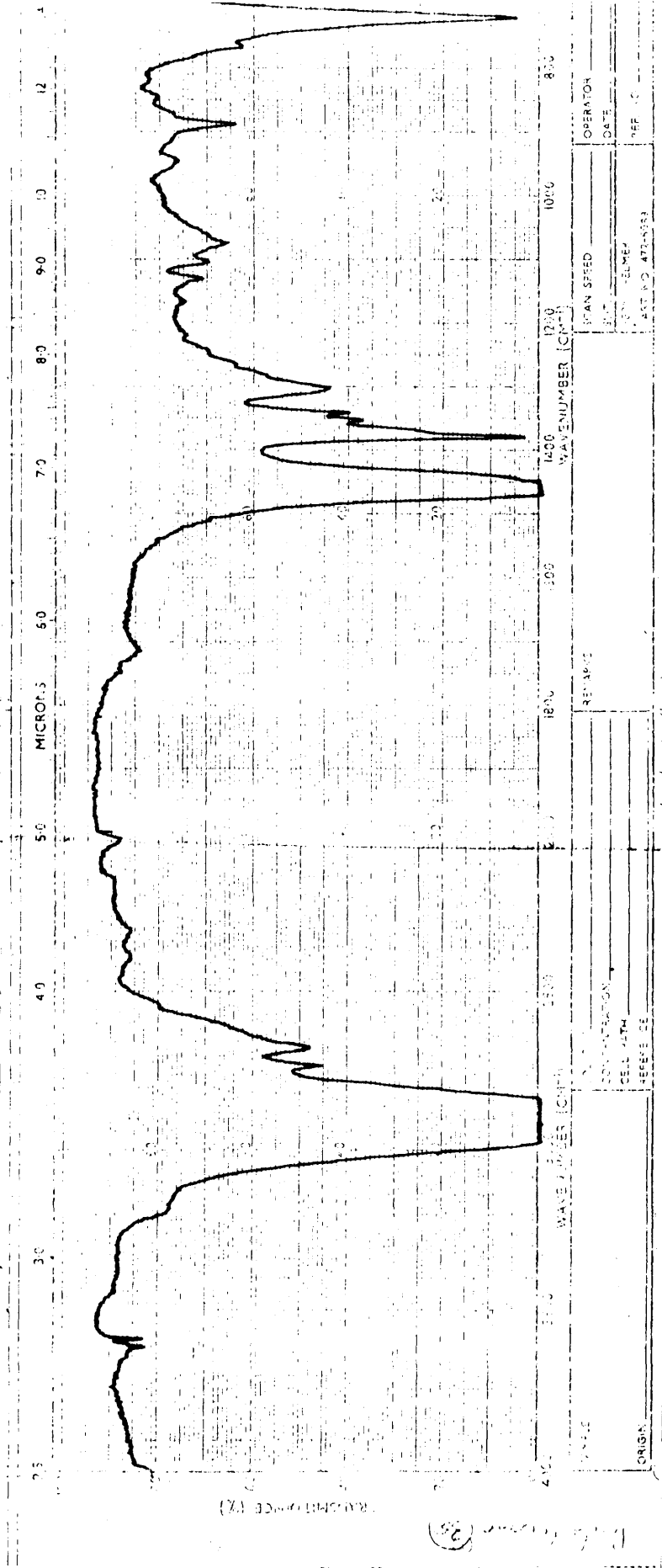


ORIGIN	SAMPLE	SOLVENT	CONCENTRATION	CELL PATH	REFERENCE	REMARKS	SCAN SPEED	OPERATOR
							1300	
							PERKIN-ELMER	DATE
							PART NO. 472-5089	REF. NO.

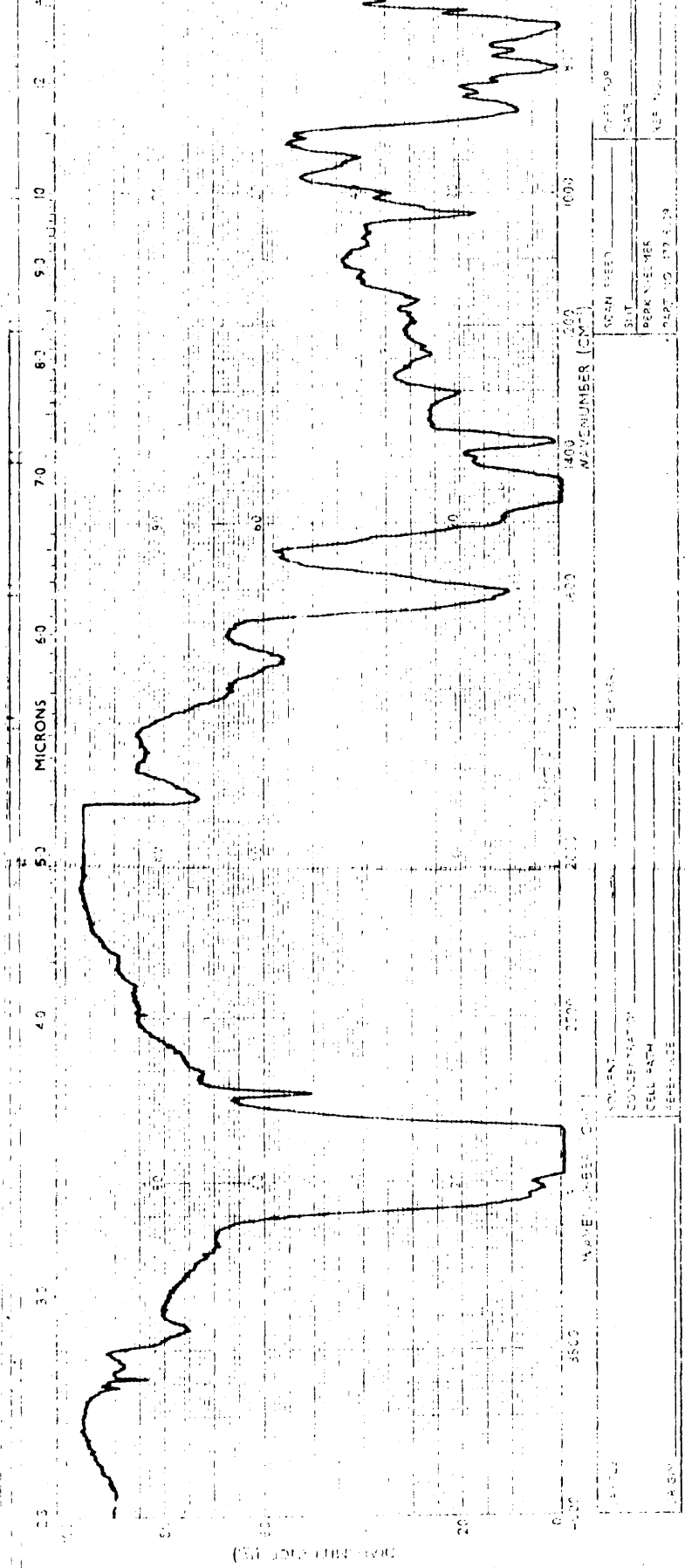
Gráfica 164. Estirpe P-35. Cultivo sobre parafinas lineales.
 (Control:Gráfica 9).



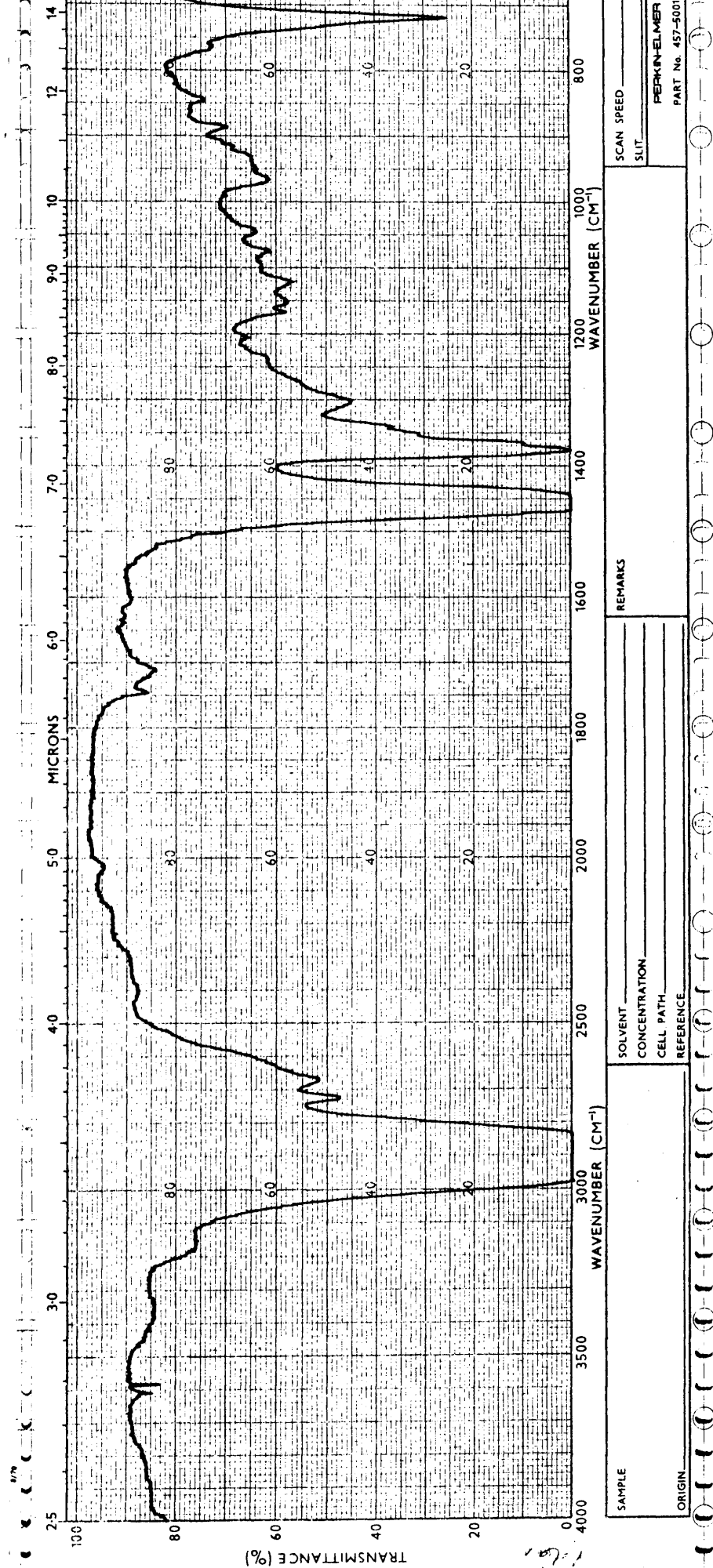
Gráfica 165. Estirpe P-35. Cultivo sobre parafinas ramificadas.
 (Control:Gráfica 9).



Gráfica 166. Estirpe P-35. Cultivo sobre pentadecano.

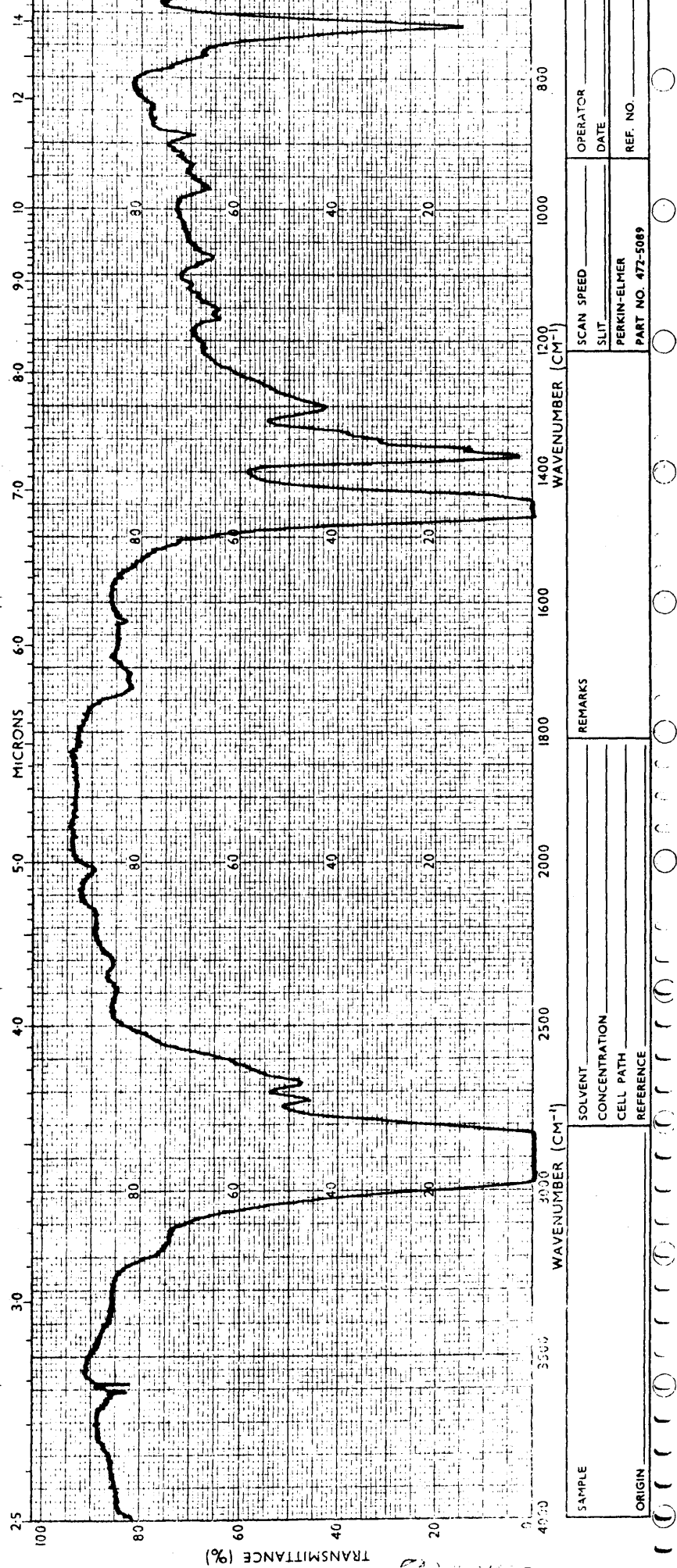


Gráfica 167. Estirpe P-35. Cultivo sobre aromáticos.



Gráfica 168. Estirpe P-37. Cultivo sobre parafinas totales.

SAMPLE _____
 ORIGIN _____
 SOLVENT _____
 CONCENTRATION _____
 CELL PATH _____
 REFERENCE _____
 REMARKS _____
 SCAN SPEED _____
 SLIT _____
 PERKIN-ELMER
 PART No. 457-5001

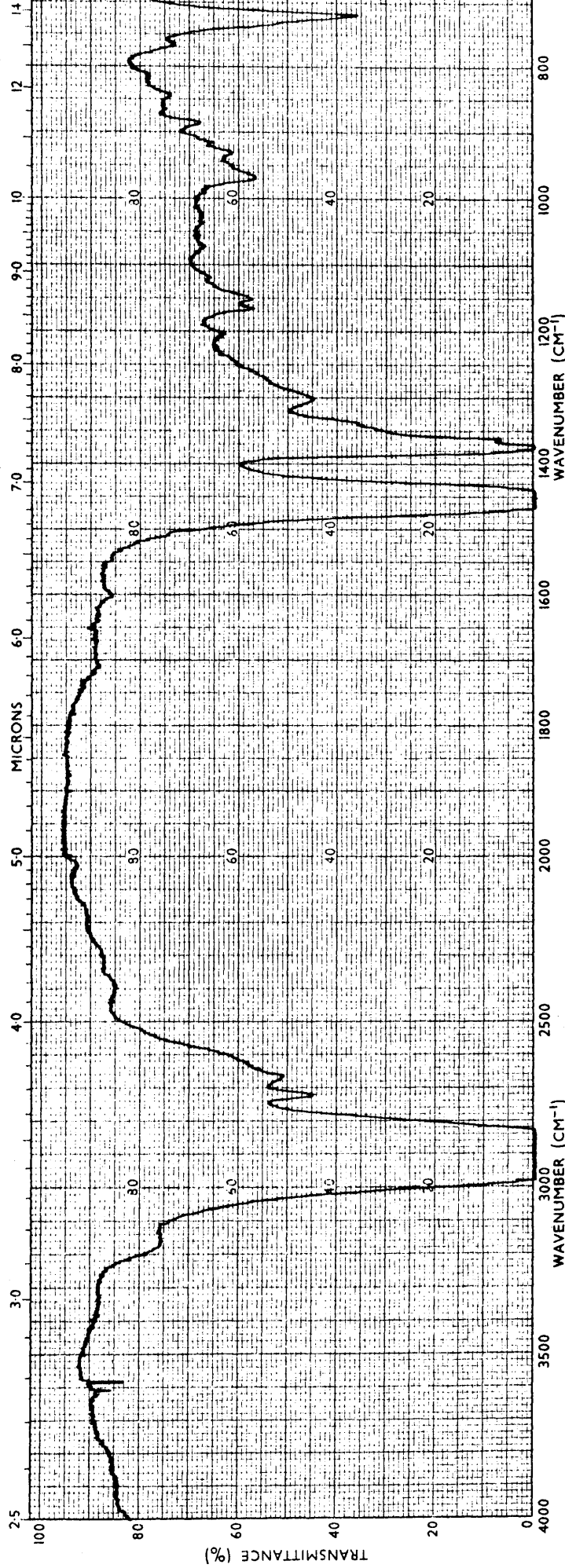


SAMPLE _____
 ORIGIN _____
 SOLVENT _____
 CONCENTRATION _____
 CELL PATH _____
 REFERENCE _____

REMARKS _____
 SCAN SPEED _____
 SLIT _____
 PERKIN-ELMER
 PART NO. 477-5089

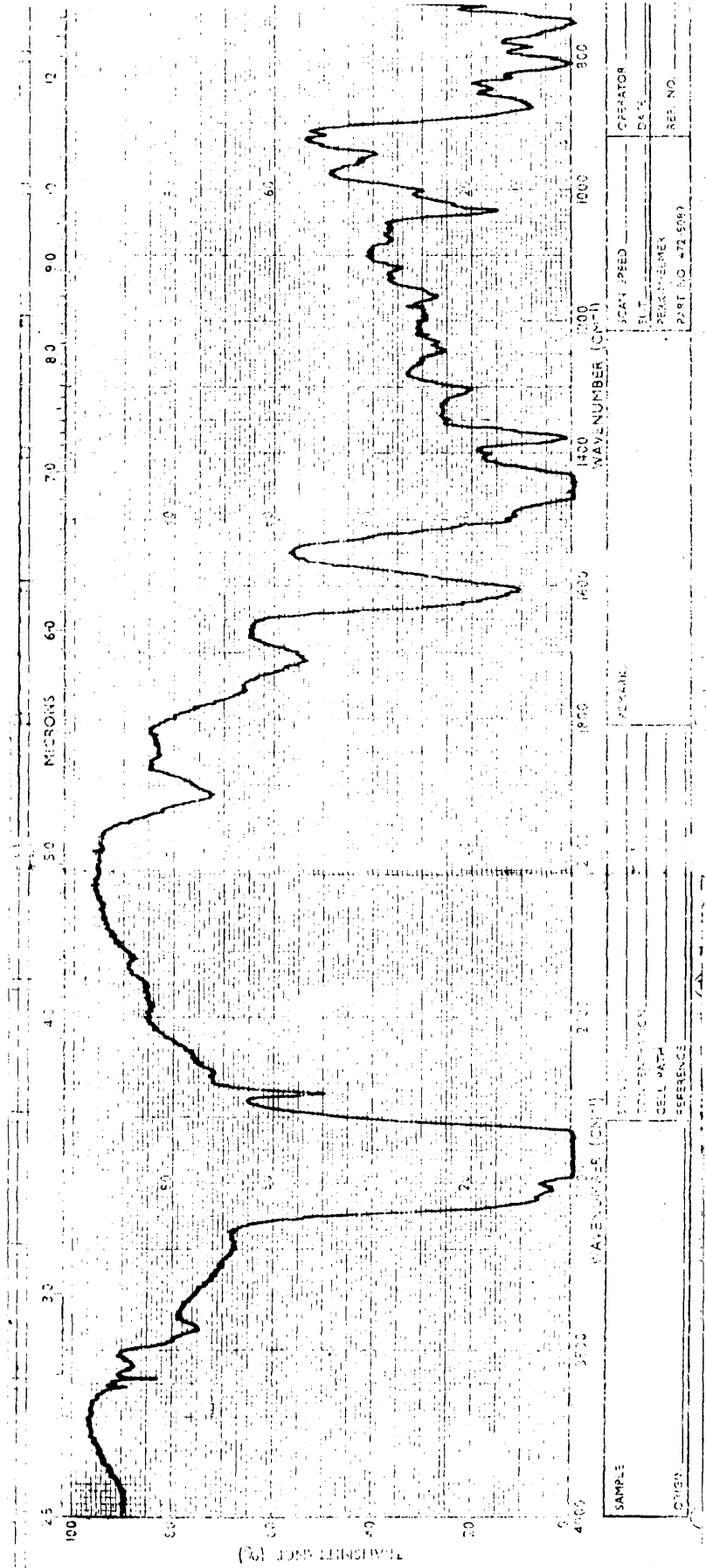
OPERATOR _____
 DATE _____
 REF. NO. _____

Gráfica 169. Estirpe P-37. Cultivo sobre parafinas lineales.
 (Control: Gráfica 10).

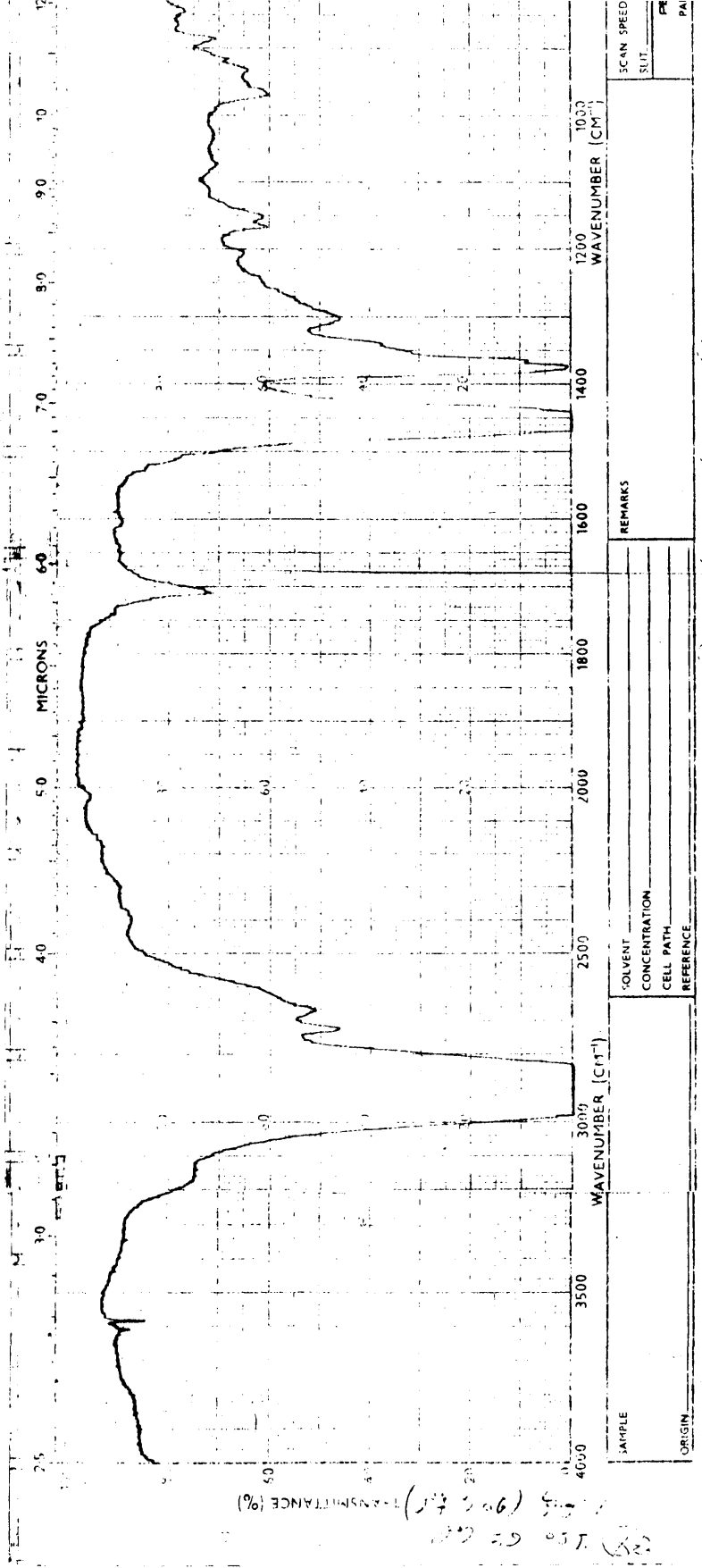


SAMPLE	SOLVENT	CONCENTRATION	CELL PATH	REFERENCE	REMARKS	SCAN SPEED	OPERATOR
						SLIT	DATE
ORIGIN						PERKIN-ELMER	REF. NO.
						PART NO. 473-5089	

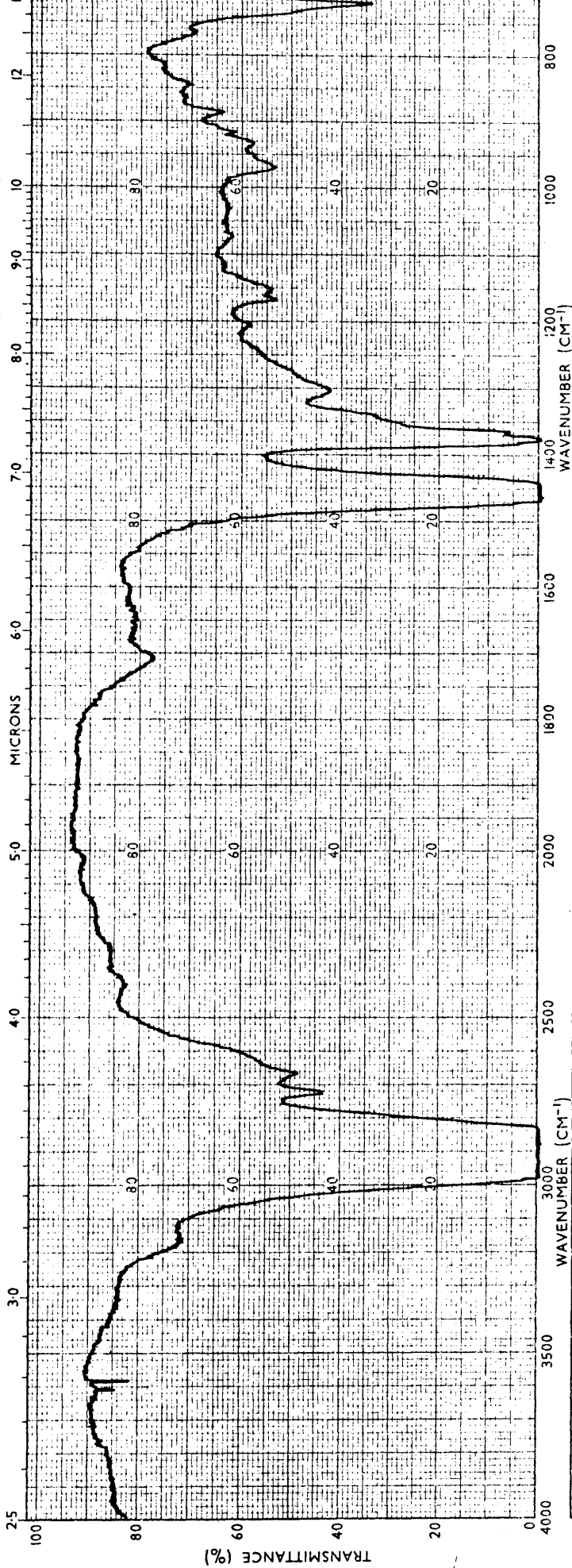
Gráfica 170. Estirpe P-37. Cultivo sobre parafinas ramificadas.
 (Control:Gráfica 9).



Gráfica 171. Estirpe P-37. Cultivo sobre aromáticos.

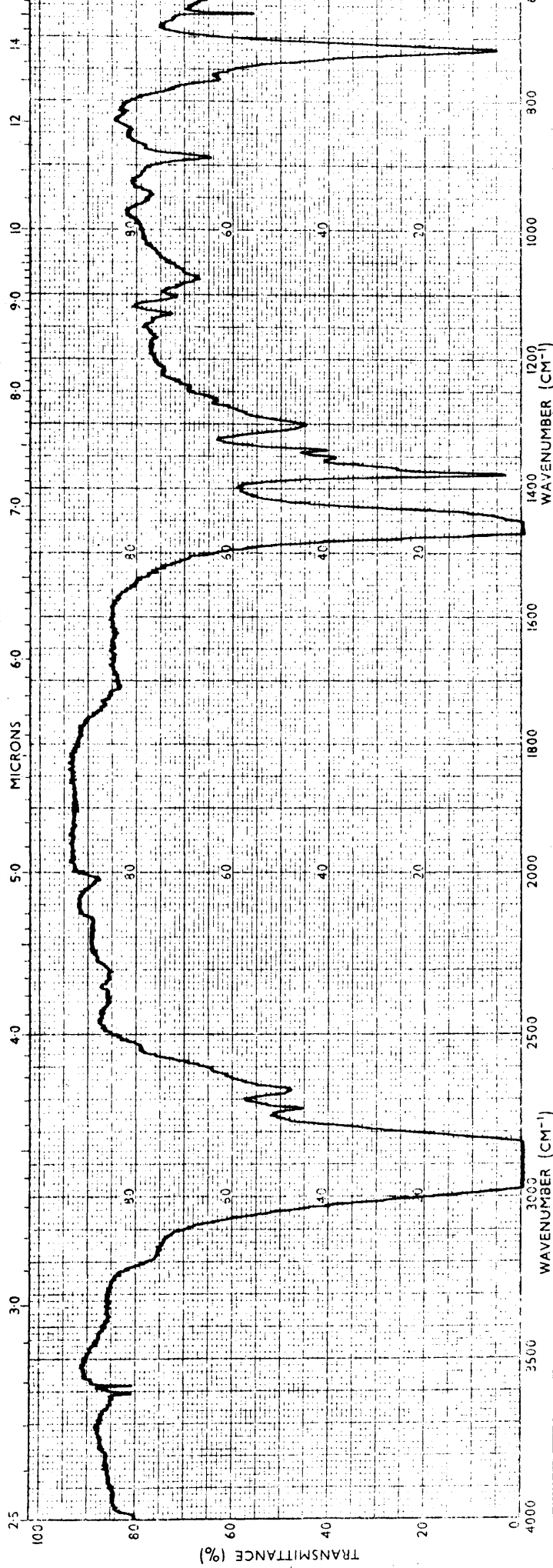


Gráfica 172. Estirpe P-38. Cultivo sobre parafinas totales.



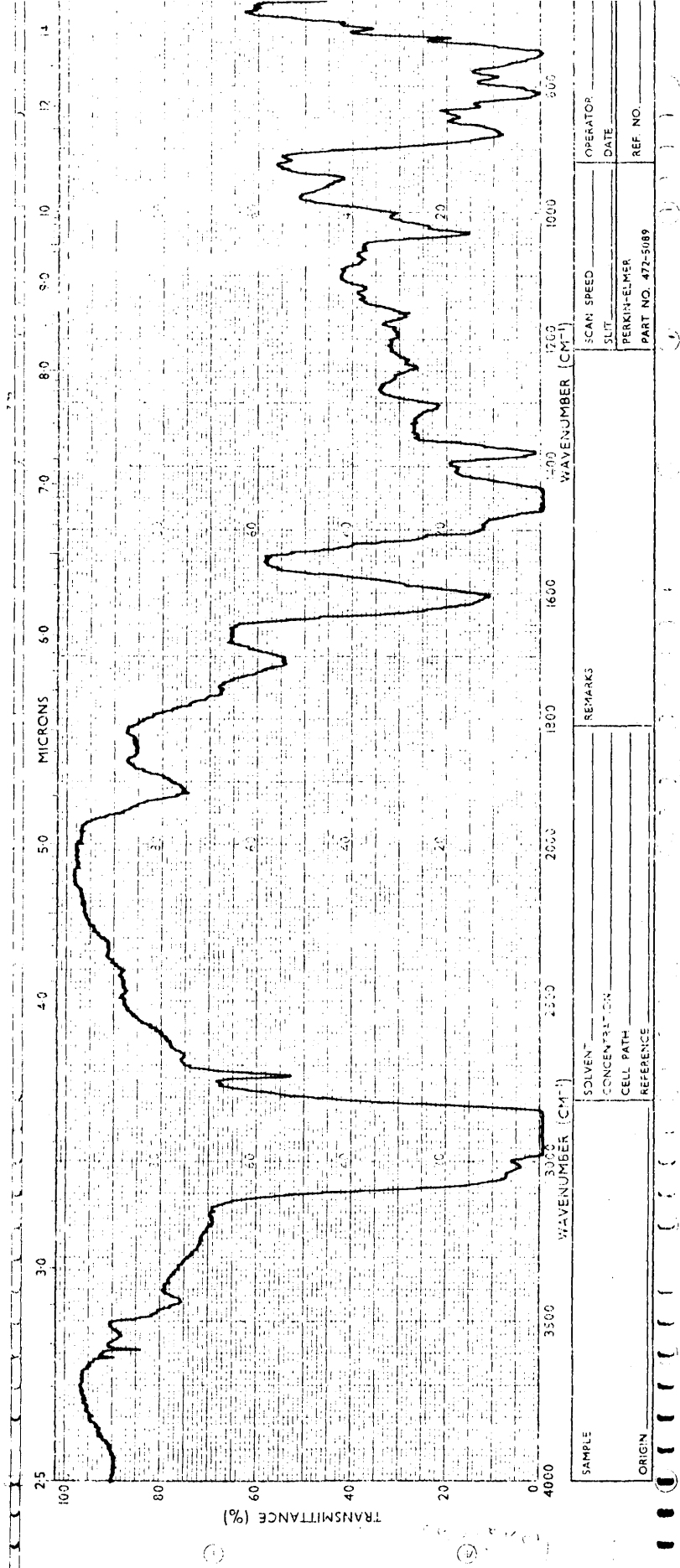
SAMPLE	SOLVENT	SCAN SPEED	OPERATOR
	CONCENTRATION	SLIT	DATE
ORIGIN	CELL PATH	PERKIN-ELMER	REF. NO.
		PART NO. 472-5089	

Gráfica 174. Estirpe P-38. Cultivo sobre parafinas ramificadas.
 (Control: Gráfica 9)



SAMPLE	SOLVENT	SCAN SPEED	OPERATOR
ORIGIN	CONCENTRATION	SLIT	DATE
	CELL PATH	PERKIN-ELMER	REF. NO.
	REFERENCE	PART NO. 472-5089	

Gráfica 175. Estirpe P-38. Cultivo sobre pentadecano.



Gráfica 176. Estirpe P-38. Cultivo sobre aromáticos.

504
ferencian de los de otras fracciones por presentar la banda a 1745 cm^{-1} más acusada que la de otros grupos carbonilos, en los pocos casos en que ha habido crecimiento.

Hay que señalar, aquí, que las estirpes del género *Pseudomonas* se caracterizan por oxidar con más facilidad las fracciones aromáticas que las parafínicas, hecho que queda bien patente en estos experimentos.

Región 1400-800: Teniendo en cuenta la poca intensidad de las bandas en la región anterior, es lógico que en esta ni siquiera aparezcan:

Solamente los espectros de cultivos sobre fracción aromática, muestran bandas -- siendo la más constante la que aparece a --- 1230 cm^{-1} que sería una banda en la que se combinan vibraciones de tensión del C-O y la flexión del OH en ácidos carboxílicos.

En los cultivos de *Ps.aeruginosa* (estirpes G-31, P-34, P-35 y P-38) en que la oxidación es más acusada aparecen bandas ya estudiadas (940, 1040, 1070 y 1245).

Región 800-625: También pocas variaciones en esta región, -- pues este género no utiliza selectivamente las parafinas lineales.

Una vez más hay que exceptuar a las estirpes de *Ps.aeruginosa* entre las que destaca la G-31 por la disminución de intensidad de la banda a 720 cm^{-1} , que prácticamente se reduce al mínimo, lo que indica que han sido utilizadas todas las parafinas lineales que había en la muestra (ver más adelante).

Para dos estirpes aparecen bandas a 725 y 690 cm^{-1} en los cultivos sobre tetrametilpentadecano, asociados con bandas de relativa intensidad a 1605 cm^{-1} , las cuales han sido ya asignadas.

Revisión de espectros.-

Los espectros sobre hidrocarburos aromáticos destacan por la gran intensidad de la banda a 1710 cm^{-1} que podemos suponer que es debida a la presencia de ácidos carboxílicos. El crecimiento sobre dicha fracción fue superior al de otras estirpes en general, y contrasta con el crecimiento muy pobre en las fracciones parafínicas.

Para la estirpe Pa-23 aparece una banda fuerte a 675 cm^{-1} que tal vez indica la presencia de anillos aromáticos monosustituídos, pero es difícil de asignar no estando acompañada de otras.

Las estirpes de *Pseudomonas aeruginosa*, G-31, P-34, P-35 y P-38 muestran una gran actividad frente a las parafinas lineales, más patente en la primera de ellas. Esta estirpe no produce en cambio bandas intensas de carbonilos, lo que debe indicar una oxidación total de las cadenas teniendo en cuenta el gran crecimiento que se aprecia en el cultivo sobre la fracción de parafinas lineales, hecho que queda apoyado también -- por la disminución de la banda a 720 cm^{-1} en el cultivo sobre parafinas totales. La estirpe P-34 ha sido objeto de un estudio más detallado (ver más adelante).

Las estirpes G-34 y P-34 muestran bandas a 725 y 690 cm^{-1} relacionadas con las bandas a 1605 cm^{-1} , de compuestos -- aromáticos.

espectros de cultivos y sus respectivos controles.

Estirpe	Parafinas totales	Parafinas lineales	Parafinas ramificadas	Pentadecano	Tetrametilpentadecano	Aromáticos
P-7	3600-3100 (d) 1710 (m) 1805 (d) 1300-800(aumenta) 1040 (d) 720 (disminuye)	No crece	3600-3100 (d) 1710 (m) 1300-800 (aumenta) 1120* (d) 1040 (d)	3500-3100 (d) 1740 (d) 1710 (d) 1300-800(aumenta) 720 (disminuye)	3500-3100 (d) 1740 (d) 1710 (m) 1300-800 (aumenta)	3400-3100 (d) 1710 (m) 1300-900 (aumenta)
K-10	No crece	No crece	No crece	No crece	3500-3100 (d) 1745 (m) 1715 (m) 1020 (m) 730 (disminuye)	3400-3100 (m) 1710 (f) 1300-800 (aumenta)
G-11	1712 (m) 1600 (d) 1300-800(aumenta)	No crece	No crece	No crece	2500-3100 (d) 1740 (d) 1712 (m) 730 (disminuye)	3400-3100 (m) 2800-2500 (m) 1710 (f) 1300-900 (aumenta)
Q-12	1710 (m) 1800 (d) 1300-800(aumenta) 720 (disminuye)	720 (disminuye)	Sin variaciones	No crece	No crece	3400-3100 (f) 1705 (f) 1300-900 (aumenta) 1260 (d) 1120* (d) 1020 (d)
A-13	1735 (d) 1710 (d) 1120* (d) 720 (disminuye)	No crece	No crece	No crece	No crece	3400-3100 (m) 2700-2500 (m) 1710 (f) 1280 (d) 1300-900 (aumenta)
A-14	1710 (m) 1120* (m) 720 (disminuye)	Sin variaciones	3500-3100 (m) 1710 (f) 1300-800 (aumenta)	No crece	No crece	3400-3100 (m) 2700-2500 (m) 1710-1700 (f) 1230 (d) 1300-900 (aumenta)
K-15	1710 (m) 1270 (aumenta) 1300-800(aumenta) 720 (disminuye)	3500-3100 (d) 1720 (m) 1630 (d) 1300-800(disminuye) 720 (disminuye)	3600-3100 (d) 1710 (m) 1300-800 (aumenta)	No crece	1745 (d) 1710 (d) 1300-800(aumenta) 800 (aumenta) 735 (disminuye)	3400-3100 (m) 2800-2500 (d) 1710 (m) 1230 (aumenta) 1300-900 (aumenta)
Q-16	3600-3100 (m) 1710 (d) 1300-800(aumenta) 720 (disminuye)	1710 (d) 720 (disminuye)	1710 (m) 1300-800 (aumenta)	No crece	No crece	3400-3100 (m) 1710 (m) 1725 (d) 1300-900 (aumenta)
Pa-17	1740 (d) 1710 (m) 720 (disminuye)	2300 (aumenta) 1740 (d) 1710 (d) 720 (disminuye)	3600-3100 (d) 1710 (m)	3600-3100 (d) 1720- 10 (d) 1650 (d) 720 (disminuye)	Sin variaciones	3400-3100 (d) 1710 (m) 1230 (aumenta) 1300-900 (aumenta)
Pa-18	1710 (d)	3600-3100 (d) 1770-1600 (d) (no se diferencian bandas) 1300-800(aumenta) 720 (disminuye)	3600-3100 (m) 1710 (m) 1300-800(aumenta)	1748 (d) 1720- 10 (d) 1300-800(aumenta) 720 (disminuye)	3500-3100 (d) 1745 (m) 1710 (f) 1170 (disminuye) 920 (disminuye) 735 (disminuye)	3400-3100 (d) 2700-2500 (d) 1705 (m) 1300-900 (aumenta)
K-22	No crece	1740 (d) 1710 (d) 720 (disminuye)	1740 (d) 1710 (d) 1805 (d)	1750 (m) 1710 (d) 1165 (aumenta) 720 (disminuye)	Sin variaciones	3530 (m) 3500-3100 (f) 1705 (f) 1300-1100 (aumenta)
Pa-23	No crece	3500-3100 (d) 2400 (d) 1710 (d) 1630 (d) 885 (disminuye) 720 (disminuye)	3500-3100 (d) 1710 (m) 1605 (d) 1300-800(aumenta)	1750 (m) 1710 (d) 1165 (aumenta) 720 (disminuye)	1740 (d) 1710 (m) 1600 (d) 1120* (m)	3400-3100 (m) 2700-2500 (m) 1710 (m) 1300-900 (aumenta) 1230 (aumenta) 1120* (m) 875 (f)
Q-26	1710 (m) 1300-800(aumenta) 720 (disminuye)	3500-3100 (d) 1730 (m) 1710 (d) 1630 (d) 1300-800(aumenta)	1710 (m) 1605 (d) 1300-800(aumenta)	1750 (m) 1710 (m) 1690 (d) 785 (f) 720 (disminuye)	No crece	3400-3100 (m) 2700-2500 (d) 1710 (m) 1300-900 (aumenta) 1120* (f)
Q-31	3600-3100 (m) 1710 (f) 1805 (d) 1300-800(aumenta) 1245 (d) 1155 (d) 1030-40 (d) 935 (d) 720 (disminuye)	3600-3100 (m) 2300 (d) 1730 (m) 1710 (f) 1630 (d) 1300-800(aumenta) 720 (disminuye)	3600-3100 (m) 1750 (f) 1710 (f) 1605 (d) 1245 (d) 1300-800(aumenta) 720 (disminuye)	No cultivado	No cultivado	3400-3100 (m) 2700-2500 (d) 1710 (m) 1300-900 (aumenta)
Q-33	No crece	3600-3100 (d) 1730 (m) 1710 (d) 1630 (d) 1300-800(aumenta) 1135 (d)	1750 (f) 1710 (f) 1605 (m) 1120* (f) 725 (f) 690 (f)	No crece	No crece	3400-3100 (m) 2700-2500 (d) 1710 (m) 1300-900 (aumenta)
P-34	3600-3100 (m) 1745(hombro,d) 1710 (f) 1805 (d) 1300-800(aumenta) 720 (disminuye)	1750-40(hombro,d) 1710 (m) 720 (disminuye)	1745 (f) 1710 (f) 1605 (m) 1300-800(aumenta) 725 (f) 690 (f)	3500-3100 (d) 1800-1600 (d) 785 (m) 720 (disminuye)	3600-3100 (d) 1750 (d) 1710 (m) 1120* (m) 1045 (f) 860 (d)	3400-3100 (d) 1710 (d) 1300-900 (aumenta) 1120* (m)
P-35	3600-3100 (d) 1750-40(hombro,d) 1710 (f) 1605 (d) 1070 (aumenta) 930 (aumenta) 1300-800(aumenta) 720 (disminuye)	1750(hombro,d) 1710 (m) 720 (disminuye)	3600-3100 (m) 1750 (f) 1710 (f) 1605 (d) 1300-800(aumenta)	3500-3100 (d) 2310 (d) 2290 (d) 1750(hombro,d) 1715 (d) 1300-800(aumenta) 720 (disminuye)	Sin variaciones	3400-3100 (m) 2700-2500 (m) 1710 (m) 1300-900 (aumenta) 1120* (m)
P-37	3600-3100 (d) 1745 (d) 1710 (m) 1605 (d) 1235 (d) 1120* (m) 1045 (m) 940 (aumenta) 840 (aumenta) 720 (disminuye)	1730 (m) 1710 (m) 1630 (d) 720 (disminuye)	Variaciones muy débiles en la región 1700 - 1600	No crece	No crece	3400-3100 (m) 2700-2500 (m) 1710 (m) 1120* (d) 1300-900 (aumenta)
P-38	1745(hombro,d) 1710 (f) 1605 (d) 1075 (aumenta) 930 (aumenta) 720 (disminuye)	1750(hombro,d) 1710-1700 (m) 930 (d) 720 (disminuye)	3600-3100 (m) 1710 (m) 1600 (d) 1300-800(aumenta)	3500-3100 (d) 1710 (d) 1300-800(aumenta) 720 (disminuye)	Sin variaciones	3500-3100 (m) 2700-2500 (d) 1710 (m) 1120* (m) 1300-900 (aumenta)

4.6.2.7. - Resultado de los cultivos de las especies de los géneros Achromobacter y Alcaligenes.

Los valores de crecimiento y pH final de estos cultivos se dan en la tabla LXX.

Se incluyen en este grupo las estirpes Pa-24 y G-25. Los espectros correspondientes están representados en las gráficas 177 a 184.

Las bandas diferenciales de estos espectros respecto de los controles, se recogen en la tabla LXXI.

Asignación de bandas y discusión.

En las estirpes de este grupo, algunos espectros presentan la misma forma general (especialmente entre 1800-1700 cm^{-1}) que el grupo anterior. Sin embargo, en presencia de parafinas lineales el tipo de oxidación es muy peculiar, siendo de destacar las bandas intensas en comparación con otros espectros, en la región 3500-3100 cm^{-1} . Tal vez estas bandas justifiquen la absorción, no muy definida, que en estos espectros aparece entre 1150 y 1000 cm^{-1} , pues las bandas de carbonilos son, por el contrario, débiles.

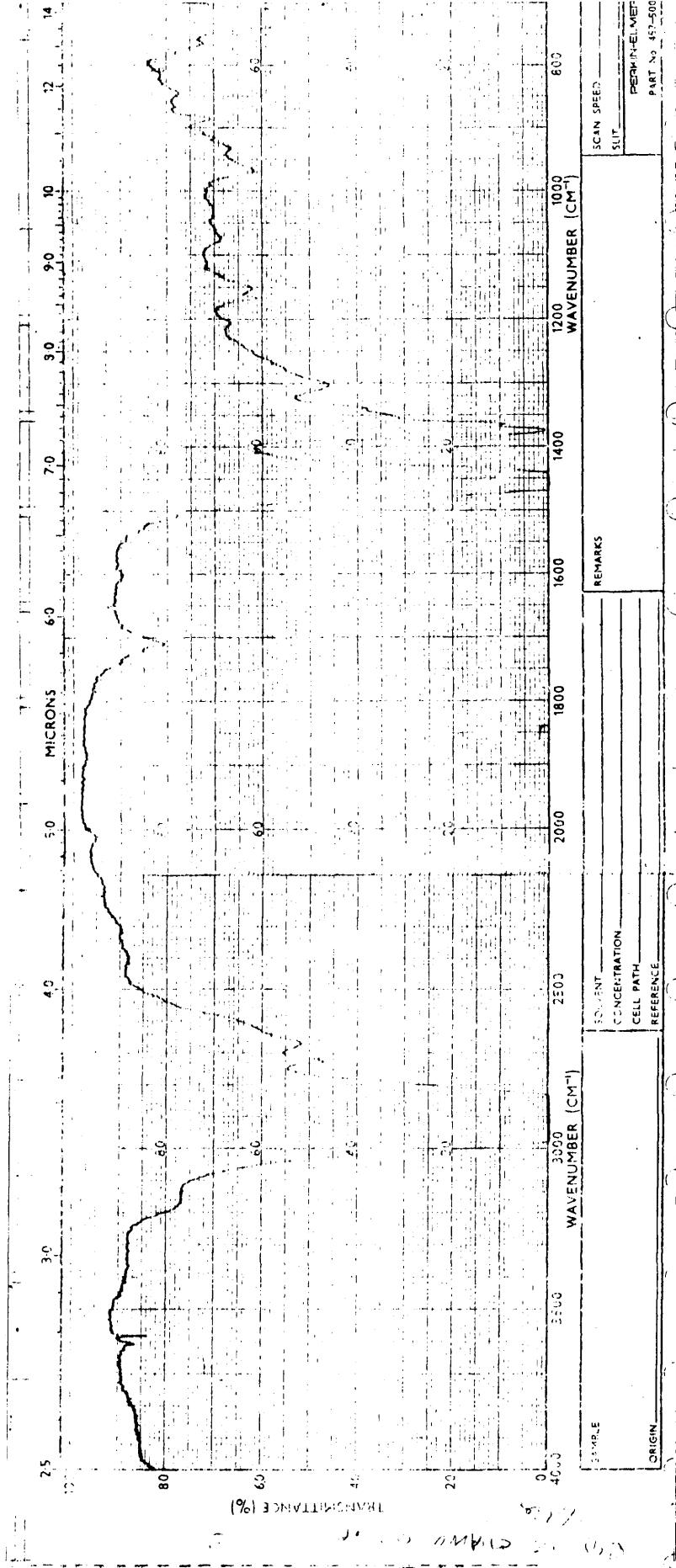
En el espectro de la estirpe G-25 sobre parafinas lineales, aparecen dos bandas distintas en la región de OH, lo que sugiere dos tipos de alcoholes. Quizá por ello aparecen -- gran variedad de bandas en la región 1400-800, pero estas bandas son muy difíciles de asignar.

Tabla LXX: Valores de crecimiento y pH final de los cultivos de estirpes de los géneros Achromobacter y Alcaligenes.

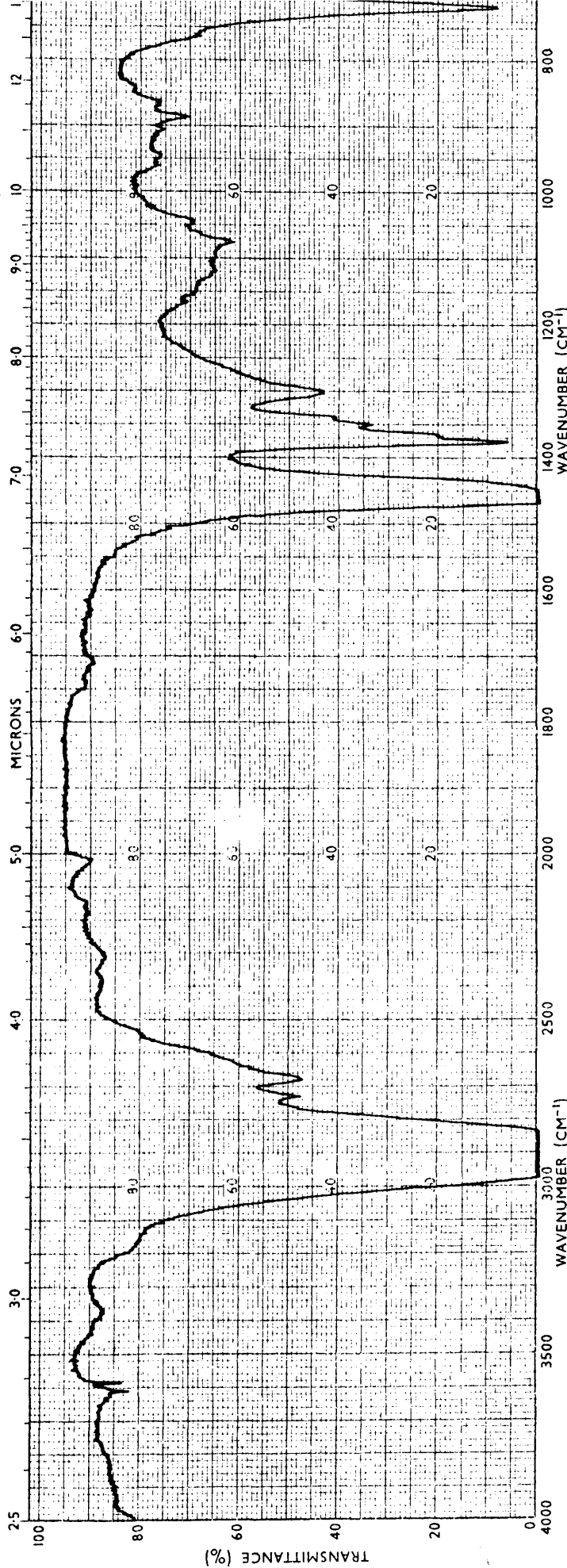
Estirpe	Parafinas totales		Parafinas lineales		Parafinas ramificadas		Pentadecano		Tetrametil-pentadecano		Aromáticos	
	Crecimiento	pH. final	Crecimiento	pH. final	Crecimiento	pH. final	Crecimiento	pH. final	Crecimiento	pH. final	Crecimiento	pH. final
Pa-24	0,030	7	0,010	6,5	0,010	6	-	-	-	-	0,040	6
G-25	0,025	7	0,015	6	0,020	7	-	-	-	-	0,060	7

Tabla LXXI - Géneros Achromobacter y Alcaligenes. Bandas diferenciales de los espectros de cultivos y sus respectivos controles.

Estirpe	Parafinas totales	Parafinas lineales	Parafinas ramificadas	Pentadecano	Tetrametilpentadecano	Aromáticos
Pa-24	3600-3100 (d) 1710 (m) 1300-800(aumenta) 720 (disminuye)	3370 (m) 2310 (d) 1745 (d) 1710 (d) 1140 (d) 1120* (m) 1100 (m) 1045 (m) 945 (m) 865 (m) 720 (disminuye)	3600-3100 (m) 1740 (hombro,d) 1710 (f) 1030-1040 (d) 1300-800(aumenta)	No cultivado	No cultivado	3400-3100 (m) 2700-2500 (m) 1710-1700 (f) 1300-900 (aumenta) 1260 (m) 1120* (m) 675 (aumenta)
G-25	1740 (d) 1710 (m) 1605 (d) 1300-800(aumenta) 720 (disminuye)	3600-3100 (f) 3440 (d) 3370 (m) 2700-2100 (m) 1730 (f) 1710 (f) 1630 (d) 1375 (aumenta) 1205 (d) 1170 (f) 1150 (f) 1120* (f) 1100 (m) 1045 (m) 970 (f) 945 (f) 915 (f) 865 (f) 720 (disminuye)	3600-3100 (m) 1710 (f) 1605 (d) 1300-800(aumenta) 940 (d)	No cultivado	No cultivado	3400-3100 (m) 2700-2500 (d) 1710-1700 (m) 1300-900 (aumenta) 1260 (m) 675 (aumenta)

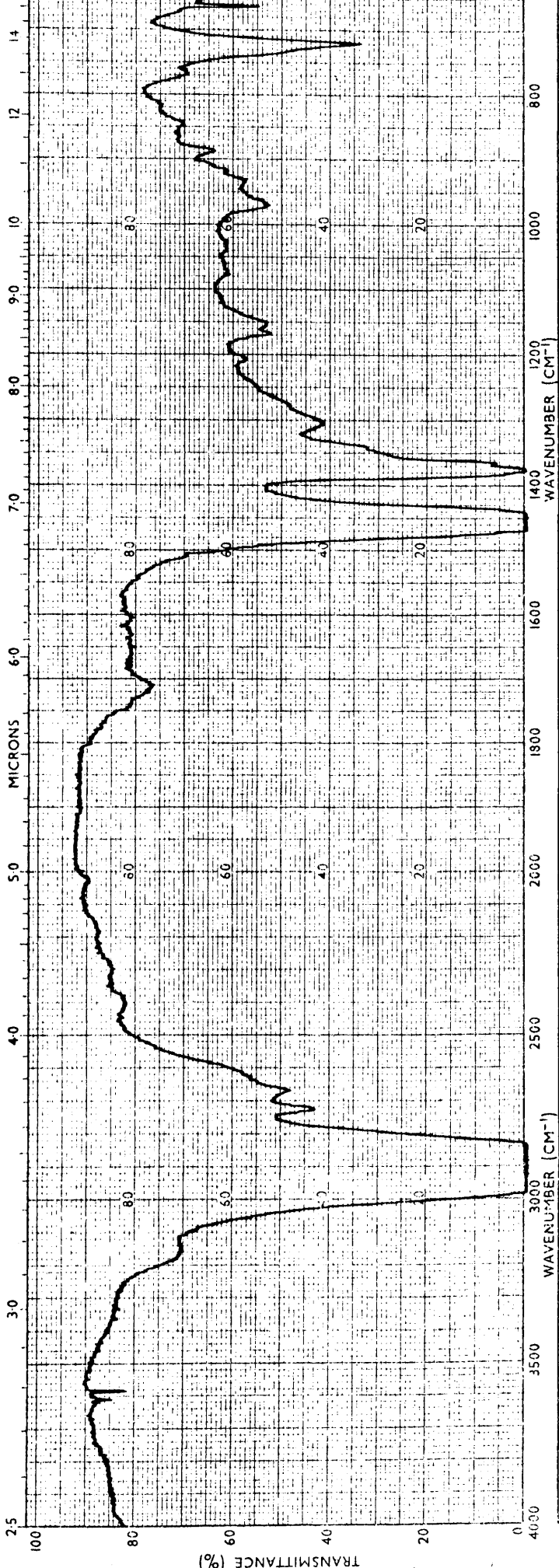


Gráfica 177. Estirpe Pa-24. Cultivo sobre parafinas totales.



SAMPLE		REMARKS	
ORIGIN		SOLVENT	
		CONCENTRATION	
		CELL PATH	
		REFERENCE	
		SCAN SPEED	
		SLIT	
		PERKIN-ELMER	
		PART NO. 472-5089	
		OPERATOR	
		DATE	
		REF. NO.	

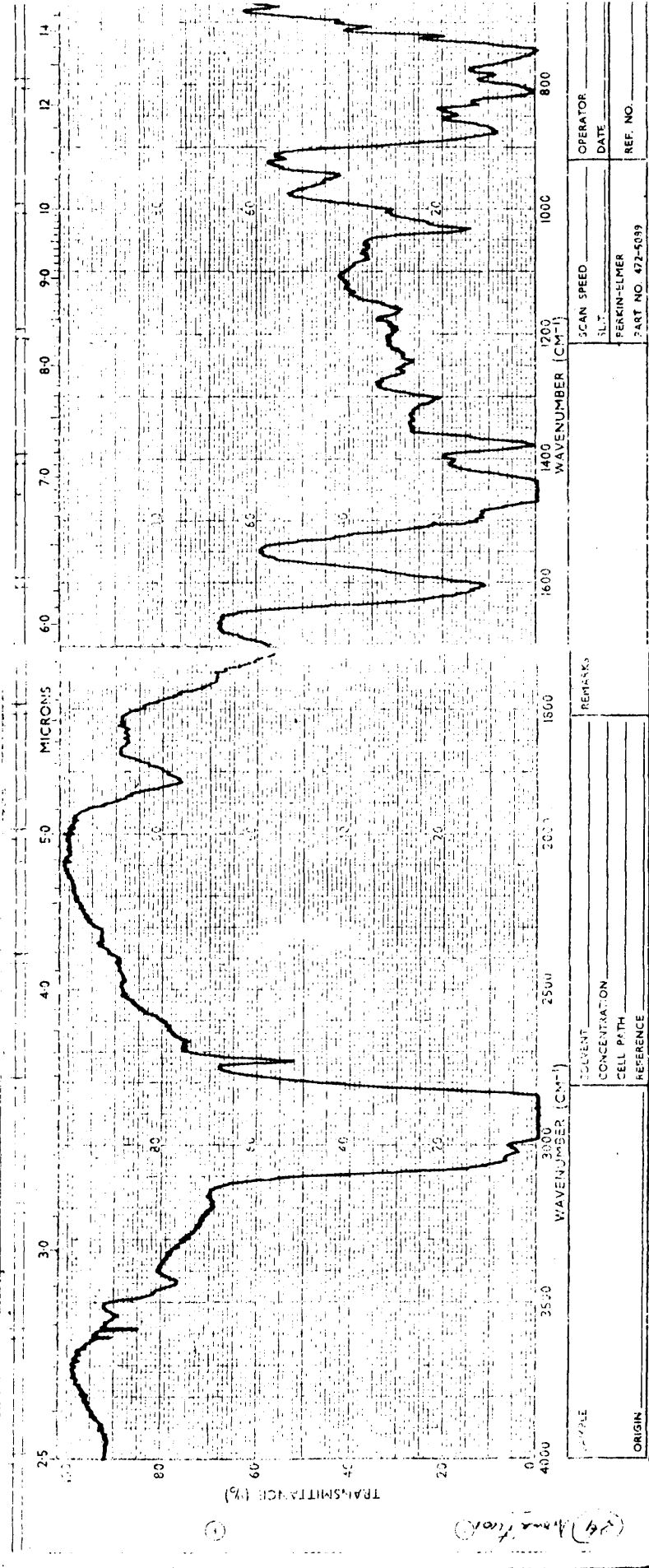
Gráfica 178. Estirpe Pa-24. Cultivo sobre parafinas lineales.
(Control:Gráfica 10).



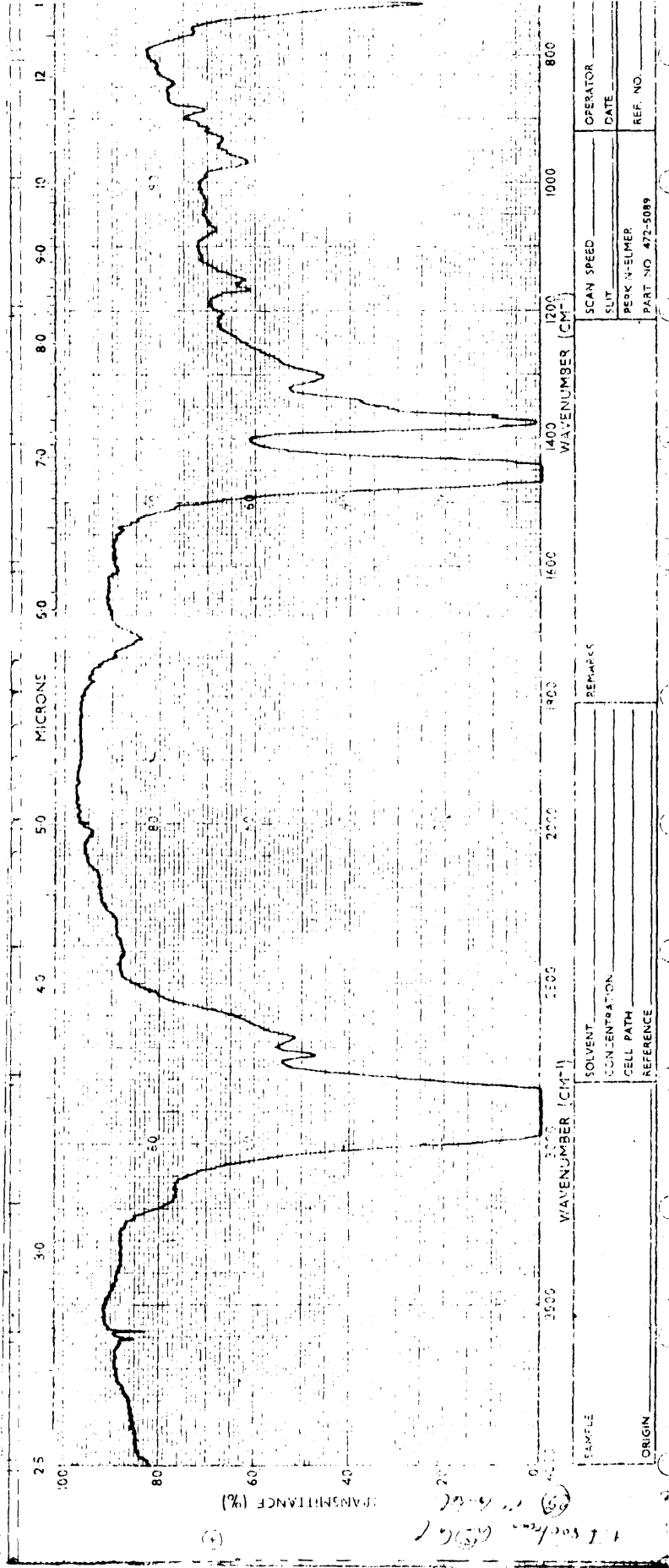
SAMPLE	SOLVENT	REMARKS	OPERATOR
ORIGIN	CONCENTRATION		DATE
	CELL PATH		REF. NO.
	REFERENCE		
	SCAN SPEED	PERKIN-ELMER	
	SLIT	PART NO. 472-5089	

Gráfica 179. Estirpe Pa-24. Cultivo sobre parafinas ramificadas.
(Control:Gráfica 9).

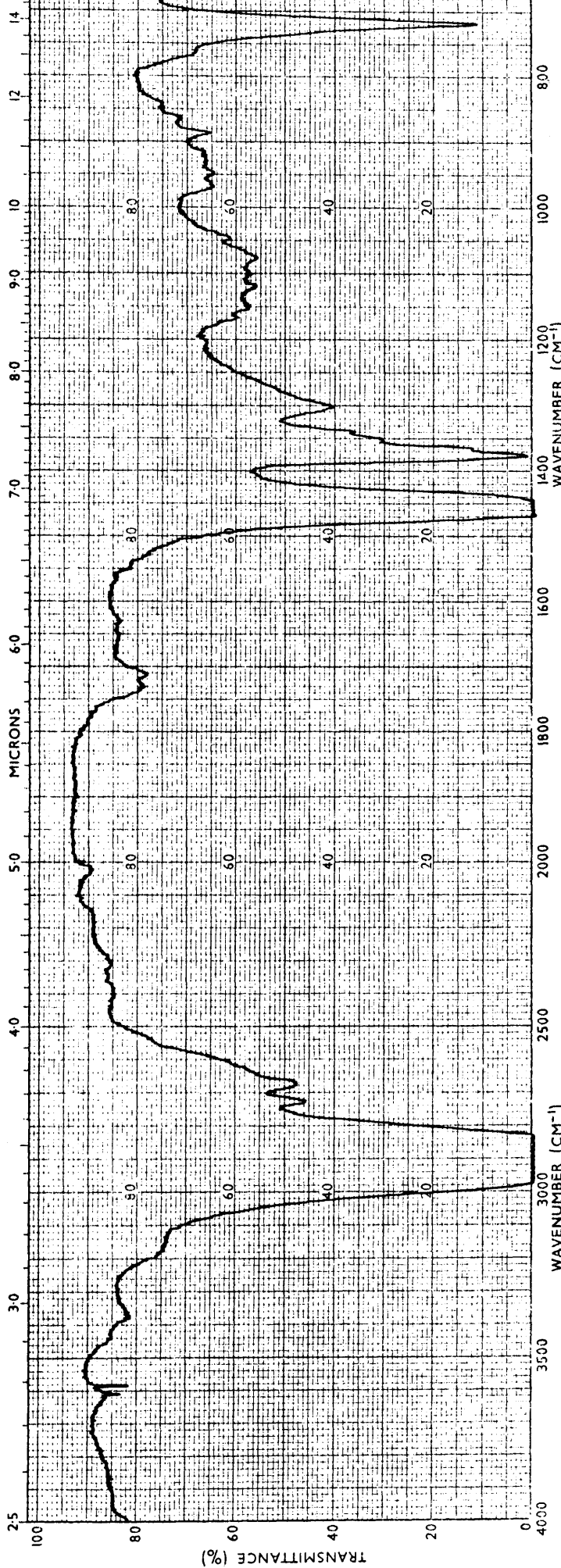
Handwritten signature or initials



Gráfica 180. Estirpe Pa-24. Cultivo sobre aromáticos.

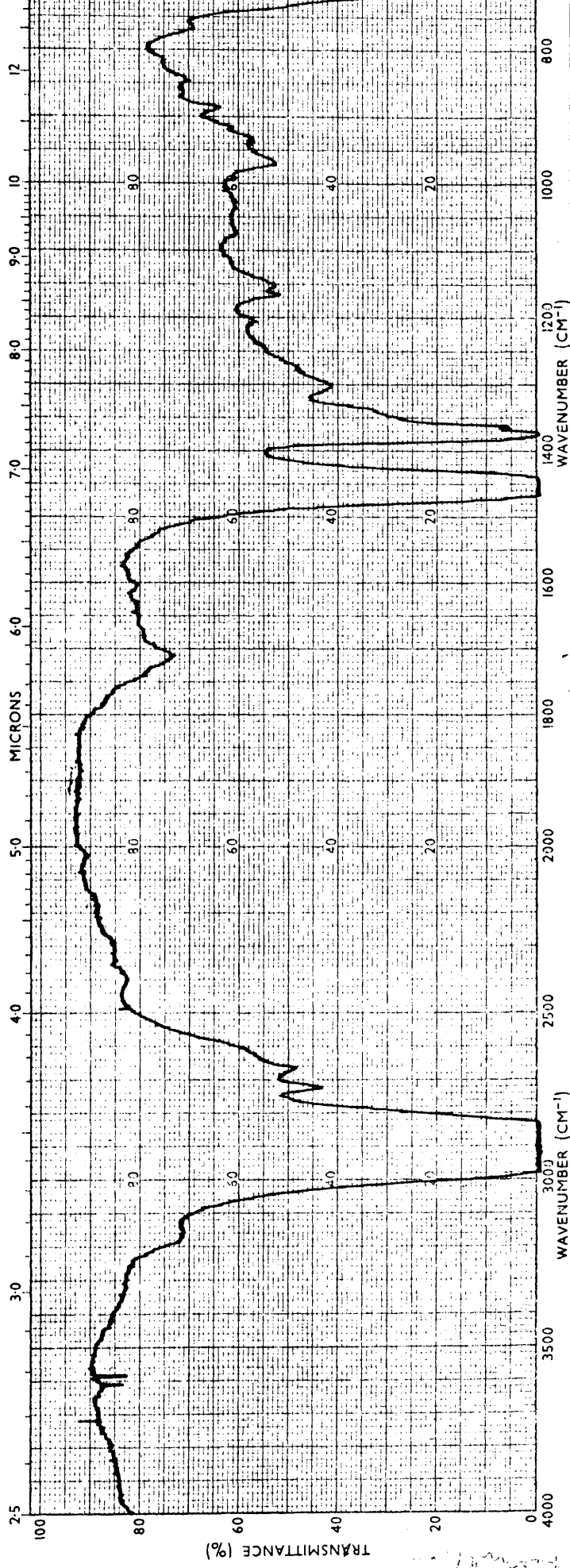


Gráfica 181. Estirpe G-25. Cultivo sobre parafinas totales.



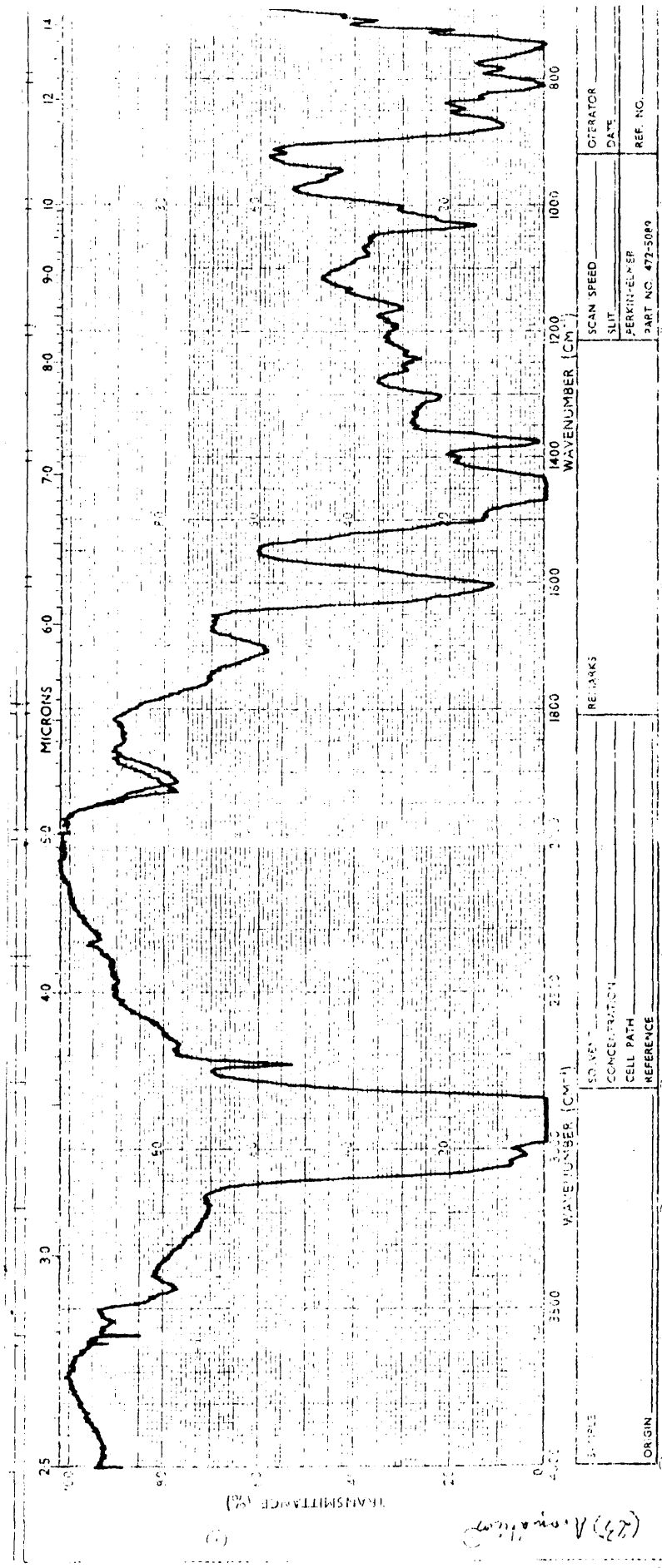
SAMPLE	SOLVENT	OPERATOR
	CONCENTRATION	DATE
ORIGIN	CELL PATH	SCAN SPEED
	REFERENCE	SLIT
		PERKIN-ELMER
		PART NO. 472-5089
REMARKS		REF. NO.

Gráfica 182. Estirpe G-25. Cultivo sobre parafinas lineales.
 (Control:Gráfica 10).



SAMPLE	SOLVENT	REMARKS	SCAN SPEED	OPERATOR
	CONCENTRATION		SLIT	DATE
ORIGIN	CELL PATH		PERKIN-ELMER	
	REFERENCE		PART NO. 472-5089	REF. NO.

Gráfica 183. Estirpe G-25. Cultivo sobre parafinas ramificadas.
 (Control:Gráfica 9).



Gráfica 184. Estirpe G-25. Cultivo sobre aromáticos.

4.6.3. - Utilización de las n-parafinas por las distintas estirpes. Variación de absorbancia de la banda a 720 cm^{-1} .

La utilización de las cadenas parafínicas lineales en los distintos cultivos, se puede estudiar midiendo la variación de la intensidad de la banda a 720 cm^{-1} , correspondiente a vibraciones de esqueleto en cadenas que tienen más de cuatro grupos metilénicos consecutivos.

Resulta interesante hacer este estudio, teniendo en cuenta paralelamente los valores de crecimiento, pues se observa que algunas estirpes parecen seleccionar y utilizar exclusivamente cadenas lineales, en cuyo caso la banda a 720 cm^{-1} disminuye proporcionalmente a la intensidad del crecimiento, mientras que otras, aún presentando buen crecimiento, no modifican sensiblemente la intensidad de dicha banda, lo que puede interpretarse como que no presentan selectividad ante este tipo de moléculas y, en consecuencia, la proporción de estas parafinas no varía en relación al total y en el espectro la banda presenta la misma intensidad que en el control.

Por otra parte, ésto podría deducirse del comportamiento de la estirpe en los cultivos sobre las fracciones de parafinas lineales y parafinas ramificadas por separado, pero creemos que allí juega un papel importante otro factor, y es el hecho de que las primeras tienen un punto de fusión más alto siendo sólidas a la temperatura de cultivo, cosa que no ocurre con las parafinas ramificadas. Esto se traduce naturalmente, en una disminución del crecimiento en el cultivo sobre las parafinas lineales en relación a lo que cabría esperar.

Por esta razón se han elegido los cultivos sobre parafinas totales, para medir la absorbancia a 720 cm^{-1} y deducir de ella la proporción de parafinas lineales que han sido utilizadas durante el crecimiento bacteriano. Estas absorbancias se miden tomando como línea base la trazada entre los dos mínimos de absorción próximos a la citada banda.

Hemos calculado también la absorbancia de esta banda en el espectro de parafinas totales, valor de referencia que tomamos como máximo, y en el de parafinas ramificadas, en el que suponemos que es mínimo. En efecto, como se puede observar en el correspondiente espectro, la banda a 720 cm^{-1} no desaparece en la fracción de parafinas ramificadas, lo que quiere decir que estas moléculas deben tener esqueletos lineales suficientemente largos para que aparezca la banda. Por eso en los cultivos podemos suponer que dicha banda solo puede disminuir en la misma proporción, como máximo, en que disminuye al fraccionar por cromatografía las parafinas totales separando las lineales de las ramificadas. La fracción de parafinas ramificadas absorbería pues a 720 cm^{-1} lo mismo que el extracto de un cultivo en el que hubieran sido eliminadas todas las cadenas lineales y permanecieran todas las ramificadas.

La absorbancia de esta banda para las distintas estirpes estará comprendida entre el valor máximo, correspondiente al espectro de parafinas totales, y el mínimo que será el que

presenta el espectro de la fracción de parafinas ramificadas. - Sólo en algunos casos excepcionales, los valores calculados son mayores que el máximo previsto, cosa que nos hace suponer que - para esas estirpes existe una utilización selectiva de parafinas no lineales.

En la tabla LXXII se representan los valores calculados para las absorbancias y el porcentaje relativo de parafinas lineales no utilizadas. En dicha tabla, los valores superiores a 100 corresponden a las estirpes que han utilizado preferentemente las moléculas ramificadas.

Tabla LXXII Estudio de la utilización de n-parafinas por las distintas estirpes.

Estirpe	A_{720}	$A^c_{720} - A^{r*}_{720}$	% Parafinas restantes
Control totales	0,519	0,155	100
Control ramificadas	0,364	-	0
P-1	0,406	0,042	26,7
P-2	0,526	0,162	104,5
P-3	0,526	0,162	104,5
P-36	0,501	0,137	88,3
P-8	0,502	0,138	89
G-27	0,511	0,147	94,8
G-32	0,448	0,84	54,1
G-28	0,484	0,120	77,4
G-41	0,519	0,155	100
P-42	0,440	0,076	49
G-43	0,418	0,054	34,8
P-44	0,471	0,107	69
Pa-19	0,481	0,117	75,4
P-4	0,453	0,089	57,4
P-5	0,443	0,079	50,9
P-9	0,439	0,075	48,3
G-39	0,450	0,086	55,4
K-21	0,457	0,093	60
P-7	0,514	0,150	96,7
G-11	0,517	0,153	98,7
G-12	0,530	0,166	107,9
A-13	0,508	0,144	92,9
A-14	0,512	0,148	95,4
K-15	0,492	0,128	82,5
G-16	0,533	0,169	109
Pa-17	0,512	0,148	95,4
Pa-18	0,550	0,186	120
K-22	-	-	-
G-26	0,509	0,145	93,5
G-31	0,378	0,014	9
P-34	0,432	0,068	43,8
P-35	0,410	0,046	29,6
P-37	0,507	0,143	92,2
P-38	0,415	0,051	32,9
Pa-24	0,498	0,134	86,4
G-25	0,515	0,151	97,4

* $A^c_{720} - A^{r*}_{720}$ = diferencias entre absorbancias de las bandas a 720 cm^{-1} en los distintos cultivos y en el espectro de parafinas ramificadas.

4.6.4. - Medida de la oxidación producida en los distintos --
cultivos. Estudio de la intensidad de las bandas de
la región 1800-1700 cm⁻¹.

La región del espectro IR situada entre 1800 y 1700 cm⁻¹, presenta bandas de absorción que, como ya se ha indicado, corresponden a vibraciones de tensión de grupos C=O y presentan un gran interés para valorar el grado de oxidación producido por los microorganismos sobre los distintos hidrocarburos. Tienen además la ventaja de su gran intensidad y de que no existen bandas próximas que influyan en la absorción de las mismas. Hay que hacer la salvedad a este respecto de la fracción de hidrocarburos aromáticos, que presenta bandas en esta región debidas a las sustituciones en los anillos aromáticos.

Se puede hacer, pues, un estudio comparativo de la absorbancia de estas bandas para las distintas estirpes y los diferentes hidrocarburos, que nos da una idea muy exacta de la intensidad de la oxidación. En algunos casos aparecen dos bandas bien marcadas, por lo cual se han medido los dos valores independientemente.

En la tabla LXXIII, se muestran todos los valores de absorbancia calculados tomando como línea de fondo, la correspondiente a la máxima transmisión medida en el espectro, que se sitúa hacia los 2.000 cm⁻¹. En dicha tabla se indica también el número de onda al que corresponde cada absorbancia, pues por tratarse de bandas que aparecen en distinta posición y de grupos funcionales, distintos en muchos casos, no son estrictamente comparables mas que aquellas que presentan el mismo número de onda.

Al principio de la tabla están representados los valores correspondientes para los espectros controles. Como puede comprobarse, estos valores son prácticamente despreciables en todos los casos salvo en el espectro de tetrametilpentadecano, producto que posee ya de origen una ligera oxidación, y en el de la fracción aromática, donde a una posible oxidación se suma la fuerte absorción de las bandas citadas anteriormente.

Control	A ₁₇₁₀ = 0,000	A ₁₇₁₀ = 0,013	A ₁₇₁₀ = 0,011	A ₁₇₁₀ = 0,011	A ₁₇₄₅ = 0,029 A ₁₇₁₀ = 0,040	A ₁₇₁₀ = 0,161
F-1	A ₁₇₄₅ = 0,124 A ₁₇₁₀ = 0,126	A ₁₇₁₀ = 0,198	-	A ₁₇₁₀ = 0,062	A ₁₇₁₀ = 0,063	A ₁₇₁₀ = 0,284
F-2	A ₁₇₁₀ = 0,057	-	A ₁₇₁₀ = 0,080	-	A ₁₇₄₅ = 0,037 A ₁₇₁₀ = 0,048	A ₁₇₁₀ = 0,469
F-3	A ₁₇₁₀ = 0,058	-	-	A ₁₇₁₀ = 0,042	-	A ₁₇₁₀ = 0,266
F-3b	A ₁₇₄₅ = 0,082 A ₁₇₁₀ = 0,074	A ₁₇₁₀ = 0,061	A ₁₇₄₅ = 0,103 A ₁₇₁₀ = 0,071	-	-	A ₁₇₁₀ = 0,257
F-4	A ₁₇₁₀ = 0,043	-	-	-	A ₁₇₁₀ = 0,050	A ₁₇₁₀ = 0,266
F-27	A ₁₇₁₀ = 0,082	A ₁₇₃₀ = 0,068	A ₁₇₁₀ = 0,100	A ₁₇₁₀ = 0,029	A ₁₇₁₀ = 0,043	A ₁₇₁₀ = 0,244
G-32	A ₁₇₁₀ = 0,184	A ₁₇₁₀ = 0,172	A ₁₇₁₀ = 0,098	A ₁₇₄₅ = 0,047 A ₁₇₁₀ = 0,038	A ₁₇₁₀ = 0,083	A ₁₇₁₀ = 0,249
G-28	A ₁₇₁₀ = 0,079	A ₁₇₃₀ = 0,074 A ₁₇₁₀ = 0,081	A ₁₇₁₀ = 0,100	A ₁₇₁₀ = 0,037	A ₁₇₁₀ = 0,132	-
G-41	A ₁₇₁₀ = 0,038	A ₁₇₃₀ = 0,095 A ₁₇₁₀ = 0,093	A ₁₇₅₀ = 0,107 A ₁₇₁₀ = 0,100	A ₁₇₁₀ = 0,031	-	A ₁₇₁₀ = 0,219
P-42	A ₁₇₁₀ = 0,106	A ₁₇₁₀ = 0,285	A ₁₇₁₀ = 0,315	A ₁₇₄₅ = 0,110 A ₁₇₁₀ = 0,098	A ₁₇₁₀ = 0,270	A ₁₇₁₀ = 0,220
G-43	A ₁₇₃₀ = 0,093 A ₁₇₁₀ = 0,083	A ₁₇₃₅ = 0,184 A ₁₇₁₀ = 0,263	A ₁₇₃₅ = 0,226 A ₁₇₁₀ = 0,735	A ₁₇₄₅ = 0,083 A ₁₇₁₂ = 0,168	A ₁₇₃₅ = 0,179 A ₁₇₁₀ = 0,431	A ₁₇₁₀ = 0,222
P-44	A ₁₇₁₀ = 0,050	A ₁₇₃₀ = 0,089 A ₁₇₁₀ = 0,117	A ₁₇₄₈ = 0,117 A ₁₇₁₀ = 0,114	A ₁₇₁₀ = 0,035	A ₁₇₄₀ = 0,045 A ₁₇₁₀ = 0,051	A ₁₇₁₀ = 0,217
F-19	A ₁₇₁₀ = 0,061	A ₁₇₁₀ = 0,049	A ₁₇₁₀ = 0,081	A ₁₇₄₅ = 0,036	A ₁₇₄₀ = 0,032 A ₁₇₁₀ = 0,043	A ₁₇₁₀ = 0,227
P-4	A ₁₇₁₀ = 0,150	A ₁₇₁₀ = 0,105	A ₁₇₁₀ = 0,095	-	-	A ₁₇₁₀ = 0,261
P-5	A ₁₇₄₀ = 0,101 A ₁₇₁₀ = 0,198	A ₁₇₁₀ = 0,161	A ₁₇₁₀ = 0,180	-	-	A ₁₇₁₀ = 0,313
P-9	A ₁₇₄₀ = 0,095 A ₁₇₁₀ = 0,218	A ₁₇₁₀ = 0,109	A ₁₇₁₀ = 0,178	-	-	A ₁₇₁₀ = 0,283
G-39	A ₁₇₁₀ = 0,191	A ₁₇₃₀ = 0,101 A ₁₇₁₀ = 0,143	A ₁₇₁₀ = 0,500	-	-	A ₁₇₁₀ = 0,252
P-40	-	A ₁₇₃₀ = 0,069 A ₁₇₁₀ = 0,073	A ₁₇₄₅ = 0,116 A ₁₇₁₀ = 0,087	-	-	A ₁₇₁₀ = 0,251
K-21	A ₁₇₁₀ = 0,103	A ₁₇₅₀ = 0,088 A ₁₇₁₀ = 0,107	A ₁₇₁₀ = 0,626	-	-	A ₁₇₁₀ = 0,311
P-7	A ₁₇₁₀ = 0,063	-	A ₁₇₁₀ = 0,108	A ₁₇₁₀ = 0,043	A ₁₇₄₀ = 0,064 A ₁₇₁₀ = 0,083	A ₁₇₁₀ = 0,278
G-11	-	-	-	-	A ₁₇₄₅ = 0,074 A ₁₇₁₀ = 0,081	A ₁₇₁₀ = 0,281
G-12	A ₁₇₁₀ = 0,050	-	-	-	-	A ₁₇₁₀ = 0,429
A-13	A ₁₇₁₀ = 0,061	-	-	-	-	A ₁₇₁₀ = 0,28
A-14	A ₁₇₁₀ = 0,057	A ₁₇₁₀ = 0,051	A ₁₇₁₀ = 0,087	-	-	A ₁₇₁₀ = 0,305
F-15	A ₁₇₁₀ = 0,075	A ₁₇₁₀ = 0,054	A ₁₇₁₀ = 0,086	-	A ₁₇₄₀ = 0,045 A ₁₇₁₀ = 0,060	A ₁₇₁₀ = 0,249
G-16	A ₁₇₁₀ = 0,085	A ₁₇₁₀ = 0,032	A ₁₇₁₀ = 0,081	-	-	A ₁₇₁₀ = 0,224
Fa-17	A ₁₇₁₀ = 0,065	A ₁₇₁₀ = 0,066	A ₁₇₁₀ = 0,078	-	-	A ₁₇₁₀ = 0,258
Fa-18	A ₁₇₁₀ = 0,042	A ₁₇₁₀ = 0,050	A ₁₇₁₀ = 0,079	A ₁₇₁₀ = 0,030	A ₁₇₄₅ = 0,055 A ₁₇₁₀ = 0,109	A ₁₇₁₀ = 0,238
K-22	-	A ₁₇₁₀ = 0,035	A ₁₇₁₀ = 0,061	A ₁₇₅₀ = 0,060 A ₁₇₁₀ = 0,038	A ₁₇₄₅ = 0,039 A ₁₇₁₀ = 0,048	A ₁₇₁₀ = 0,343
Fa-24	-	A ₁₇₁₀ = 0,053	A ₁₇₁₀ = 0,074	A ₁₇₅₀ = 0,054 A ₁₇₁₀ = 0,028	A ₁₇₄₅ = 0,053 A ₁₇₁₀ = 0,099	A ₁₇₁₀ = 0,256
G-26	A ₁₇₁₀ = 0,067	A ₁₇₃₀ = 0,062 A ₁₇₁₀ = 0,057	A ₁₇₁₀ = 0,071	A ₁₇₅₀ = 0,060 A ₁₇₁₀ = 0,054	-	A ₁₇₁₀ = 0,257
G-31	A ₁₇₁₀ = 0,175	A ₁₇₃₀ = 0,074 A ₁₇₁₀ = 0,088	A ₁₇₅₀ = 0,297 A ₁₇₁₀ = 0,255	-	-	A ₁₇₁₀ = 0,226
G-33	-	A ₁₇₃₀ = 0,074 A ₁₇₁₀ = 0,065	A ₁₇₅₀ = 0,185 A ₁₇₁₀ = 0,076	-	A ₁₇₄₅ = 0,044 A ₁₇₁₀ = 0,054	A ₁₇₁₀ = 0,228
P-14	A ₁₇₁₀ = 0,117	A ₁₇₁₀ = 0,072	A ₁₇₄₅ = 0,100 A ₁₇₁₀ = 0,113	-	A ₁₇₄₅ = 0,066 A ₁₇₁₀ = 0,094	A ₁₇₁₀ = 0,221
P-35	A ₁₇₁₀ = 0,136	A ₁₇₁₀ = 0,064	A ₁₇₅₀ = 0,16 A ₁₇₁₀ = 0,100	A ₁₇₁₀ = 0,051	A ₁₇₄₅ = 0,070 A ₁₇₁₀ = 0,078	A ₁₇₁₀ = 0,242
P-37	A ₁₇₄₅ = 0,061 A ₁₇₁₀ = 0,067	A ₁₇₃₀ = 0,062 A ₁₇₁₀ = 0,050	-	-	A ₁₇₄₅ = 0,039 A ₁₇₁₀ = 0,048	A ₁₇₁₀ = 0,258
P-39	A ₁₇₁₀ = 0,136	A ₁₇₁₀ = 0,065	A ₁₇₁₀ = 0,088	A ₁₇₁₀ = 0,051	-	A ₁₇₁₀ = 0,263
Fa-24	A ₁₇₁₀ = 0,088	-	A ₁₇₁₀ = 0,085	-	-	A ₁₇₁₀ = 0,260
G-25	A ₁₇₁₀ = 0,066	A ₁₇₃₀ = 0,077 A ₁₇₁₀ = 0,074	A ₁₇₁₀ = 0,106	-	-	A ₁₇₁₀ = 0,252

4.6.5. - Estudio cinético de la variación de intensidad de las bandas a 1710 y 720 cm^{-1} para Pseudomonas aeruginosa, estirpe G-34.

Para esta estirpe, y con objeto de comprobar la relación entre la intensidad de crecimiento y la acumulación de productos de oxidación en el medio de cultivo, se hizo un estudio cinético de la banda a 1710 cm^{-1} , que corresponde a vibraciones de tensión de grupos C=O.

Para ello se hicieron en las condiciones habituales, cinco cultivos paralelos de esta estirpe, extrayéndose el hidrocarburo residual y midiéndose el crecimiento a intervalos variables entre uno y once días de incubación.

En la misma experiencia se estudió la variación de intensidad de la banda a 720 cm^{-1} correspondiente a vibraciones de deformación "rocking" en cadenas lineales de más de cuatro grupos CH_2 consecutivos. Con ello pretendíamos observar la relación entre el crecimiento y la desaparición de cadenas n-parafínicas largas.

La elección de la estirpe G-34, responde a que en ella se ve mucho más clara que en otras una relación directa entre la aparición y desaparición respectivas de las dos bandas estudiadas y el crecimiento del cultivo. Además otras estirpes presentan más de una banda de grupos C=O. Finalmente, esta estirpe tiene buen crecimiento y, en consecuencia, las medidas pueden hacerse con más exactitud.

La variación de la intensidad de las dos bandas se representa en las gráficas 185 y 186. A partir de ellas se calcularon las absorbancias, tomando como línea base para la banda a 1710 cm^{-1} la máxima transmisión medida en el espectro (correspondiente aproximadamente a la de 2000 cm^{-1}) y para la banda a 720 cm^{-1} una línea que pasa por los dos mínimos de absorción más próximos a ambos lados de la misma.

Los valores calculados están recogidos en la tabla LXXIV

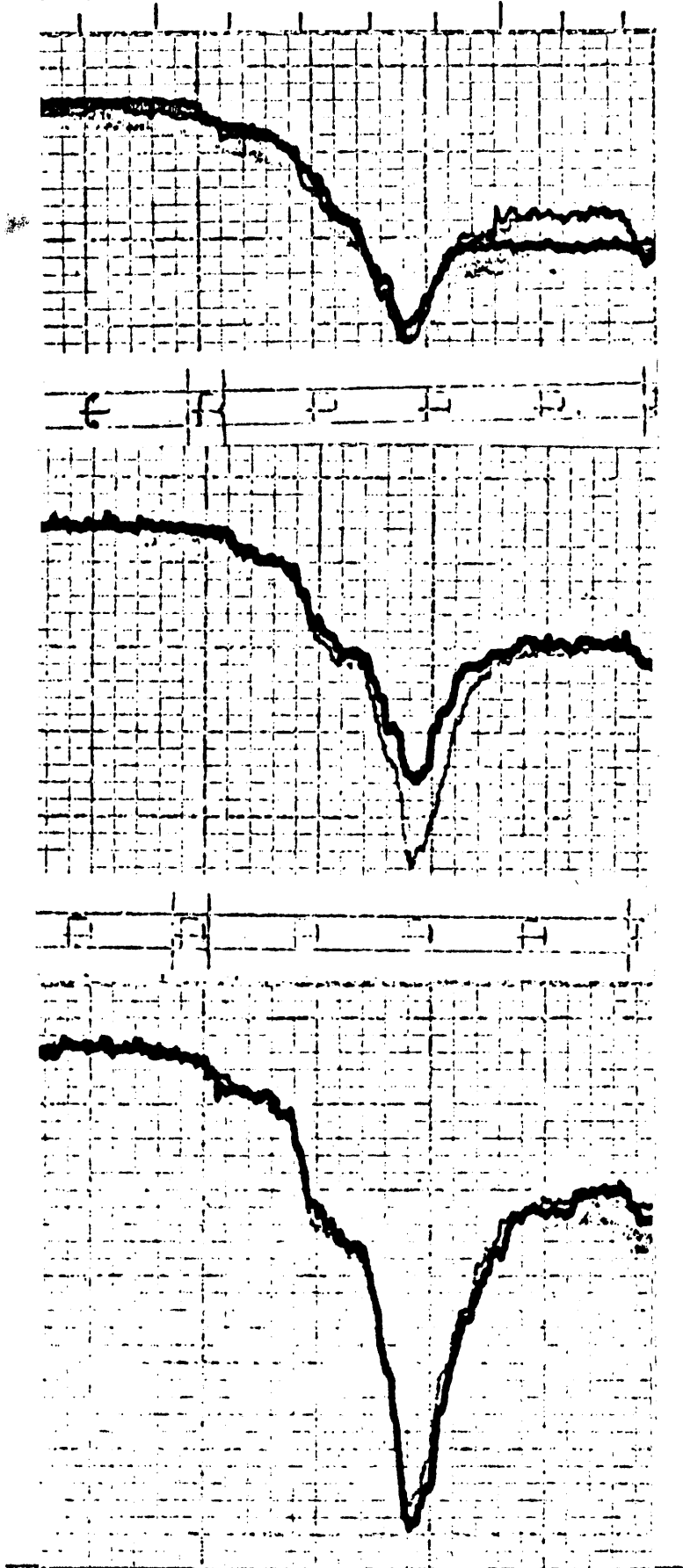
En las gráficas 187 y 188 se representan las variaciones de absorbancia medidas y la intensidad de crecimiento, frente al tiempo de incubación en días respectivamente para las bandas a 1710 y 720 cm^{-1} .

Tabla LXXIV.- Valores de crecimiento y absorbancia de las bandas a 1710 y 720 cm^{-1} en los distintos cultivos de la estirpe G-34.

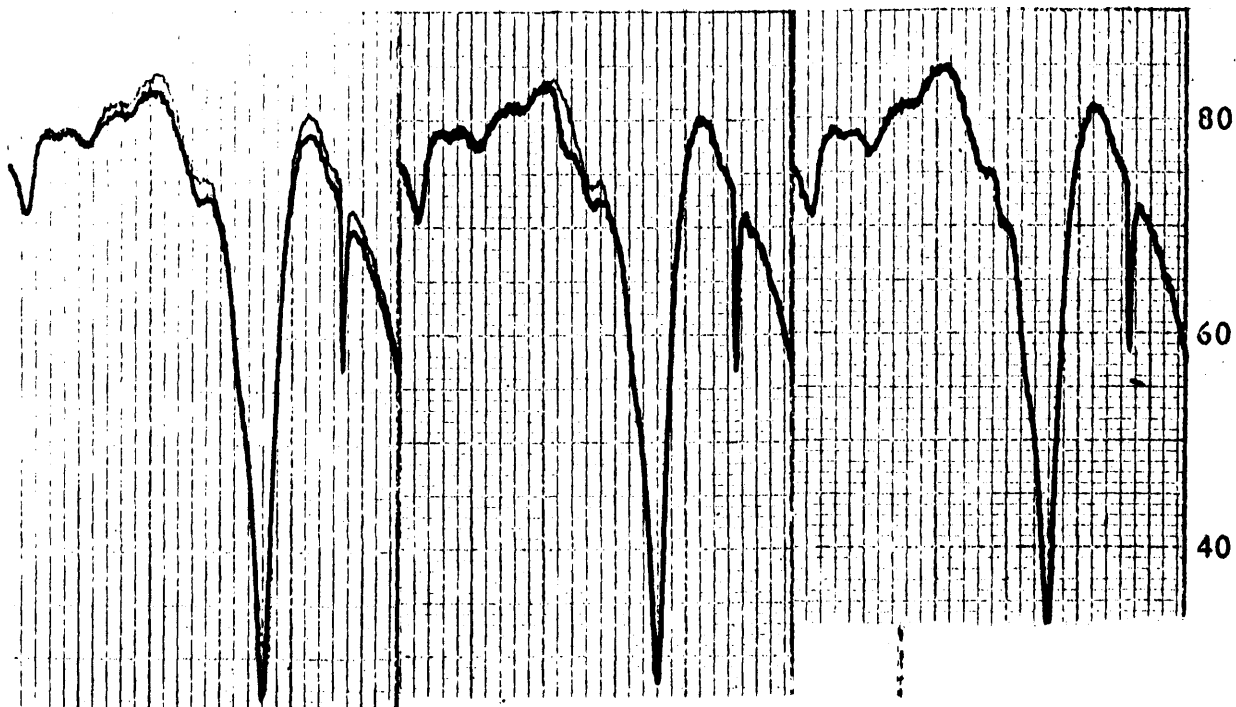
	Control	1	4	5	7	11 días
Crecimiento	0	0,010	0,055	0,070	0,120	0,140
A_{1710}	0,036402	0,062692	0,072061	0,099384	0,114302	0,144365
A_{720}	0,515522	0,490823	0,471291	0,449824	0,432435	0,403762

MICRONS

6.0

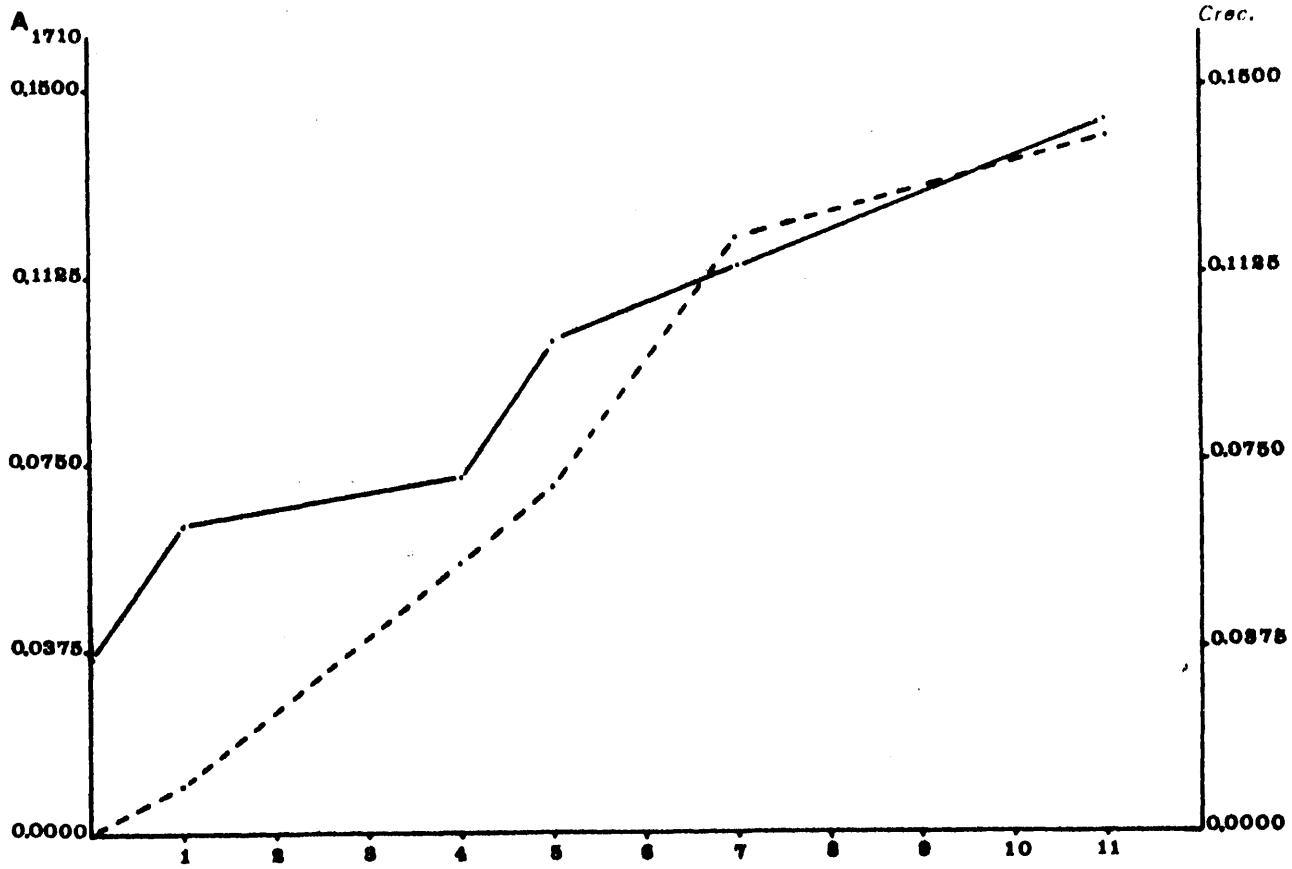


Gráfica 185. Variación de intensidad de la banda a 1710 cm^{-1} según el tiempo de incubación. Estirpe G-34.

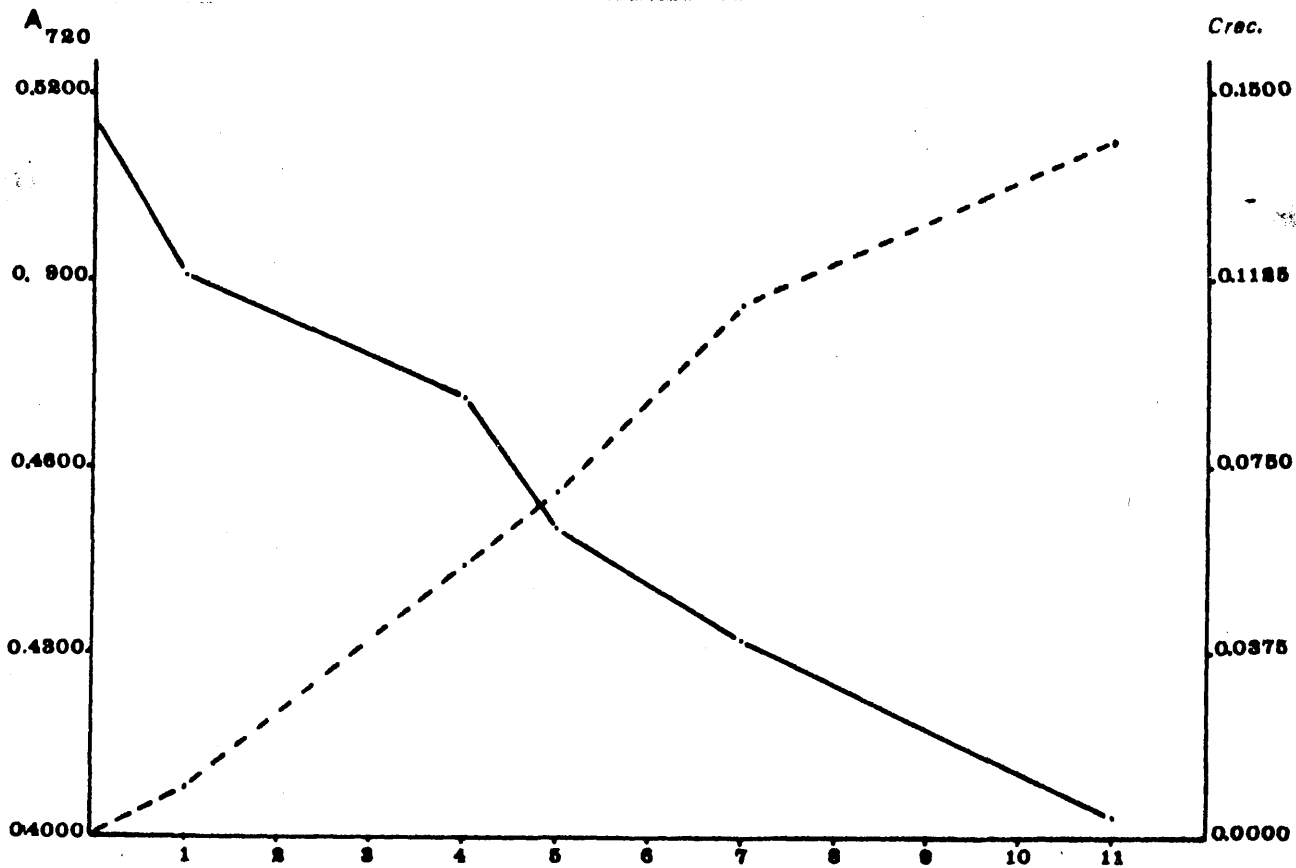


Gráfica 186. Variación de intensidad de la banda a 720 cm^{-1} según el tiempo de incubación. Estirpe G-34.

Gráfica 187. Variaciones del crecimiento y de la absorbancia de la banda a 1710 cm^{-1} , frente al tiempo de incubación en días. Estirpe G-34.



Gráfica 188. Variaciones del crecimiento y de la absorbancia de la banda a 720 cm^{-1} , frente al tiempo de incubación en días. Estirpe G-34.



4.7. - Cultivos en fermentadores.

Como se puede apreciar en las experiencias hasta aquí descritas, las modificaciones aparecidas en los espectros IR de los distintos hidrocarburos, como consecuencia del cultivo bacteriano, aún siendo de gran interés para sistematizar los diferentes tipos de ataques producidos, resultan insuficientes para precisar los derivados metabólicos formados.

Este inconveniente, se debe a la débil intensidad de las bandas correspondientes a moléculas oxidadas, si se exceptúan las de vibraciones de tensión de grupos C=O. Como además la extracción de los productos de oxidación formados en el metabolismo se hizo hasta aquí conjuntamente con el hidrocarburo residual, el resultado es que dichas bandas son apenas ---apreciables y, en consecuencia, sólo la región 1800-1700 cm^{-1} nos sirve para diferenciar claramente unos tipos de oxidación de otros.

Por estas razones, y tratando de concretar esas bandas débiles a que nos hemos referido, se hicieron otras series de pruebas en las que se evitaron estos inconvenientes. Para ello, los cultivos se hicieron a mayor escala en fermentadores con siete litros de medio, y la mayor cantidad de muestra obtenida nos permitió después del cultivo, separar los hidrocarburos residuales no oxidados de los productos de oxidación formados, con lo que el espectro IR de estos últimos resulta ser mucho más concluyente.

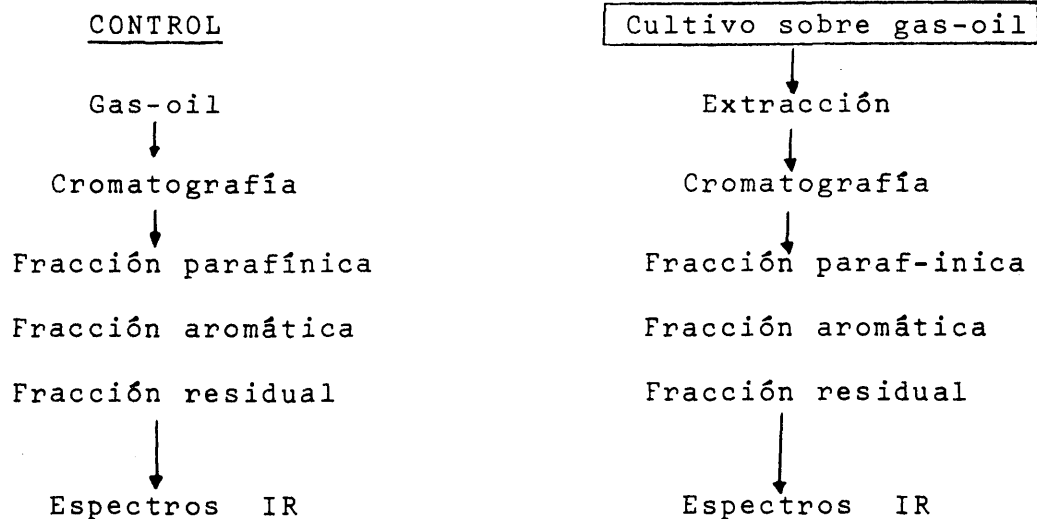
Sin embargo, esta fase del trabajo hemos tenido que realizarla sólo con algunas estirpes seleccionadas, por no disponer de suficiente cantidad de producto. La selección de estas estirpes se hizo atendiendo a su gran crecimiento y al hecho de ser las que más modificaban el espectro IR del hidrocarburo.

Las pruebas efectuadas se detallan a continuación.

4.7.1. - Cultivos sobre gas-oil completo.

Con esta experiencia se pretende observar la oxidación del gas-oil, fraccionando el producto por cromatografía en columna, después de haber cultivado los microorganismos sobre él. Al hacer esta separación tenemos la ventaja de observar el efecto producido por el microorganismo sobre cada fracción, y obtener además una fracción de compuestos oxidados, separada del resto del gas-oil sin metabolizar, que por esta razón será más significativa en el estudio espectroscópico.

En esquema el procedimiento utilizado es así:



- 1) Cultivo del microorganismo sobre gas-oil completo - en fermentadores de 7 litros de medio (7 ml de gas-oil como fuente única de C).
- 2) Extracción con éter sulfúrico (gas-oil no utilizado + productos de oxidación)
- 3) Separación de tres fracciones por cromatografía en columna: parafínica, aromática y residual.
- 4) Separación de las mismas fracciones en un gas-oil - sin metabolizar, como experimento control.
- 5) Espectro IR de cada una de las fracciones. En las dos primeras, comparadas con los controles correspondientes, observamos diferencias producidas como consecuencia del cultivo en cuanto a la utilización o no de esas moléculas. En la fracción residual aparecen los productos oxidados presentes originariamente en el gas-oil, más los que se han formado por el metabolismo microbiano. La comparación de estos espectros con los controles (fracción residual del gas-oil primitiva) nos indica la acumulación de productos oxidados formados por las bacterias.

Las estirpes ensayadas fueron las siguientes:

- Estirpe P-1: *Corynebacterium bovis*.
- Estirpe P-4: *Micrococcus ureae*.
- Estirpe K-21: *Arthrobacter* sp.
- Estirpe P-34: *Pseudomonas aeruginosa*.
- Estirpe G-39: *Micrococcus roseus*.
- Estirpe G-43: *Nocardia* sp.

Las condiciones de cultivo y el procedimiento de extracción fueron ya descritos en el capítulo de métodos.

El fraccionamiento por cromatografía se hizo en la columna pequeña que ya ha sido descrita. Las condiciones para todos los ensayos fueron:

Carga	64,58	gr de gel de sílice (30-200 mallas ASTM)
Muestra	5	ml de extracto + 5 ml de isoctano

Eluyentes:

Isoctano	150	ml
Benceno	250	ml
Propanol-2	...	175	ml

Estas cantidades fueron calculadas de acuerdo con la capacidad de la columna y teniendo en cuenta los resultados anteriores.

Como ya se ha indicado, se hizo un experimento control en el que se fraccionaron en idénticas condiciones 5 ml de gas-oil. Las fracciones respectivas están representadas en las gráficas 189 a 192. Como puede apreciarse, estos espectros coinciden exactamente con los de las fracciones obtenidas anteriormente, que han sido ya descritos.

4.7.1.1. - Resultados espectroscópicos. Determinación y asignación de bandas.

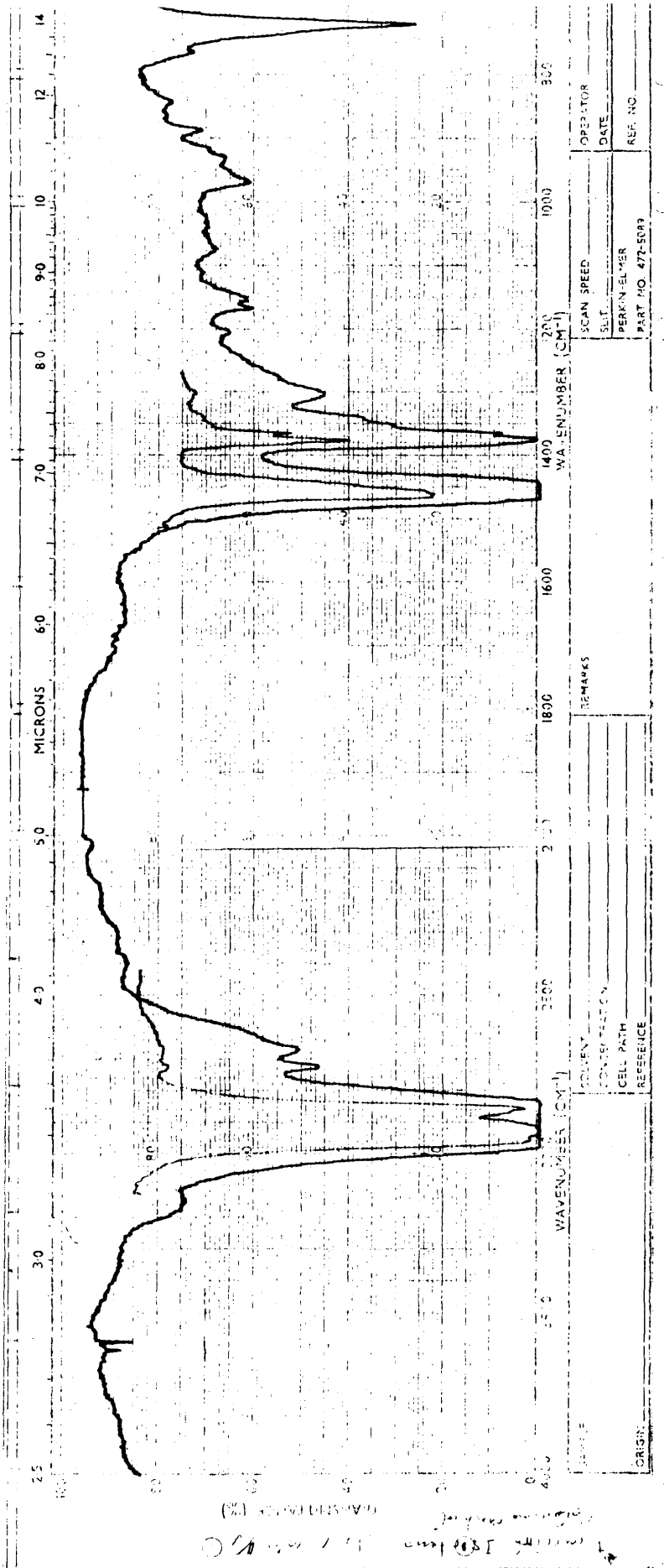
Los espectros IR de los extractos de cultivos fraccionados por cromatografía, se representan en las gráficas 195 a 212.

En las tablas LXXV a LXXX se recogen los números de onda de las bandas diferenciales entre los espectros controles y los de cultivos de las diferentes estirpes.

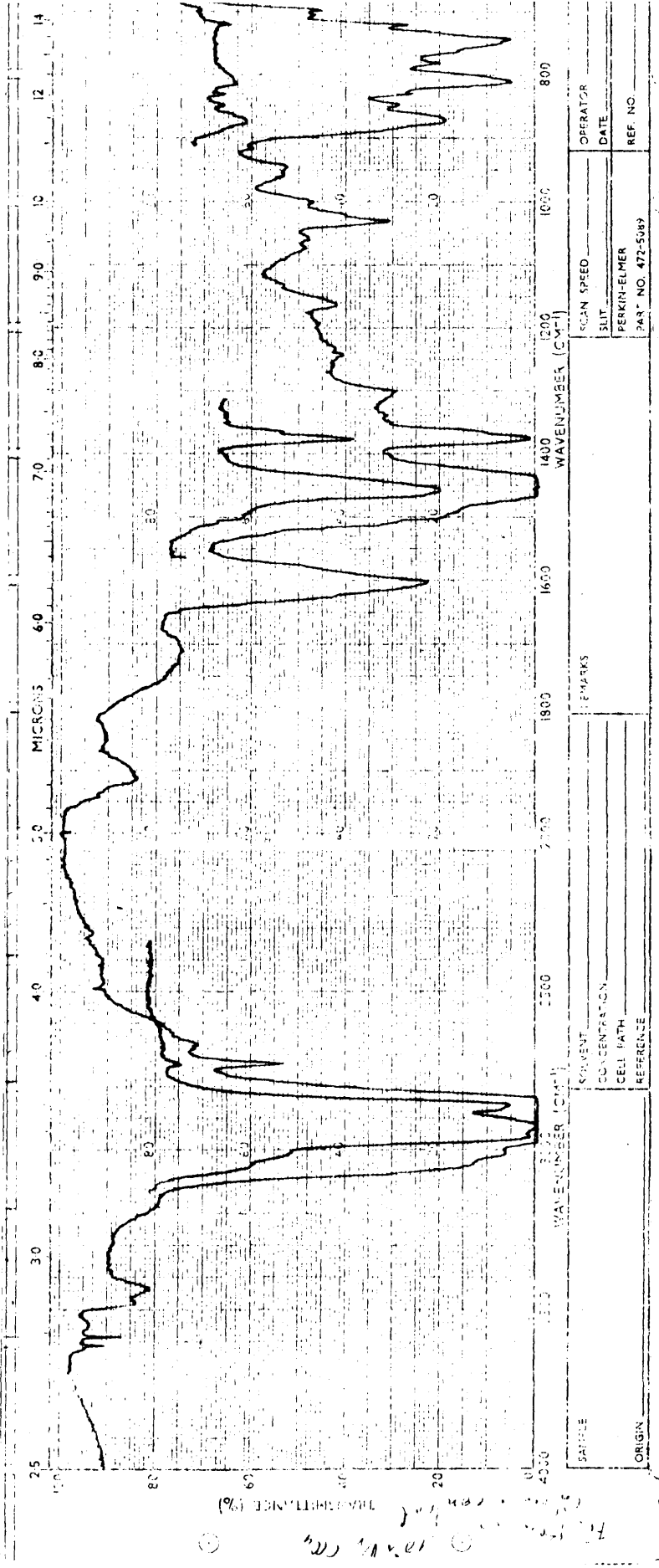
Asignación de bandas y discusión.

Estirpe P-1

La fracción parafínica solo muestra variación de intensidad de la banda a 720 cm^{-1} , que aumenta ligeramente respecto



Gráfica 189. Experimento control. Fracción isoctano.

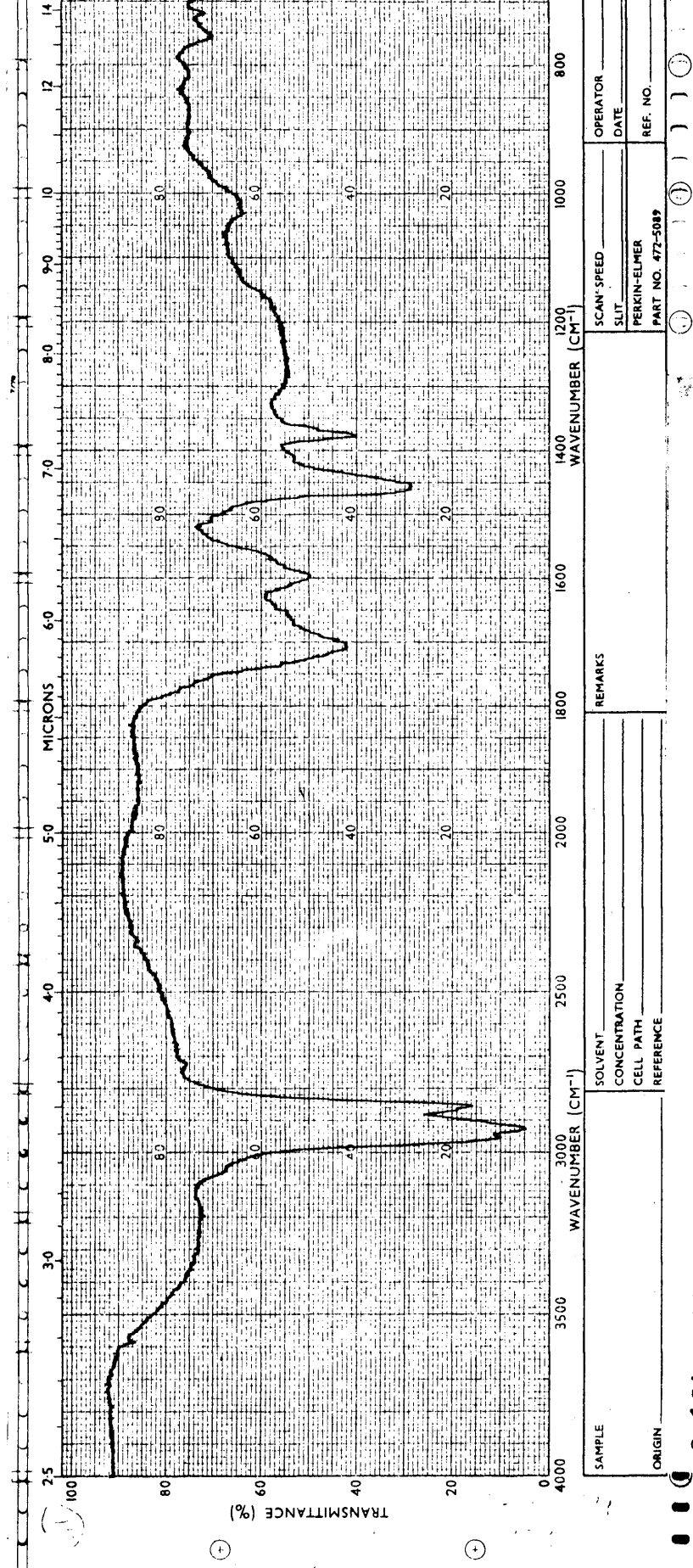


SAMPLE _____
 ORIGIN _____
 SOLVENT _____
 CONCENTRATION _____
 CELL PATH _____
 REFERENCE _____
 MARKS _____

SCAN SPEED _____
 SLIT _____
 PERKIN-ELMER
 PAR. NO. 472-5089

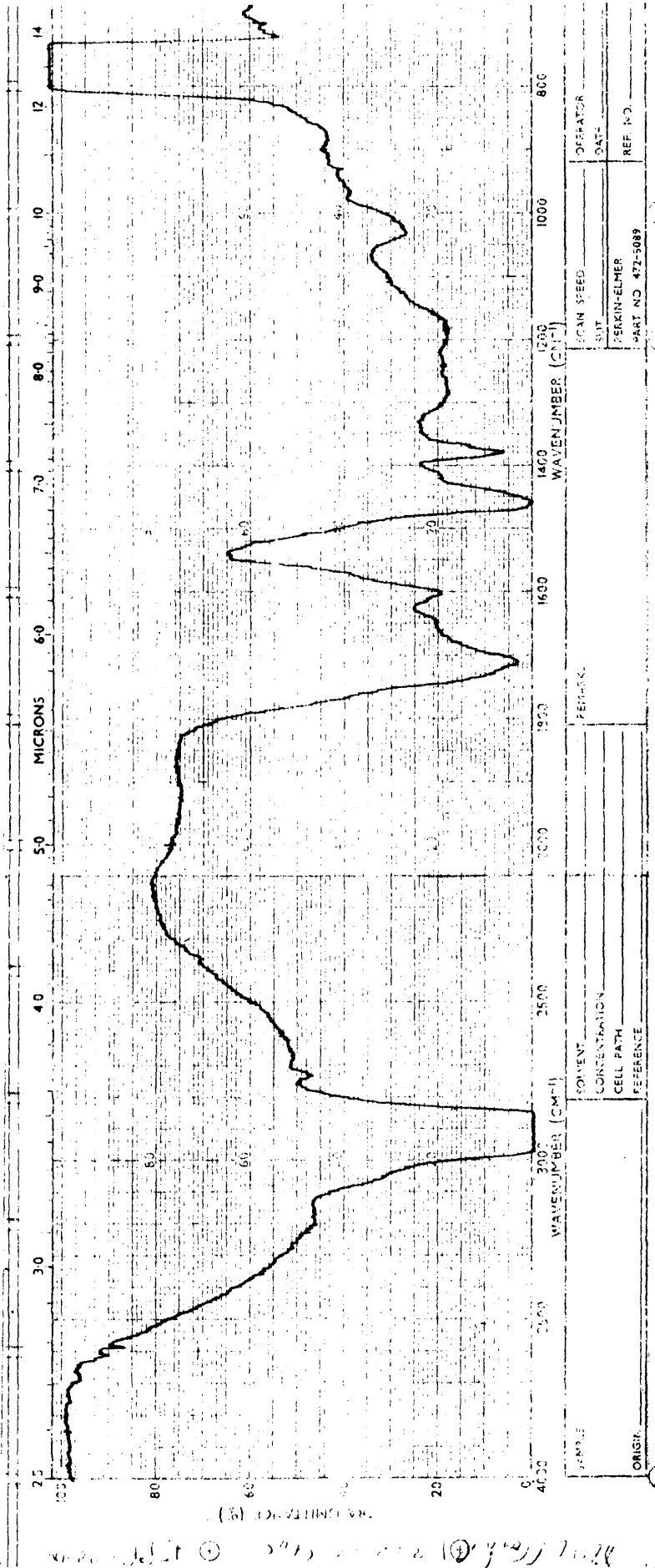
OPERATOR _____
 DATE _____
 REF. NO. _____

Gráfica 190: Experimento control. Fracción benceno.



SAMPLE	SOLVENT	CONCENTRATION	CELL PATH	REFERENCE	REMARKS	SCAN SPEED	OPERATOR
						SPLIT	DATE
ORIGIN						PERKIN-ELMER	REF. NO.
						PART NO. 472-5089	

Gráfica 191. Experimento control. Fracción propanol-2.



Gráfica 192. Experimento control. Fracción propanol-2. 30% en pes.
en CCl_4 .

ORIG.:	PERKIN-ELMER	OPERATOR:
SAMPLE:	PART NO 472-5089	DATE:
SOLVENT:	SCAN SPEED:	REF. NO.:
CONCENTRATION:	WAVENUMBER (CM ⁻¹):	
CELL PATH:	1200	
REFERENCE:	1000	
	800	

Tabla LXXV

Números de onda de las bandas diferenciales entre las distintas fracciones y sus controles.

Estirpe P-1.

Fracción parafínica	Fracción aromática	Fracción residual
720 (aumenta)	Sin variaciones	3600-3100(ancha)(f) 2800-2400(ancha)(f) 1710 (aumenta) 1380 (aumenta) 1260 (m) 1155 (m) 1100 (m) 1020 (aumenta) 875 (m) 805 (f)

Tabla LXXVI

Número de onda de las bandas diferenciales entre las distintas fracciones y sus controles.

Estirpe P-4.

Fracción parafínica	Fracción aromática	Fracción residual
1300-800 (aumenta) 1205 (aumenta) 1150 (aumenta) 1170 (aumenta) 970 (aumenta) 930 (aumenta) 720 (disminuye)	Sin variaciones	3600-3100(ancha)(f) 2800-2400(ancha)(f) 1710 (aumenta) 1600 (disminuye) 1460 (disminuye) 1380 (disminuye) 1235 (d) 1130 (d) 1010 (f) 940 (m) 880 (m)

al control, lo que indica que han sido utilizadas en mayor cantidad las parafinas ramificadas que las lineales.

En la fracción aromática, las variaciones que aparecen son debidas exclusivamente a la contaminación de la muestra -- por una silicona. Consideramos que esta fracción no ha sido modificada en absoluto por el cultivo.

Finalmente, en la fracción residual, las variaciones -- con respecto al control son las siguientes:

En la región 3500-2500, aumenta mucho la absorción, -- siendo debido este aumento tanto a vibraciones de OH alcohólicos como carboxílicos y a juzgar por la forma de la banda, son más abundantes los primeros.

La relación entre las bandas a 2855, 2870, 2925 y 2960 de tensión simétrica y asimétrica de CH₂ y CH₃ indica un --- aumento en la proporción de grupos metilo sobre grupos metileno, respecto de las moléculas oxidadas que había ya en el gasoil original.

Este hecho queda confirmado si se tiene en cuenta las bandas a 1365, 1375 y 1460 cm⁻¹, de la que la última disminuye considerablemente en relación con las otras dos, mientras que la primera (debida a grupos isopropilo) aumenta en relación -- con la segunda.

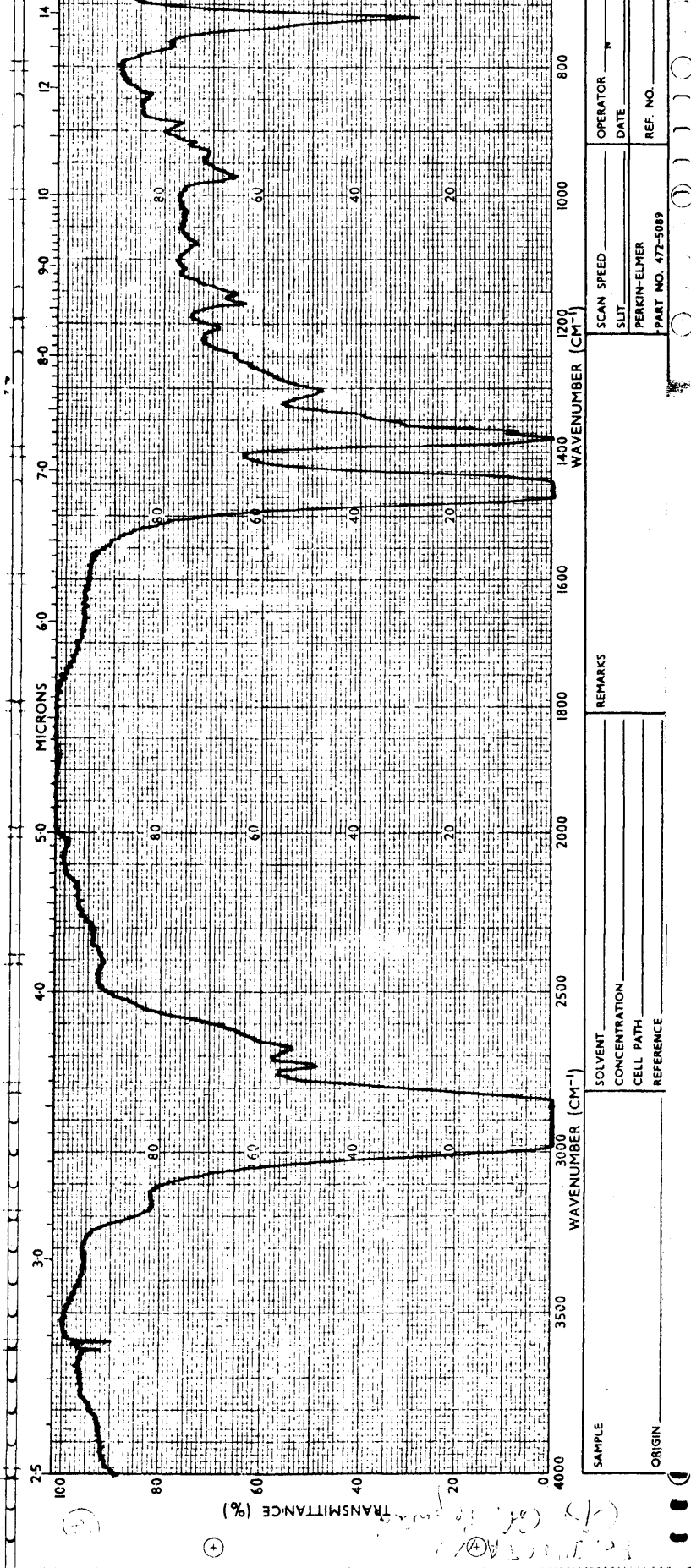
Esta interpretación es normal, pues hemos supuesto que las cadenas oxidadas son en mayor proporción ramificadas que -- lineales.

La región 1800-1600 cm⁻¹ se caracteriza por el aumento relativo de la banda carbonílica a 1710 cm⁻¹ mientras la banda 1600 cm⁻¹ no parece variar de intensidad ó acaso disminuye ligeramente. Esto sugiere que no se han formado dobles enlaces -- en la oxidación bacteriana.

En la región 1600-800 cm⁻¹ aparecen bandas de silicona (1260, 1100, 1030 y 800) que contaminaron la muestra al ser destilada. El resto de las bandas (1155, 1020 y 875) son de poco valor diagnóstico, pudiendo suponerse las de 1155 y 1020 cm⁻¹ debidas a vibraciones de tensiones de enlaces C-O, siendo la segunda debida a alcoholes primarios con mucha probabili---dad.

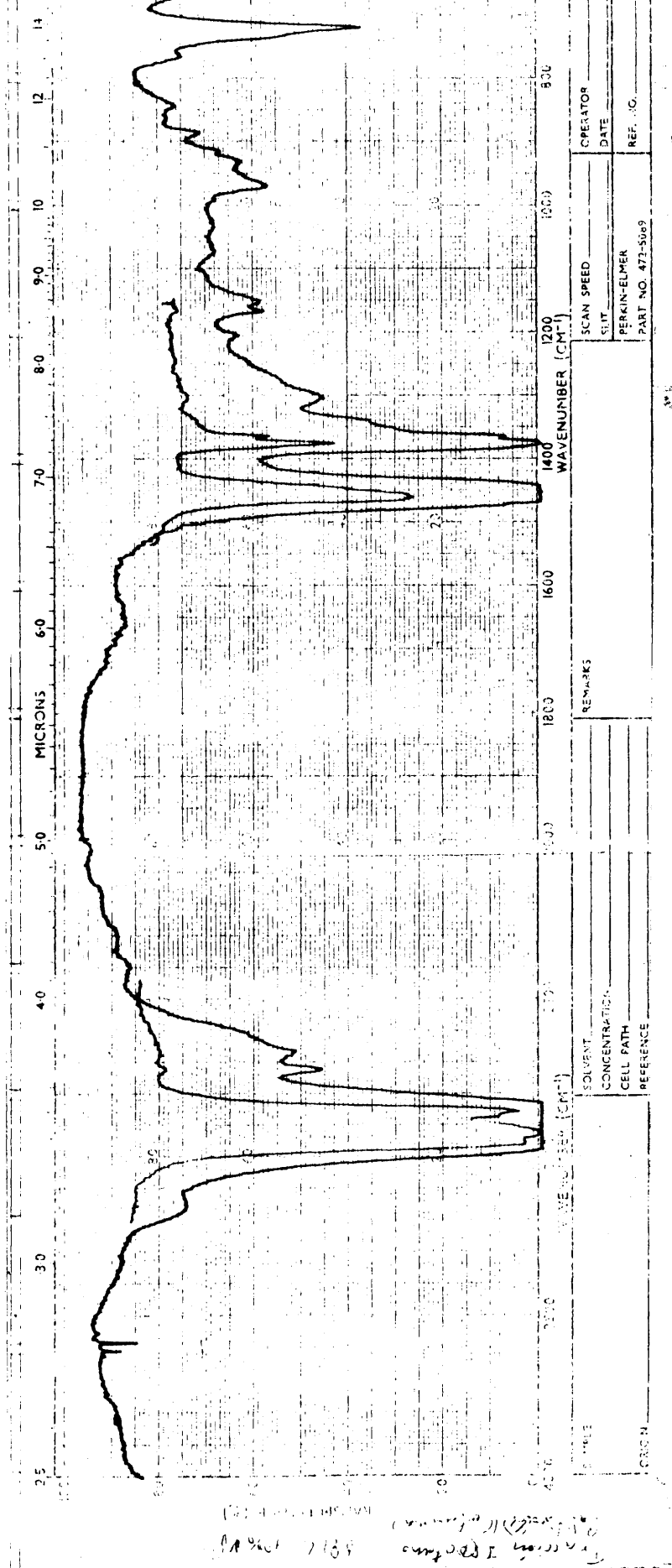
En cuanto al tipo de grupo carbonilo, las bandas a -- 3500-2300, 1710 y 1165 parece indicar que es un ácido carboxílico. En cualquier caso, estos compuestos son escasos a juzgar por la intensidad de estas bandas, siendo más abundantes en estos espectros los alcoholes, probablemente primarios (banda intensa a 1020 cm⁻¹).

En la región 800-625 cm⁻¹ solo cabe destacar la banda a 720 cm⁻¹, que presenta muy poca intensidad y nos indica la -- ausencia de cadenas mayores de 4 grupos de CH₂ seguidos, con lo cual se puede asegurar que las moléculas no han sido tan solo oxidadas sino que también han sido acortadas. Hay que tener en cuenta sin embargo, que no podemos establecer una compara---



SAMPLE	SOLVENT	SCAN SPEED	OPERATOR
ORIGIN	CONCENTRATION	SLIT	DATE
	CELL PATH	PERKIN-ELMER	REF. NO.
	REFERENCE	PART NO. 472-5089	

Gráfica 193. Estirpe P-1. Cultivo en gas-oil. Fracción parafínica



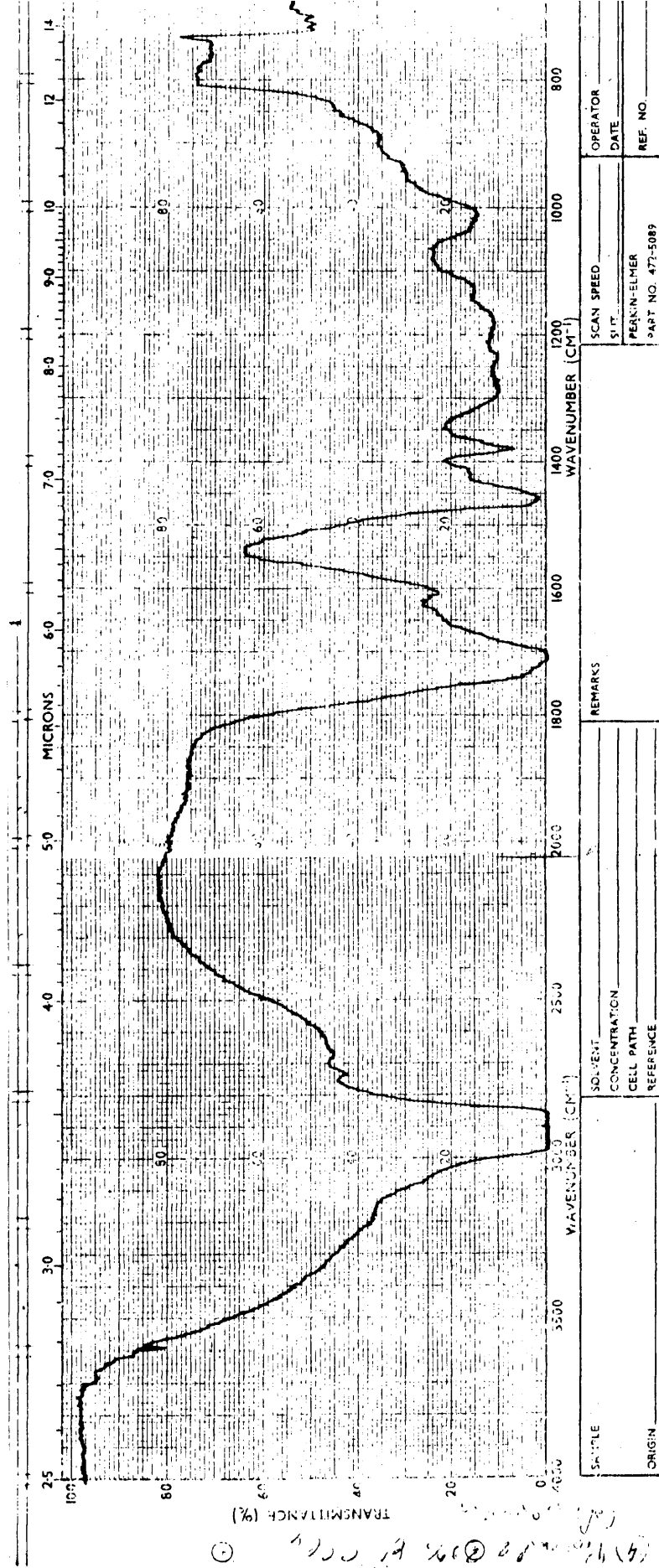
Fracción I (Parafina)
 50% (10% V)
 1966

OPERATOR _____
 DATE _____
 PERKIN-ELMER
 PART NO. 473-5009
 REF. NO. _____

SCAN SPEED _____
 SLIT _____
 REMARKS _____

SOLVENT _____
 CONCENTRATION _____
 CELL PATH _____
 REFERENCE _____

Gráfica 196. Estirpe P-4. Cultivo en gas-oil. Fracción parafínica



Gráfica 198. Estirpe P-4. Cultivo en gas-oil. Fracción residual.
30% en peso en CCl₄.

SAMPLE	SOLVENT	SCAN SPEED	OPERATOR
	CONCENTRATION	SIT.	DATE
ORIGIN	CELL PATH	PEAKIN-ELMER	REF. NO.
	REFERENCE	PART NO. 477-5089	

(4) 100% en CCl₄ (2) 30% en CCl₄

ción de esta banda con la de otros espectros, pues la concentración en la célula de 0,1 mm es mucho mayor que la utilizada en estos espectros entre cristales de ClNa.

Estirpe P-4

En la fracción parafínica se puede observar diferencias notables debidas a la utilización muy selectiva de las parafinas lineales.

Las bandas correspondientes a n-parafinas han disminuido de intensidad (particularmente la de 720 cm^{-1}) mientras que las que corresponden a vibraciones de grupos metilo han aumentado (especialmente 1150 , 1170 , 970 , y 930 cm^{-1}).

La fracción aromática no presenta tampoco en este caso ninguna variación apreciable.

En cuanto a la fracción residual los datos que podemos obtener de ella son los siguientes:

En la región 3500-3100 de nuevo aparecen bandas de vibraciones de tensión de OH alcohólicos ($3400-3200$) con fuerte asociación intermolecular y vibraciones del mismo tipo para OH carboxílicos ($3500-2300$).

Entre $1800-1600\text{ cm}^{-1}$ aparecen bandas hacia 1740 , probablemente exageradas por la banda muy fuerte 1710 y la banda 1600 cm^{-1} cuya intensidad ha disminuido ligeramente respecto al control. Tampoco esta estirpe produce al parecer insaturaciones. El hombro hacia 1740 cm^{-1} sugiere la presencia de C=O en ésteres ó aldehidos. La ausencia de una banda intensa hacia $1250-1180$, sugiere que se trata de aldehidos, pues como ya se ha indicado la banda de vibraciones del enlace C-O en ésteres son intensas y la posición muy fija.

En la región 1600-800, destaca la disminución de las bandas a 1460 , 1365 y 1375 que ya han sido estudiadas.

Aparecen además tres bandas muy características de vibraciones de tensión del C-O y flexión del O-H en ácidos carboxílicos, $1410-20$, $1300-1235$ y 940 , que indica la presencia de estos grupos funcionales.

La banda a 1010 , la suponemos debida como siempre a vibraciones de tensión C-O y flexión O-H en alcoholes primarios.

Estirpe K-21

Las variaciones en la fracción parafínica son esencialmente iguales a las de la estirpe anterior, por lo que prescindimos de comentarlas.

En la fracción aromática tampoco en este caso se observan variaciones.

Tabla LXXVII

Número de onda de las bandas diferenciales entre las distintas fracciones y sus controles.

Estirpe K-21.

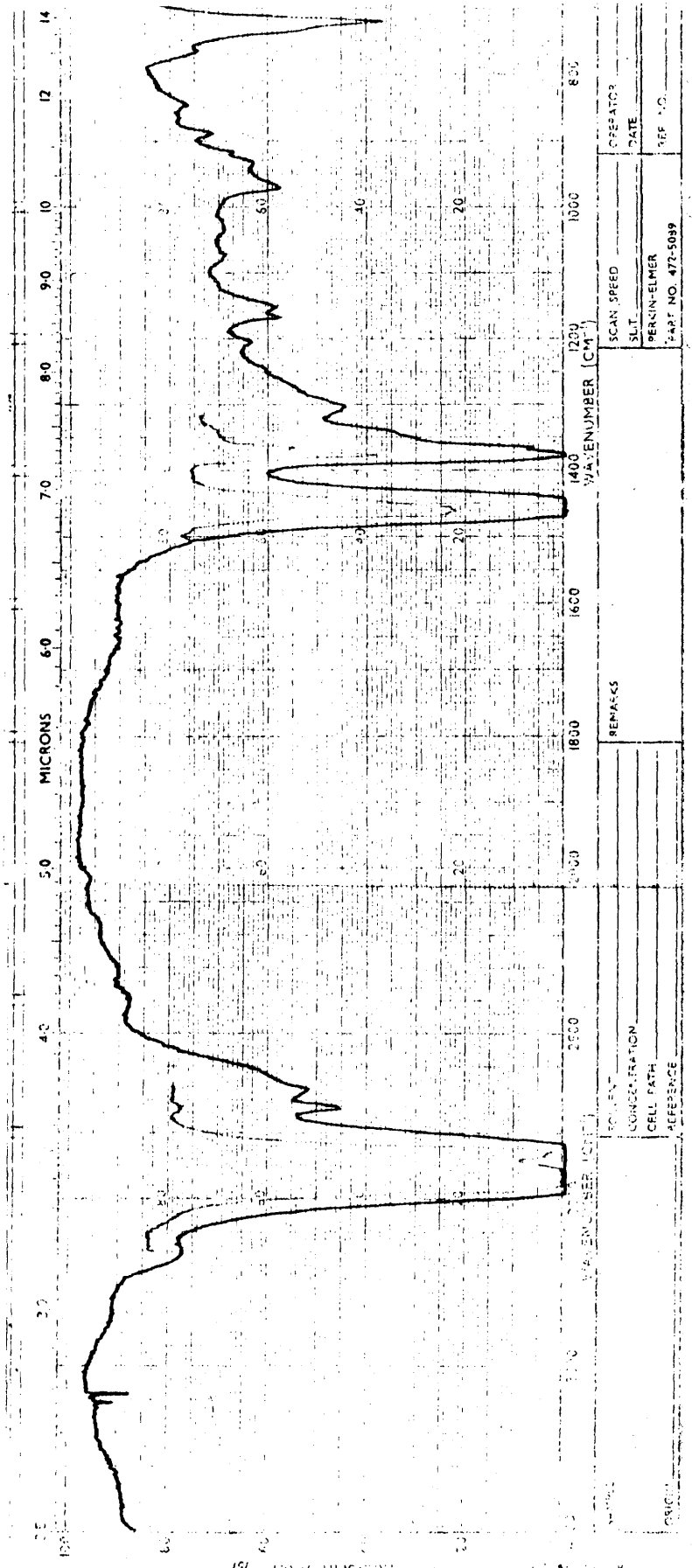
Fracción parafínica	Fracción aromática	Fracción residual
1300-800 (aumenta)	Sin variaciones	3600-3100(ancha)(f)
1205 (aumenta)		2800-2400(ancha)(m)
1170 (aumenta)		1710 (aumenta)
1150 (aumenta)		1380 (aumenta)
970 (aumenta)		1300-800 (aumenta)
930 (aumenta)		1290 (f)
915 (aumenta)		1240 (f)
720 (disminuye)		1175 (f)
		1130 (m)
	1010 (f)	
	890 (d)	
	820 (aumenta)	

Tabla LXXVIII

Número de onda de las bandas diferenciales entre las distintas fracciones y sus controles.

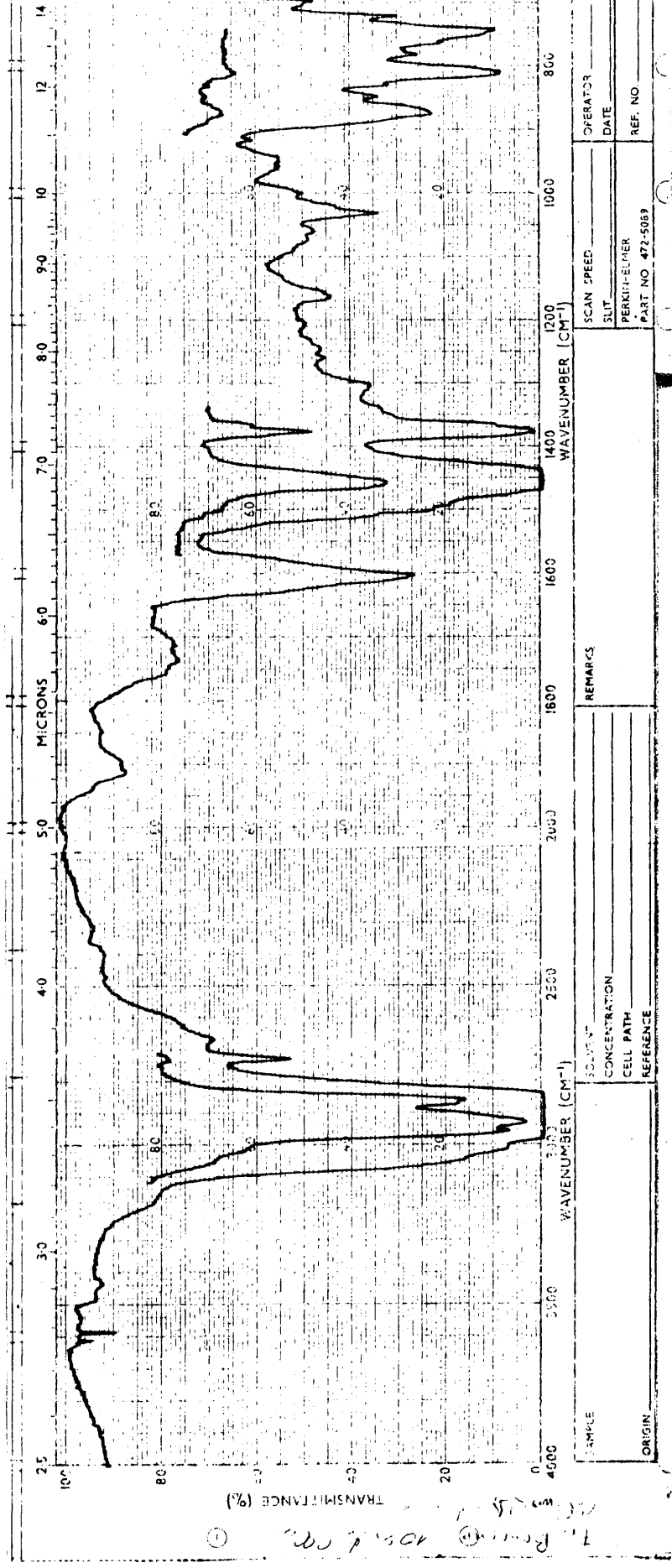
Estirpe P-34.

Fracción parafínica	Fracción aromática	Fracción residual
1300-800 (aumenta)	1705 (m)	3600-3100(ancha)(f)
1170 (aumenta)		2800-2400(ancha)(m)
1150 (aumenta)		1710 (aumenta)
970 (aumenta)		1635 (d)
720 (disminuye)		1610 (disminuye)
* Las bandas a 1260, 1100, 1020 y 800 cm^{-1} corresponden a una contaminación con silicona.		1155 (m)
		1110 (m)
		1030 (aumenta)
		890 (d)
		820 (aumenta)
		790 (m)
		720 (disminuye)



Gráfica 199. Estirpe K-21. Cultivo en gas-oil. Fracción parafina-
Ca.

(Handwritten notes and signatures)



OPERATOR _____
 DATE _____
 SCAN SPEED _____
 SLIT _____
 PERKIN-ELMER
 PART NO. 472-5089
 REF. NO. _____

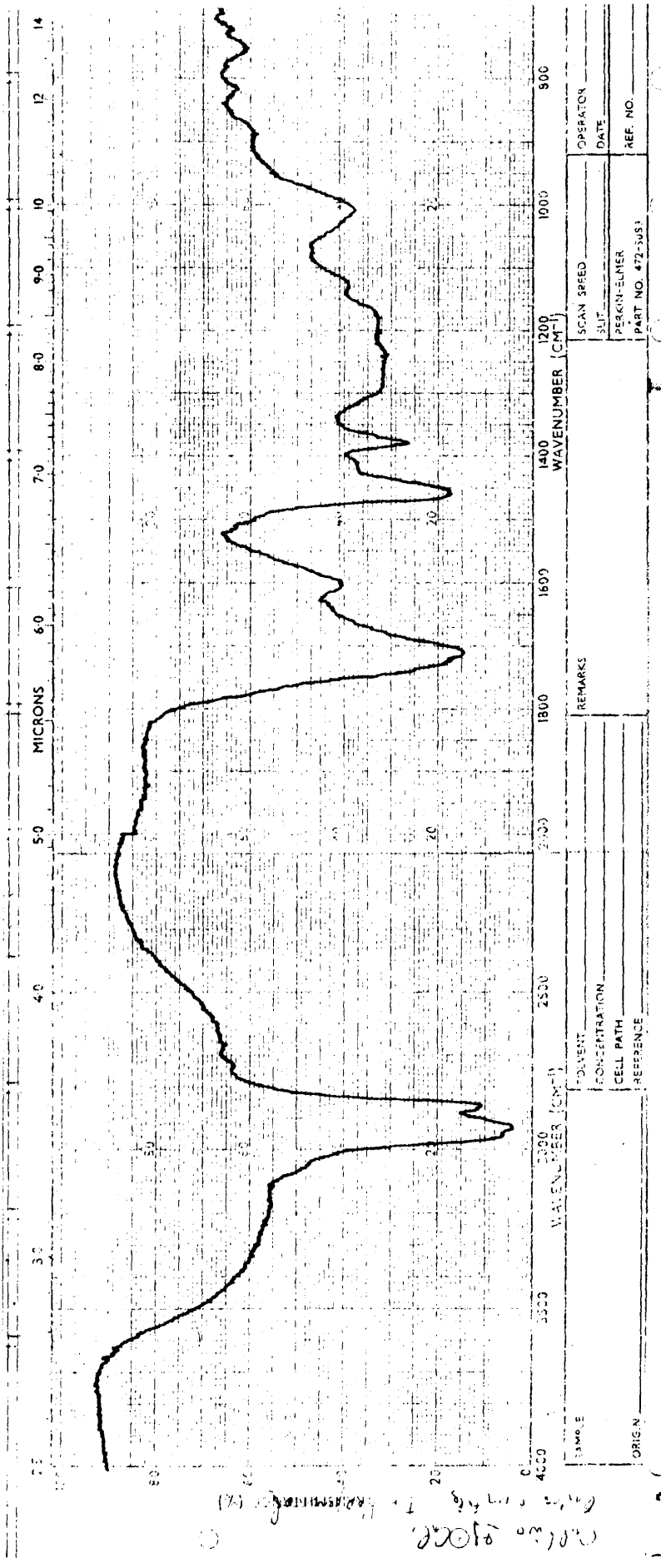
WAVENUMBER (CM⁻¹)
 4500 3500 3000 2500 2000 1600 1400 1200 1000 800

MICRONS
 2.5 3.0 4.0 5.0 6.0 7.0 8.0 9.0 10 12 14

REMARKS
 CONCENTRATION _____
 CELL PATH _____
 REFERENCE _____

SAMPLE _____
 ORIGIN _____

Gráfica 200. Estirpe K-21. Cultivo en gas-oil. Fracción aromática.



Gráfica 201. Estirpe K-21. Cultivo en gas-oil. Fracción residual.

4000	3000	2500	1800	1600	1400	1200	1000	500
WAVENUMBER (CM ⁻¹)								
SAMPLE			SOLVENT			REMARKS		
ORIGIN			CONCENTRATION			SCAN SPEED		
			CELL PATH			SLIT		
			REFERENCE			PERKIN-ELMER		
						DATE		
						REF. NO.		
						PART NO. 472-3051		

En la fracción residual se apuntan las siguientes características. En primer lugar la intensidad de la banda OH de alcoholes 3500-3100, que suponemos apoyada en la banda también muy intensa a 1010 cm^{-1} . El aspecto de esta banda ancha, coincide con el de otras que han sido asignadas de igual manera en espectros anteriores.

Se observa también la disminución de intensidad de -- las bandas parafínicas y particularmente correspondientes a -- grupos metilo (2800-3000 y 1300-1500).

Las bandas de la región 1800-1600 presentan el mismo aspecto que en el caso anterior, pero la de 1710 cm^{-1} no está asociada a otras bandas que pueden decidir sobre su naturaleza carboxílica, tal vez porque el espectro está hecho con menos -- concentración de muestra.

Las bandas entre 1100 y 1300 cm^{-1} , aunque de gran intensidad, no permiten añadir nada a la asignación de las bandas carbonílicas.

Finalmente, a pesar de la disminución de intensidad -- de la banda a 720 cm^{-1} en la fracción parafínica, estas cadenas no aparecen en fracción residual por lo que se puede deducir que han sido acortadas en el metabolismo. La banda a 720 cm^{-1} es de muy débil intensidad en esta última fracción.

Estirpe P-34

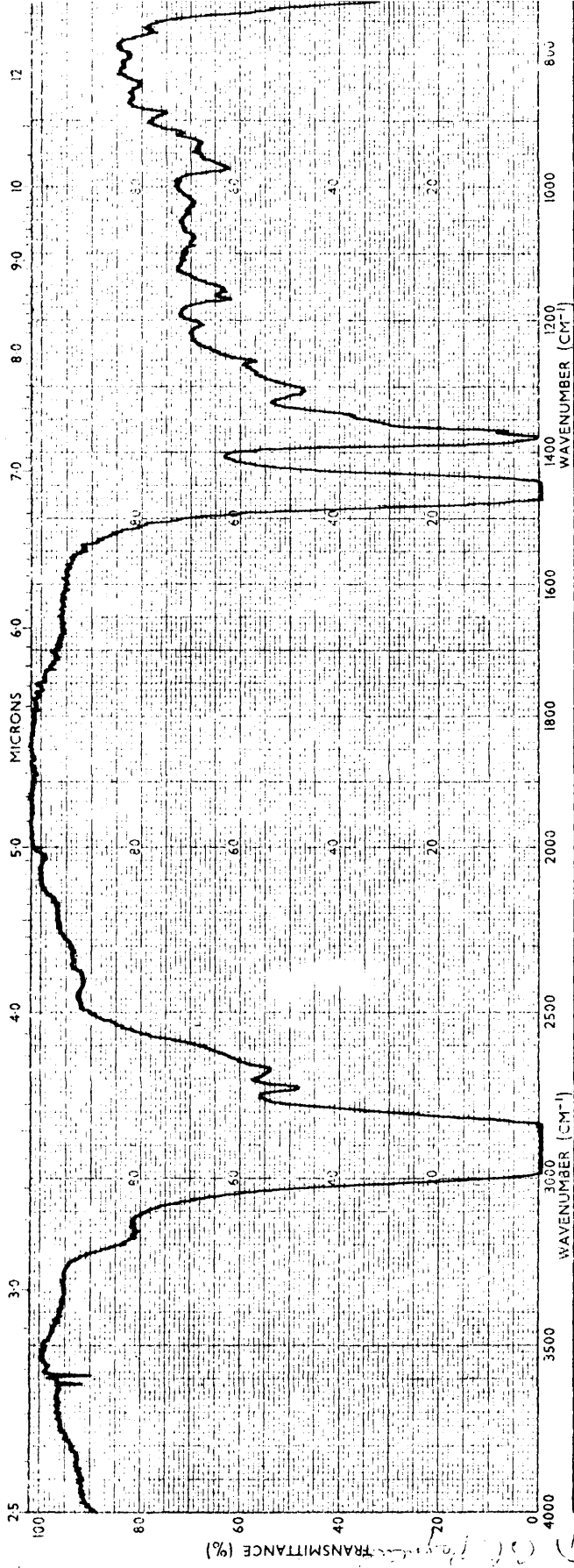
En la fracción parafínica, se observa una utilización selectiva de cadenas lineales, no tan marcada como en las dos estirpes anteriores.

En la fracción aromática aparece una banda de mediana intensidad a 1705 cm^{-1} . A nuestro parecer esto indica la presencia de un compuesto oxidado que por su carácter muy aromático ha sido incluido en la fracción bencénica. Sin embargo es -- imposible decidir nada sobre la naturaleza de la banda C=O correspondiente.

En la fracción residual las bandas de OH alcohólicos son de poca intensidad comparadas con las de otros espectros. La absorción entre 3500 y 2300 indica OH carboxílicos.

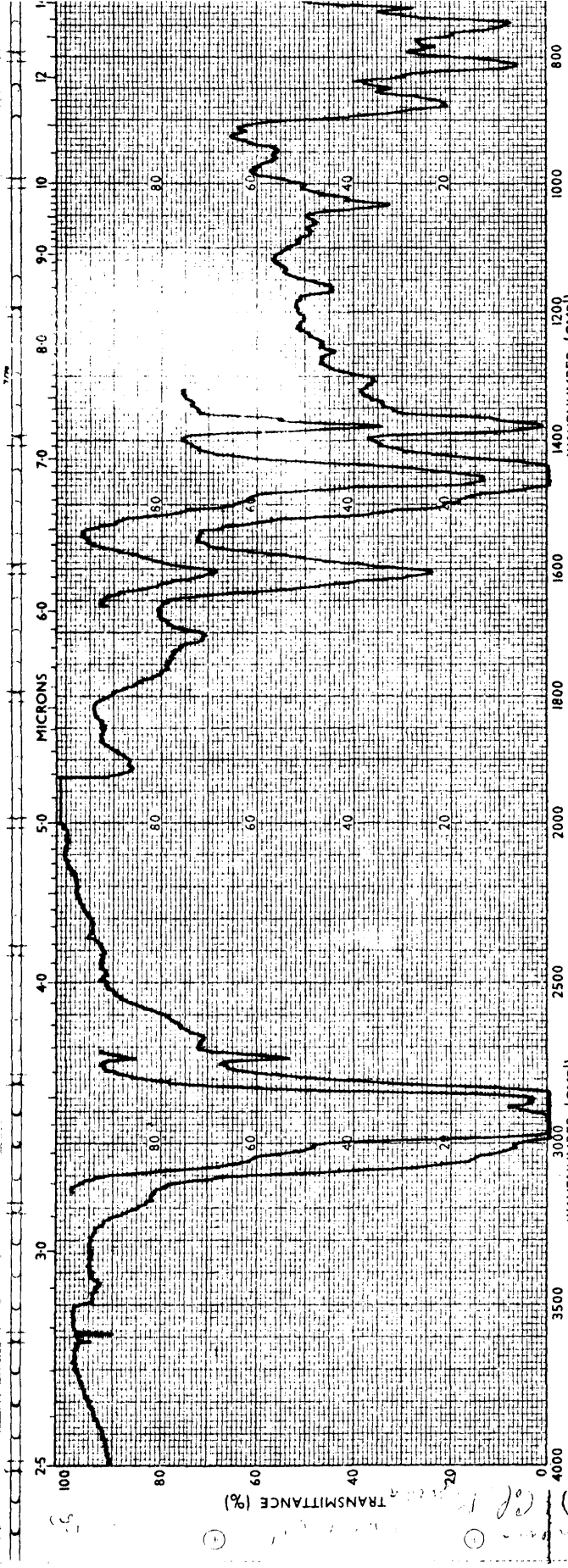
En la región 1700-1600 aparecen además de las bandas a 1710 y 1600 (esta última de mayor intensidad que en el control) una nueva a 1630 que debe corresponder a dobles enlaces no conjugados. Esta hipótesis se basa en la presencia de las -- bandas a 890 (más intensa que en otros espectros) y a 790 cm^{-1} (que aparece aquí por primera vez). La presencia de estas bandas excluye la posibilidad de que este doble enlace sea conjugado, lo cual es de gran interés por la información que supone sobre el tipo de metabolismo. Por otra parte, la vibración de tensión de este doble enlace (C=C) justificaría el ligero amento de absorción hacia 3060 cm^{-1} .

Las bandas a 1460 y 1365-1375 muestran la misma disminución de intensidad que en otros espectros anteriores.



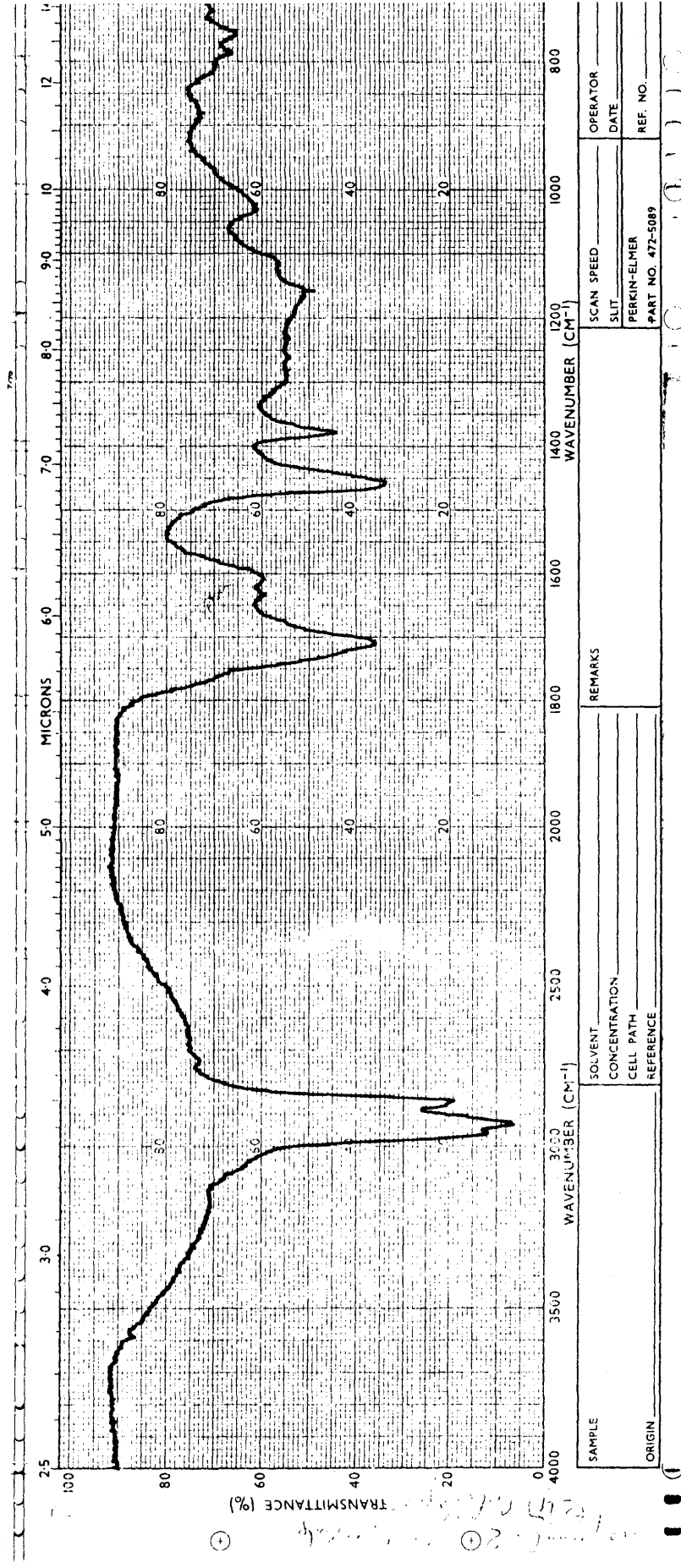
SAMPLE	SOLVENT	REMARKS	SCAN SPEED	OPERATOR
ORIGIN	CONCENTRATION		SLIT	DATE
	CELL PATH		PERKIN-ELMER	
	REFERENCE		PART NO. 472-5089	REF. NO.

Gráfica 202. Estirpe P-34. Cultivo en gas-oil. Fracción parafínica



SAMPLE	SOLVENT	REMARKS	SCAN SPEED	OPERATOR
	CONCENTRATION		SLIT	DATE
ORIGIN	CELL PATH		PERKIN-ELMER	REF. NO.
	REFERENCE		PART NO. 472-5089	

Gráfica 203. Estirpe P-34. Cultivo en gas-oil. Fracción aromática



SAMPLE		SCAN SPEED		OPERATOR	
ORIGIN		SLIT		DATE	
SOLVENT		PERKIN-ELMER		REF. NO.	
CONCENTRATION		PART NO. 472-5089			
CELL PATH					
REFERENCE					
REMARKS					

Gráfica 204. Estirpe P-34. Cultivo en gas-oil. Fracción residual.

Tabla LXXIX

Número de onda de las bandas diferenciales entre las distintas fracciones y sus controles.

Estirpe G-39.

Fracción parafínica	Fracción aromática	Fracción residual
720 (aumenta)	1755 (d) 1705 (d)	3600-3100(ancha)(f) 2800-2400(ancha)(f) 1710 (aumenta) 1635 (m) 1290 (d) 1240 (d) 1170 (f) 1030 (aumenta) 965 (d) 890 (d) 785 (d)
<p>*Nota: Las diferencias a 1365, 1245, 1205 y 1170 son debidas a la presencia de restos de isooctano en las muestras.</p>		

Tabla LXXX

Número de onda de las bandas diferenciales entre las distintas fracciones y sus controles.

Estirpe G-43.

Fracción parafínica	Fracción aromática	Fracción residual
1200 (aumenta) 1170 (aumenta) 1150 (aumenta) 970 (aumenta) 725 (aumenta) 720 (disminuye)	1730 (f) 1165 (f) 675 (f)	3600-3100(ancha)(f) 2800-2400(ancha)(f) 1710 (aumenta) 1600 (disminuye) 1540 (d) 1410 (m) 1290 (m) 1240 (m) 1170 (m) 1070 (d) 940 (d) 860 (d) 745 (m)

El resto de las bandas corresponde a vibraciones ya estudiadas de enlaces C-O y O-H pero no permiten obtener datos. En este espectro la más intensa aparece a 1155, 1110 y 1030 cm^{-1} ; con estas bandas se podría pensar que es grande la proporción de ácidos carboxílicos y débil la de alcoholes. En estos últimos la banda hacia 1030 aparece débil a números de onda ligeramente menores y de mayor intensidad.

Estirpe G-39

En la fracción parafínica, destaca sobre todo la intensidad de la banda a 720 cm^{-1} que indica que se han utilizado sobre todo parafinas ramificadas, habiendo aumentado en consecuencia la intensidad de la misma.

En la fracción aromática, las bandas de C=O podemos suponerlas aromáticas, al ir acompañadas de una nueva a 675 cm^{-1} , que implica una vibración de flexión del CH fuera del plano, distinta de las que teníamos. Sin embargo, dada la débil intensidad de estas bandas no cabe asignarlas más concretamente.

En la fracción residual la banda de OH alcohólicos es un poco más intensa, y viene apoyada por una banda a 1010 y tal vez influya a 1030 cm^{-1} , donde interfiere con la banda carboxílica.

Las bandas carboxílicas son más débiles (3500-2700) y lo mismo ocurre con la de carbonilos a 1710 cuya intensidad respecto al control aumenta ligeramente.

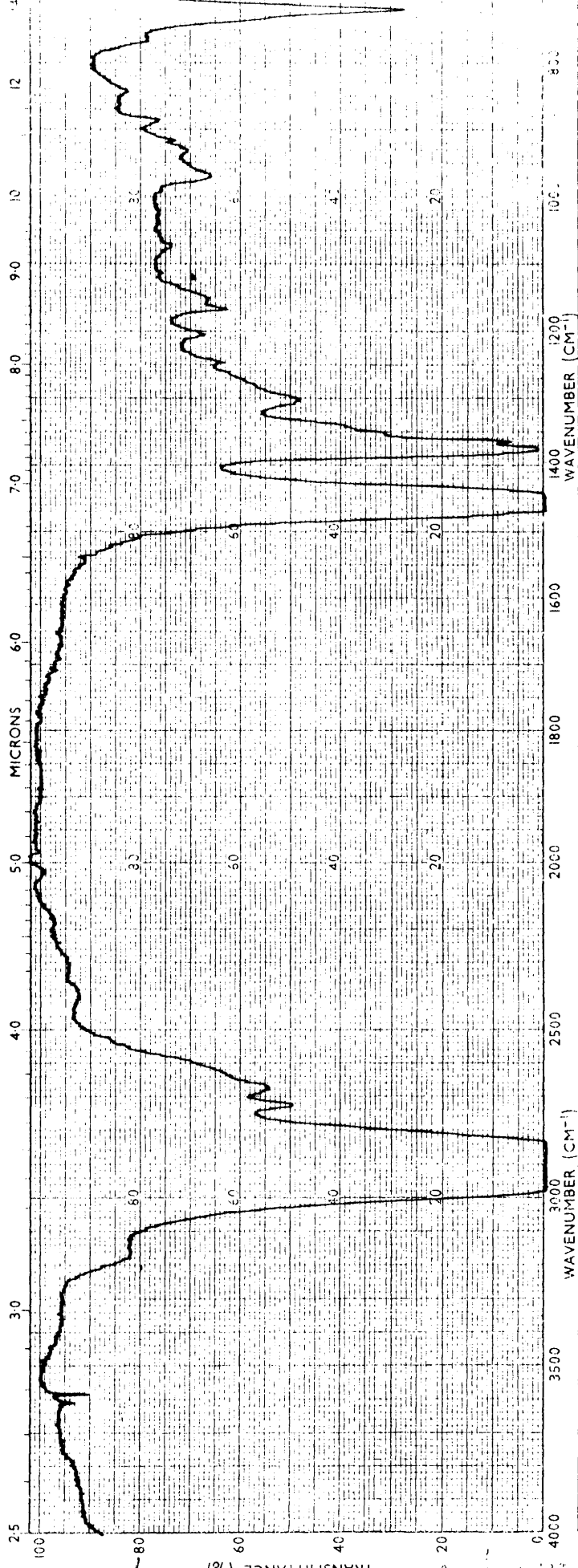
Es interesante observar aquí la relación de intensidades entre las bandas a 1710 y a 1460 y 1365-75, comparándolas con otros espectros. En este caso, las bandas de vibraciones de grupos CH_3 y CH_2 son proporcionalmente más intensas, lo que indica una mayor oxidación en la molécula ó mejor un "resto" parafínico mayor, aunque no son cadenas largas (banda a 720 cm^{-1} muy pequeña).

En la región 1600-1700 hay que resaltar la presencia de una banda nueva a 1635 cm^{-1} lo que equivale a una insaturación de otro tipo distinto al que había ya en el gas-oil original. Esta banda es bastante intensa si se la compara con la de 1605 cm^{-1} que parece que no ha variado. Va acompañada de bandas muy débiles en la región de flexión de enlaces CH (900-625 cm^{-1}) que permiten afirmar de nuevo que este doble enlace no es conjugado (890 y 790 cm^{-1}).

En la región 1300-900 destaca la banda intensa a 1170 cm^{-1} que, debe ser en parte debida a grupos carboxílicos (ya que se observan además bandas a 940 y 1290 aunque son débiles) y en parte a grupos alcohólicos.

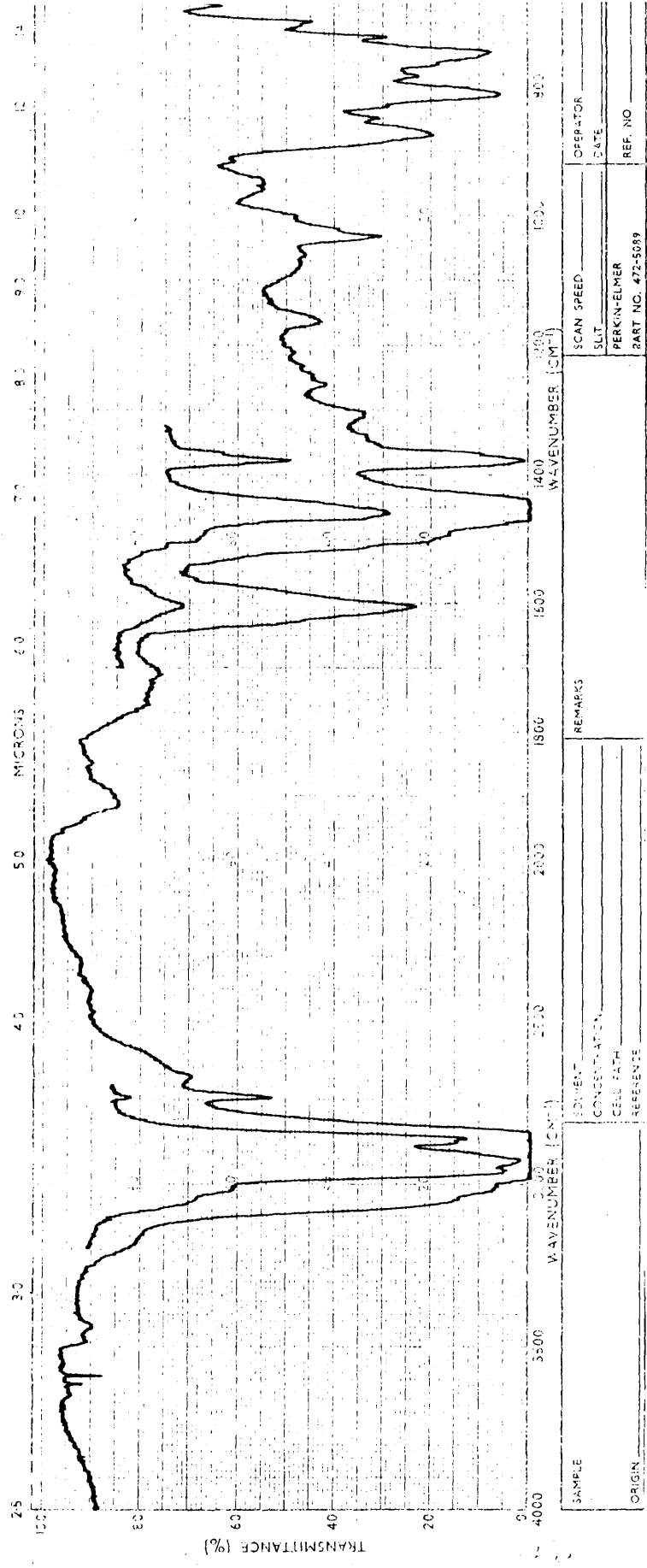
Estirpe G-43.

En la fracción parafínica se comprueba la desaparición---



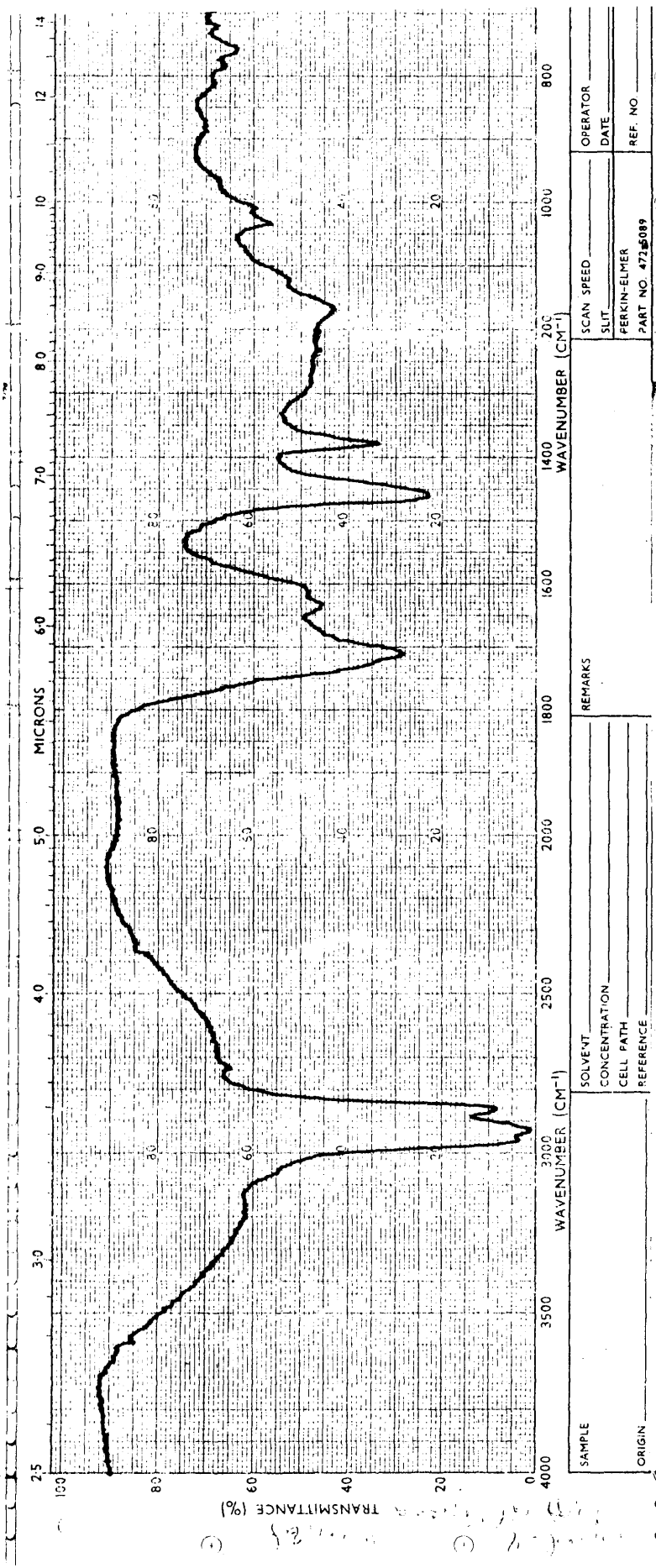
SAMPLE	SCAN SPEED		OPERATOR
	SLIT		DATE
ORIGIN	PERKIN-ELMER		REF. NO.
	PART NO 472-5089		

Gráfica 205. Estirpe G-39. Cultivo en gas-oil. Fracción parafínica



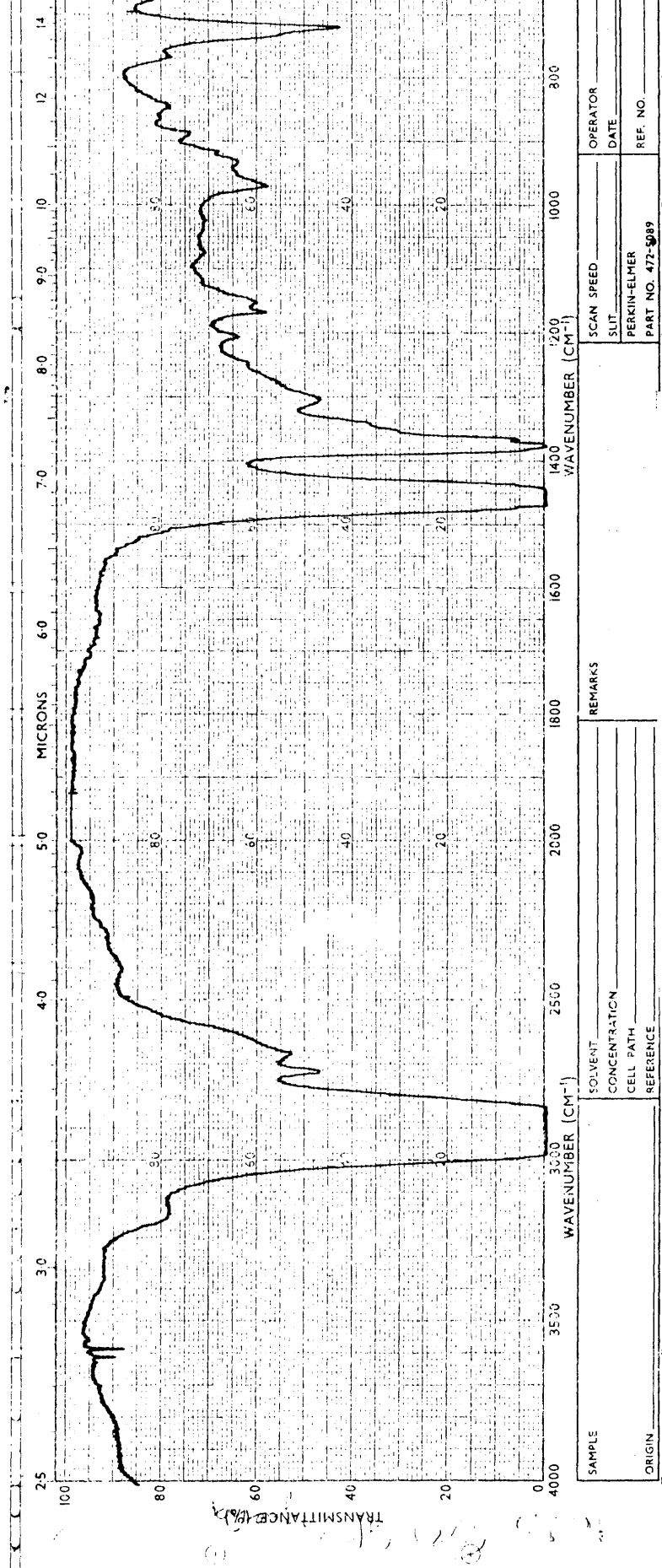
Gráfica 206. Estirpe G-39. Cultivo en gas-oil. Fracción aromática.

SAMPLE	REMARKS	SCAN SPEED	OPERATOR
ORIGIN		SLIT	DATE
		PERKIN-ELMER	REF. NO.
		PART NO. 472-5089	



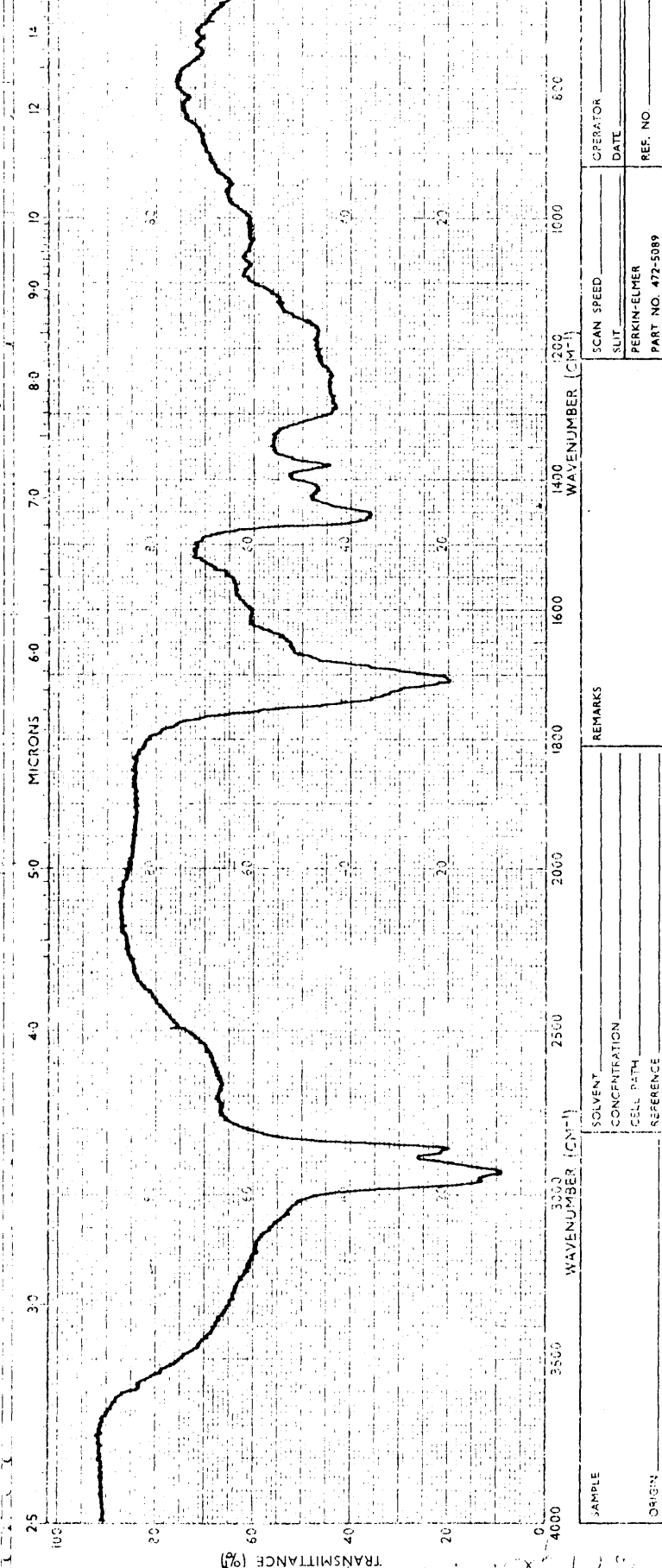
Gráfica 207. Estirpe G-39. Cultivo en gas-oil. Fracción residual.

SAMPLE	SOLVENT	REMARKS	OPERATOR
ORIGIN	CONCENTRATION		DATE
	CELL PATH		REF. NO.
	REFERENCE		
		SCAN SPEED	
		SPLIT	
		PERKIN-ELMER	
		PART NO. 4728089	



SAMPLE		SCAN SPEED		OPERATOR	
ORIGIN		SLIT		DATE	
SOLVENT		PERKIN-ELMER		REF. NO.	
CONCENTRATION		PART NO. 472-989			
CELL PATH					
REFERENCE					
REMARKS					

Gráfica 208. Estirpe G-43. Cultivo en gas-oil. Fracción parafínica



Gráfica 210. Estirpe G-43. Cultivo en gas-oil. Fracción residual.

ción de cadenas lineales, por las vibraciones en la intensidad de las bandas descritas para otros espectros. Se puede observar además el hombro a 725 cm^{-1} más acentuado. Por la intensidad de la banda a 720 cm^{-1} podemos deducir que las parafinas lineales han desaparecido casi en su totalidad.

En la fracción aromática aparece una banda fuerte a 1730 asociada con otra banda a 675 cm^{-1} . Aunque es raro que se tratara de un compuesto no aromático, cabría pensarlo; sin embargo precisamente esta segunda banda excluye la posibilidad. Con mucha probabilidad se trata de un aldehído aromático cuyo carbonilo no está conjugado. Este grupo aldehído haría desplazarse las bandas de vibración hacia posiciones distintas y este hecho explicaría la absorción a 675 , cuya intensidad es adecuada. La región $1250-1180$ permite excluir la posibilidad de un éster porque las bandas son excesivamente débiles para la vibración de tensión C-O. Lo mismo podemos decir de la banda a 1165 que además está demasiado baja.

En la fracción residual el carácter carboxílico de la banda a 1710 se puede suponer con bastante probabilidad. Lo confirman las bandas a $3500-2300$, 1410 , 1290 y 940 cm^{-1} .

Hay que destacar aquí también la desaparición casi total de la banda a 1600 cm^{-1} que aparecería en la fracción residual del espectro control, que sin embargo solo creemos debida a que la proporción de compuestos oxidados de la muestra original ha disminuido con relación al total de la muestra, sin que necesariamente se hayan metabolizado estos compuestos.

También es interesante notar la poca intensidad de las bandas correspondientes a grupos CH_3 y CH_2 , especialmente esta última, pues también aumenta la relación $\text{CH}_3 / \text{CH}_2$ a juzgar por la intensidad de las parejas de bandas $2855-2870$, $2925-2960$ y $1375-1460$. Este hecho se hace más patente comparando estas bandas con la carbonílica de 1710 cm^{-1} , e indica el "peso" que en estas moléculas tienen los C=O en relación con los metilos y metilenos.

En cuanto a OH alcohólicos, en este caso deben ser muy escasos, si los hay, pues la banda entre 3500 y 2300 es más bien carboxílica a juzgar por su forma y hacia $1030-1000\text{ cm}^{-1}$ no hay la absorción tan marcada que se da en otros espectros.

4.7.2. - Cultivo sobre la fracción parafínica.

Como última experiencia, se hizo un cultivo utilizando la fracción parafínica como fuente única de carbono, conservando las demás condiciones idénticas a cultivos anteriores. La estirpe ensayada fue la G-43, por ser especialmente activa en la oxidación y el crecimiento sobre parafinas.

Después de extraídos los hidrocarburos residuales por el método habitual ya descrito, se procedió a un fraccionamiento en la columna de cromatografía usada en el experimento anterior, por la que se hicieron pasar los siguientes eluyentes:

Isoctano	150 ml
Eter sulfúrico	100 ml
Acetona	100 ml
Propanol 1-2	150 ml

Los espectros IR de las distintas fracciones, una vez eliminados los disolventes, están representados en las gráficas 211, 212 y 213, salvo la última que no arrastró nada.

Asignación de bandas y discusión.

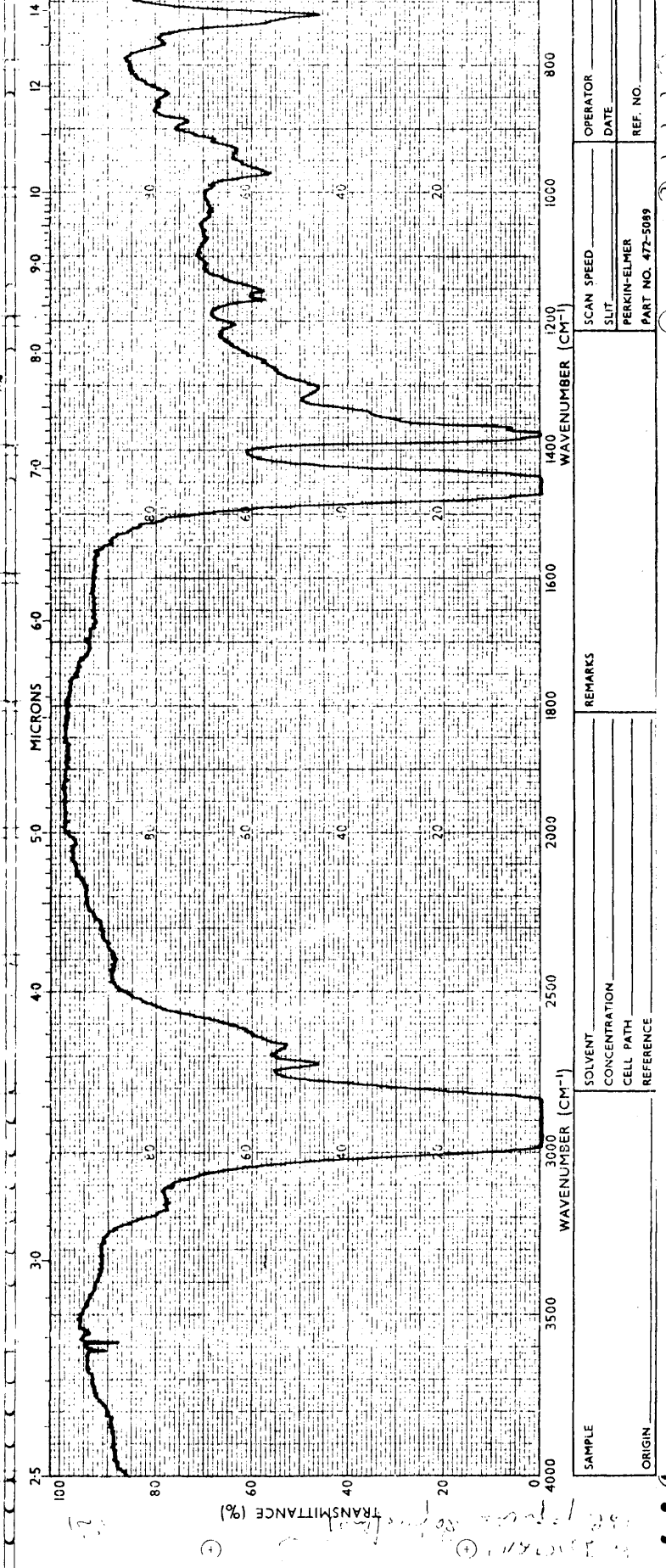
El espectro de la fracción parafínica muestra las mismas variaciones que en otros casos, demostrando, la utilización preferente de cadenas lineales.

En la fracción etérea aparecen compuestos oxidados de origen microbiano, pues hay que destacar que la fracción de la que hemos partido carecía absolutamente de ellos. Lo mismo se puede decir para la fracción acetona.

La consideración de estos dos espectros resulta de gran interés, pues denota la presencia de dos "grados" de oxidación diferentes. Los estudiaremos conjuntamente señalando las diferencias por regiones.

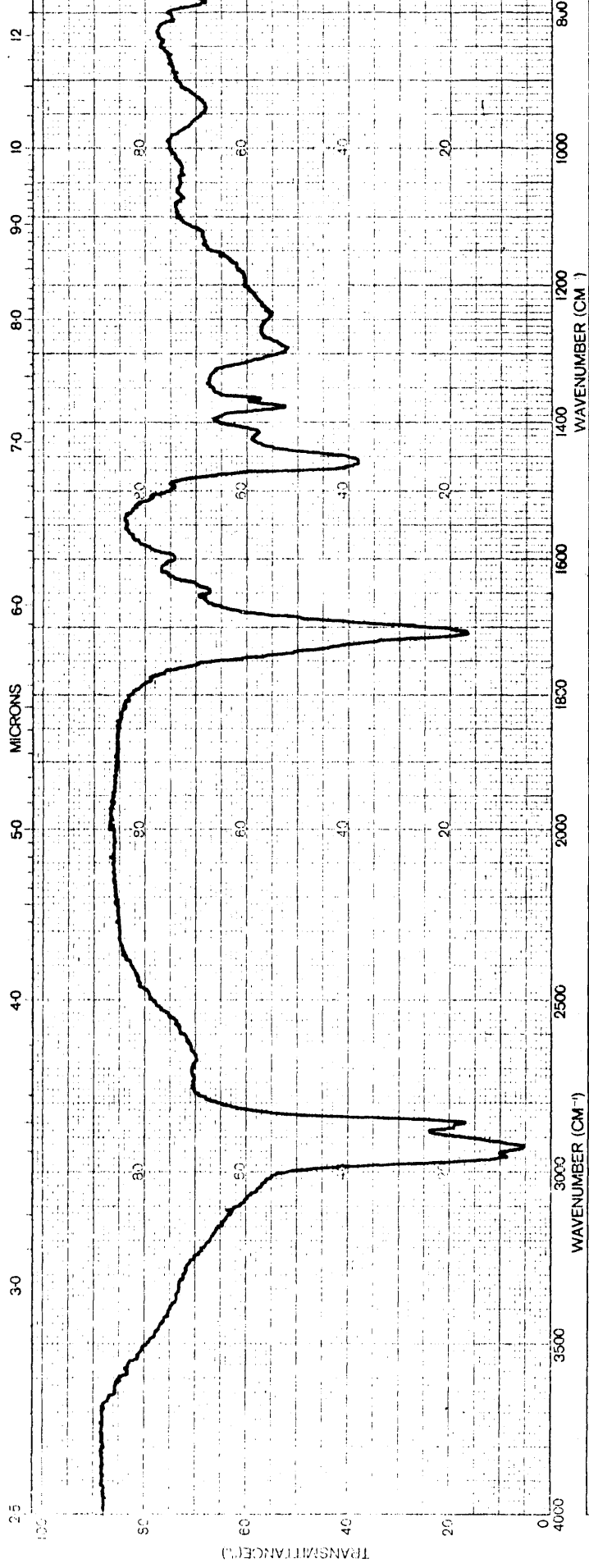
En la región 3500-2500, el espectro de la fracción etérea, muestra la presencia de vibraciones de tensión de OH de naturaleza exclusivamente carboxílicos, mientras el de la fracción acetona muestra además OH alcohólicos.

La relación CH_2 / CH_3 , es menor en el primer espectro que en el segundo a juzgar por la intensidad de las parejas de bandas a 2855, 2870 y 2925, 2960. Teniendo en cuenta la intensidad de este grupo de bandas en relación con la de vibraciones del C=O, podemos asegurar que la variación en la relación CH_2 / CH_3 no se debe a la longitud de la cadena (pues si la cadena fuera corta la proporción de grupos metilo sería mayor) sino a la presencia en la primera fracción de restos isopropilo. Se trata pues de una fracción de parafinas ramificadas oxidadas.



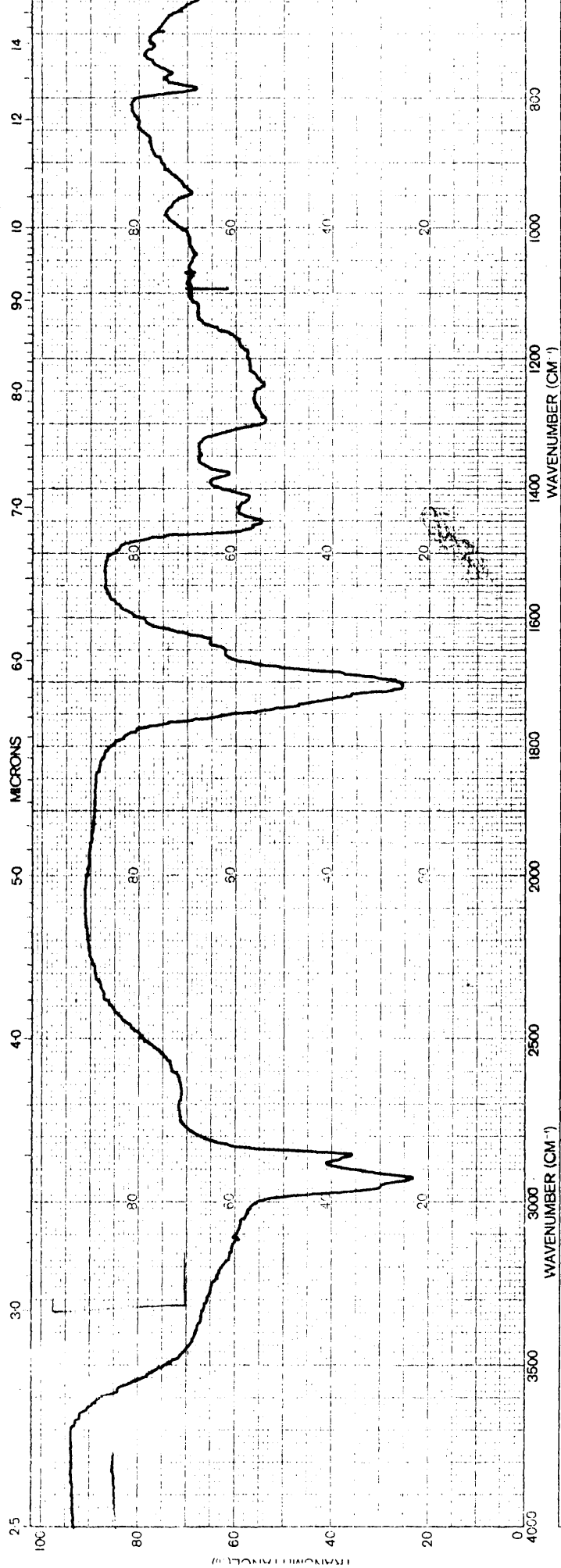
SAMPLE	SOLVENT	REMARKS	OPERATOR
ORIGIN	CONCENTRATION		DATE
	CELL PATH		PERKIN-ELMER
	REFERENCE		PART NO. 477-5089
			SCAN SPEED
			SLIT
			REF. NO.

Gráfica 211. Estirpe G043. Cultivo sobre parafinas. Fracción paraf



SAMPLE	SOLVENT	REMARKS	SCAN SPEED	OPERATOR
	CONCENTRATION		SLIT	DATE
ORIGIN	CELL PATH	PERKIN-ELMER	PART NO. 472-5089	REF. No.
	REFERENCE			

Gráfica 212. Estirpe G-43. Cultivo sobre parafinas. Fracción eluida con éter sulfúrico.



SAMPLE	SOLVENT	REMARKS	SCAN SPEED	OPERATOR
			CONCENTRATION	DATE
ORIGIN	CELL PATH	PERKIN-ELMER	SPLIT	REF. No.
	REFERENCE		PART NO. 472-5089	

Gráfica 213. Estirpe G-43. Cultivo sobre parafinas. Fracción eluida con acetona.

En la región 1800-1600, las bandas a 1710 cm^{-1} deben ser carboxílicas, a juzgar por las bandas de la región 1300-800. Hay que señalar la intensidad de esta banda en la fracción acetona, más polar que la otra y donde la absorbancia llega a ser casi tan grande como la de las bandas de vibraciones de valencia C-H.

En cambio, esta misma banda es de menor intensidad en la fracción etérea.

Las bandas a 1650, 1630 y 1600 corresponden a la presencia de dobles enlaces, de los que la última indica una conjugación con el carbonilo y sólo aparece en el espectro de la fracción etérea.

En la región 1600-1300 las vibraciones de flexión C-H dan bandas más intensas en la fracción etérea que confirman lo anterior, apareciendo además en esta misma fracción el doblete a 1365 cm^{-1} característico de grupos isopropilo.

La banda a 1415 cm^{-1} de flexión del C-O, apoya la idea del C=O carboxílico y su intensidad en ambos espectros confirma todo lo anteriormente dicho.

En la región 1300-800 cm^{-1} aparecen las bandas de tensión del C-O y flexión del OH, siendo las de mayor intensidad las de 1290, 1240 y 940 cm^{-1} esta última flexión del OH fuera del plano.

Finalmente, por debajo de 800 cm^{-1} , aparecen bandas de vibraciones de flexión del CH en compuestos insaturados.

5. - RESUMEN Y CONCLUSIONES

En el presente trabajo, se ha comenzado por revisar la bibliografía existente sobre Microbiología del Petróleo, - bibliografía que se hace particularmente abundante sobre todo en la década 1960-70. Se descubre en esta panorámica general, una progresiva atención creciente frente a problemas relativos a la obtención de productos químicos de muy variada índole, derivados de la oxidación microbiológica de los distintos tipos de hidrocarburos. Es en este campo donde las bacterias juegan un papel primordial, que no es compartido por otros microorganismos capaces de utilizar estos sustratos.

En cambio, para la producción de proteínas alimenticias, se utilizan más comúnmente las levaduras por ser más fáciles de separar de los residuos de hidrocarburos; para los cultivos bacterianos este problema es insalvable a escala de procesos industriales. Estos últimos microorganismos se emplean con éxito sólo cuando se trata de hidrocarburos gaseosos, metano sobre todo, con los que no existen las dificultades de separación.

En nuestra revisión, hemos atendido especialmente a las bacterias destacando los estudios de tipo sistemático, -- muy escasos por otra parte, y aquellos que se refieren a la especificidad frente al sustrato y a las vías metabólicas de oxidación, siendo estos últimos con mucho, los más abundantes.

La bibliografía es escasa en trabajos referentes a fracciones industriales de petróleo que, sin embargo, son las de mayor utilidad como materia prima de bajo coste. Hemos elegido el gas-oil por ser el producto más asequible a la oxidación microbiana debido al tamaño de sus moléculas y a la baja solubilidad en agua. De hecho esta es la fracción que con más asiduidad se utiliza en la práctica para la obtención de productos alimenticios que ya se emplea industrialmente.

Nuestro objetido ha sido estudiar, desde un punto de vista sistemático, la oxidación bacteriana del gas-oil, para lo cual hemos ido cumpliendo las siguientes etapas:

- a - Estudio de los medios selectivos de aislamiento de bacterias capaces de utilizar distintos hidrocarburos como única fuente de carbono.
- b - Selección y clasificación de las estirpes que presentaron mejor crecimiento sobre gas-oil. -- Asimismo se estudiaron diversos tipos de gas-oil de composición química y puntos de ebullición inicial y final muy diferentes.
- c - Determinación de las condiciones óptimas de cultivo, incluido el medio salino, fuente de nitrógeno, agitación y proporción de hidrocarburo.

- d - Estudio analítico por espectroscopia IR del gas-oil elegido, con asignación de las bandas fundamentales, y armónicos y combinaciones de interpretación más segura.
- e - Fraccionamiento del gas-oil por cromatografía de absorción en columna y estudio espectroscópico de las fracciones obtenidas por este procedimiento. Esto supuso estudiar un procedimiento cromatográfico que se adaptara a nuestras condiciones y necesidades de muestras.
- f - Cultivo de las estirpes seleccionadas, sobre las fracciones anteriores. Extracción del hidrocarburo residual y análisis por espectroscopia IR de las modificaciones aparecidas en el mismo.
- g - Separación de la fracción parafínica total en dos partes, una de parafinas lineales y otra de parafinas ramificadas y cíclicas.

Esta separación se realizó por el procedimiento de formación de aductos con urea.

- h - Cultivo de las bacterias sobre las dos fracciones anteriores y estudio espectroscópico del extracto de hidrocarburos residuales.
- i - Paralelamente se hizo un estudio de la acción bacteriana sobre dos productos puros, pentadecano y tetrametilpentadecano (pristano) para comparar los resultados con los de las mezclas de parafinas lineales y parafinas ramificadas.
- j - Diseño de unidades fermentadores que nos permitieran estudiar las características y condiciones de cultivo a mayores escalas. En estos fermentadores se cultivaron solamente las estirpes de mayor crecimiento, empleándose siete litros de medio salino y gas-oil completo como única fuente de carbono.
- k - Fraccionamiento del extracto de los cultivos anteriores por un procedimiento idéntico al que se utilizó con el gas-oil, para el que se acomodaron las dimensiones de la columna de cromatografía.
- l - Estudio por espectroscopia IR de las fracciones obtenidas en el experimento anterior, que nos permitió separar los productos de oxidación formados del total de hidrocarburos extraídos de los cultivos.
- m - Finalmente se hizo un cultivo sobre la fracción parafínica total del gas-oil empleándose el fermentador, y eligiéndose la estirpe de mayor rendimiento. Del extracto de este cultivo se separaron diversas fracciones por cromatografía de ad-

sorción en columna, con eluyentes de polaridad creciente, para separar compuestos oxidados diferentes. Estas fracciones fueron estudiadas -- por espectroscopía IR.

A la vista de los resultados obtenidos podemos sacar las siguientes conclusiones sobre la oxidación bacteriana de hidrocarburos, especialmente del gas-oil y sus fracciones:

- 1 - Las técnicas de aislamiento utilizadas permiten aislar una flora bacteriana abundante y variada, cuando se parte de tierras expuestas durante cierto tiempo a la presencia de hidrocarburos. La preparación de medios solidificados con agar nos sirvió para seguir el procedimiento de las diluciones sucesivas, manteniéndose las --- emulsiones perfectamente estabilizadas debido - probablemente a la propia presencia de agar. En estos medios las colonias aunque de pequeño tamaño, destacan perfectamente y son fáciles de - separar. La literatura, sin embargo, no cita -- ningún medio sólido, habiendo sido estudiados - por nosotros los que se utilizaron en este trabajo.

- 2 - De las estirpes aisladas se seleccionaron 40 -- por su buen crecimiento sobre gas-oil, entre -- las cuales están representados los géneros de - bacterias que han sido citados en diferentes -- trabajos por su capacidad de atacar hidrocarburos, con la excepción de Mycobacterium del que no se encontró ninguna estirpe en las muestras ensayadas. Sin embargo este género es reconocido por su capacidad de atacar las parafinas. -- Las pruebas morfológicas y fisiológicas realizadas con estas estirpes nos permitieron en algunos casos llegar a nivel de especie en su clasificación y en otros sólo a nivel de género. Se hicieron además de las clásicas, una serie de - pruebas encaminadas a conocer la capacidad de - estas bacterias para crecer en hidrocarburos de varios tipos, determinándose además en ellas -- los tiempos necesarios para la adaptación a estos sustratos, prolongándose los periodos de incubación hasta 22 días. En algunos casos los -- tiempos de adaptación fueron extraordinariamente largos.

- 3 - Los géneros estudiados en nuestro trabajo fueron los siguientes:

Bacterias grampositivas ó gram-variables

G. Corynebacterium	(3 especies)
G. Arthrobacter	(2 especies)
G. Brevibacterium	(3 especies)
G. Nocardia	(5 especies)
G. Streptomyces	(1 especie)
G. Micrococcus	(5 especies)

Bacterias gramnegativas

G. Pseudomonas	(19 especies)
G. Achromobacter	(1 especie)
G. Alcaligenes	(1 especie)

- 4 - El estudio de las condiciones óptimas de cultivos en medios líquidos, dió resultados no siempre homogéneos, hecho hasta cierto punto lógico dada la diversidad de estirpes bacterianas ensayadas. Sin embargo, se pudieron fijar ciertas condiciones -- que en la mayor parte de los casos dieron buenos resultados.

La fuente de nitrógeno mejor utilizada -- fue el ClNH_4 , hecho ya comprobado para algunas especies en la bibliografía. También dieron buen resultado $\text{PO}_4\text{H}_2\text{NH}_4$ y NO_3NH_4 , de las que la primera sal es muy utilizada en este tipo de medios de -- cultivo.

En cuanto a la concentración, no son claros los resultados, siendo la de 5 gr/litro la -- que se eligió porque dió crecimientos altos.

La cantidad de hidrocarburo, para las velocidades de agitación relativamente bajas empleadas, debe ser pequeña para obtener buenos rendimientos. Se eligió por ello la cantidad menor que permitía suficiente muestra para hacer el espectro IR.

Este resultado es también normal si se -- tiene en cuenta que el crecimiento depende sobre todo de la superficie de contacto entre el medio acuoso y el hidrocarburo.

- 5 - De los ocho tipos de gas-oil de distintas procedencias ensayados, se eligió el designado como -- "gas-oil ligero de vacío" que dió los valores más altos de crecimiento para la mayoría de las estirpes ensayadas. El espectro IR de este producto -- muestra un contenido más alto que los otros en parafinas, a excepción del gas-oil pesado de vacío, que muestra sin embargo un punto de congelación -- más alto, lo cual no favorece el crecimiento bacteriano por lo que hemos podido comprobar.

- 6 - El fraccionamiento cromatográfico puesto a punto en el presente trabajo, permite obtener una primera fracción parafínica exenta absolutamente de hidrocarburos aromáticos y de compuestos oxidados presentes en el gas-oil original. El espectro infrarrojo de esta fracción no deja lugar a dudas a este respecto. En cuanto a la fracción aromática, el simple estudio del espectro IR no permite asegurar su pureza, aunque tanto los datos obtenidos del análisis elemental cuantitativo, del índice de refracción y de la comparación del espectro IR con el de concentrados comerciales de por lo menos el 98% de contenido en aromáticos nos hace suponer que la separación ha sido correcta. En esta fracción no aparecen tampoco productos oxidados, según indica el espectro IR correspondiente.

El porcentaje de cada una de estas fracciones en el gas-oil completo fue de 82,4% de parafinas, 16,2% de aromáticos y 1,4% de fracción residual, porcentajes calculados en peso.

- 7 - La separación de las parafinas por formación de aductos con urea se hizo repitiendo hasta tres veces el proceso completo, lo que según autores es suficiente para obtener entre el 95 y el 97% de n-parafinas aisladas. Los espectros infrarrojos de las dos fracciones obtenidas, revelan la posible presencia de parafinas ramificadas en la fracción de lineales aunque en muy escasa proporción. Como era de esperar, el punto de congelación desciende considerablemente en las parafinas lineales, respecto de la mezcla primitiva -- siendo esta fracción sólida a temperatura ambiente.

Por otra parte, el estudio de los espectros IR de ambas fracciones, y de las anteriormente obtenidas, facilita la asignación de ciertas bandas, por su presencia o intensidad en una u otra de las fracciones.

El contenido en parafinas lineales, respecto del total de parafinas fue calculado en el 26,5% hallándose el 69,2% de ramificadas y perdiéndose el 4,3% restante en los sucesivos pasos intermedios, todas estas cantidades medidas en peso.

- 8 - El estudio por espectroscopía IR del gas-oil ligero de vacío y las fracciones obtenidas del mismo, nos permiten obtener la siguiente información general:

A). Se trata de un gas-oil de contenido parafínico alto (lo cual queda confirmado por los datos anteriormente citados) con cadenas lineales de elevado número de átomos de carbono a juzgar por la intensidad de la banda a 720

- B). Las cadenas ramificadas presentan abundantes grupos isopropilo y un esqueleto lineal con más de cuatro átomos de carbono, por lo que también estos espectros presentan absorción a 720 cm^{-1} . El hombro hacia 730 cm^{-1} indica que hay además cadenas más cortas en esta fracción, pero es de débil intensidad. También el espectro infrarrojo de esta fracción nos hace suponer la ausencia de cicloparafinas o, al menos, su escasez.
- C). En cuanto a la fracción aromática, el espectro IR implica la presencia de muchas sustituciones alifáticas en los anillos, hecho que se basa en la consideración de una serie de bandas que aparecen entre $2000-1600$ y $900-700\text{ cm}^{-1}$. La posición de estas sustituciones no puede quedar bien establecida en un espectro tan complejo, pero se discute brevemente en este trabajo.
- D). El espectro IR del gas-oil completo parece indicar la ausencia de heterociclos y así queda confirmado por los datos del análisis elemental del mismo.
- E). Del espectro IR de la fracción residual, se puede deducir que el esqueleto hidrocarbonado que soporta las funciones oxigenadas que aparecen en esta fracción, es en buena proporción de naturaleza parafínica, con cadenas de pequeño tamaño, insaturaciones no aromáticas (al menos no predominantemente) y con absorción fuerte de grupos $\text{C}=\text{O}$ muy probablemente de naturaleza carboxílica. Algunas bandas débiles en este espectro permiten además reconocer la presencia de alcoholes aunque en pequeña proporción.
- 9 - Los cultivos realizados con cada estirpe sobre las distintas fracciones nos proporcionan información sobre el tipo de moléculas preferentemente utilizadas así como sobre los compuestos oxidados que se acumulan en el medio de cultivo.

Se ha hecho además una valoración cuantitativa de la desaparición de cadenas parafínicas lineales, utilizando para ello la intensidad de la banda a 720 cm^{-1} y de la cantidad de compuestos oxidados acumulados, midiendo la absorbancia de las bandas en la región $1700-1800$.

Las consecuencias que se pueden extraer de estas experiencias son las siguientes:

- A). En cuanto a los compuestos alifáticos, salvo raras excepciones se consumen mejor en el metabolismo los de cadena lineal, sobre todo -- cuando se encuentran en estado líquido a la temperatura de cultivo. Por ello, las parafinas lineales separadas del resto de la fracción parafínica, no dan los valores de crecimiento que sería lógico esperar, por tener un punto de congelación demasiado elevado.
- B). Sin embargo, las parafinas ramificadas dan valores de crecimiento mayores de lo esperado, tal vez por el hecho de tener un esqueleto lineal de bastante longitud. En esta fracción se acumulan mayor cantidad de compuestos oxidados que en la anterior, a juzgar por las bandas intensas de vibraciones de tensión $C=O$. La explicación de este hecho es perfectamente lógica, pues las moléculas moléculas oxidadas de pequeño tamaño y con ramificaciones son muy difíciles de metabolizar, por lo que quedan como restos inasequibles para las bacterias. El estudio de los productos de oxidación formados por la estirpe G-43 a partir de parafinas confirma como veremos esta suposición. Las cadenas lineales, en cambio, no sólo se oxidan sino que son utilizadas por completo por mecanismos de beta-oxidación.
- C). Respecto al pentadecano y al tetrametilpentadecano, pensábamos obtener valores de crecimiento más altos que los conseguidos, especialmente con el primero. La elección de este producto se debió a que era líquido a temperatura ambiente, estando sin embargo comprendido en el margen de destilación del gas-oil. Posiblemente, el hecho de tener un número impar de átomos de carbono haya influido negativamente en el crecimiento bacteriano.

El pristano fue ensayado pensando en que, por ser un producto muy extendido en la naturaleza y especialmente en el suelo procedente de restos vegetales, sería degradado -- con facilidad. Aquí los resultados fueron más variados, pero se utilizaron indudablemente -- mejor los productos ramificados del gas-oil.

- D). En las pruebas con la fracción aromática también el crecimiento de las bacterias es muy notable y excedió a lo que se esperaba. Sin embargo este estudio requeriría otras técnicas para concretar los resultados, porque el espectro infrarrojo de esta fracción resulta excesivamente complicado e impide apreciar -- las bandas débiles que se hayan podido formar.

10 - Atendiendo a los distintos grupos sistemáticos se observa lo siguiente:

- A). Las estirpes grampositivas utilizan mayor las parafinas que las gramnegativas, ocurriendo lo contrario para la fracción aromática.
- B). Entre todos los géneros estudiados fue *Nocardia* el que dió los valores más altos de crecimiento y las bandas más intensas de oxidación en los cultivos sobre fracciones parafínicas, incluidos pentadecano y tetrametilpentadecano.
- C). Dentro de las estirpes del G. *Pseudomonas* varía mucho el comportamiento de las distintas especies siendo las de *P. aeruginosa* las que crecieron y oxidaron mejor los alcanos.
- D). El tipo de productos oxidados que se acumulan en el medio, por lo que se deduce del estudio de los espectros IR, depende más del sustrato que del microorganismo siendo similares a veces para especies y géneros diferentes.
- E). Sin embargo, el aspecto de la región $1700-1800\text{ cm}^{-1}$ es perfectamente reproducible y constante para una estirpe frente a un sustrato determinado y varía poco para las estirpes del mismo género siendo, en cambio, muy diferentes para las de distintos géneros, por lo cual tiene un gran valor sistemático. Ello implica que cuantitativamente los productos de oxidación formados varían para grupos sistemáticos distintos.

11 - El estudio cinético realizado para la estirpe P-34 de *Pseudomonas aeruginosa*, muestra una relación lineal entre el crecimiento de la misma y la disminución de intensidad de la banda a 720 cm^{-1} , es decir, la desaparición de cadenas parafínicas lineales. Lo mismo podemos decir para el aumento de intensidad de la banda carbonílica a 1710 cm^{-1} .

12 - Las unidades fermentadoras utilizadas en este trabajo, produjeron rendimientos altos y facilitaron consecuentemente el estudio de los espectros IR de los productos de oxidación formados.

Se eligieron para su cultivo las estirpes de mayor crecimiento entre el mayor número de géneros posibles.

Los resultados obtenidos tras estas experiencias sirvieron para asegurar la asignación de bandas que por ser muy débiles no estaban claras en los espectros anteriores. Basándonos pues en -

ellos estudiaremos las siguientes regiones del espectro:

- A). Región 3500-2500. Se encuentran dos bandas superpuestas, cuya diferenciación sin embargo nos parece posible por su aspecto general. -- Las vibraciones de tensión de enlaces O-H en alcoholes dan una banda ancha hacia 3400 cm^{-1} ; en cambio estas mismas vibraciones para ácidos carboxílicos muestran absorción en una zona que ocupa toda la región.
- B). Región 1800-1700. Aparecen las bandas debidas a vibraciones de tensión del C=O. Las situadas a números de onda más altos (1750 cm^{-1}) parecen indicar la presencia de ésteres. Sin embargo, más frecuentemente aparecen hacia 1735 y 1710 cm^{-1} . La primera de ellas la hemos supuesto de aldehidos por razones ya señaladas, aunque no se puede excluir la presencia de ésteres en pequeña proporción. La segunda responde al mismo tipo de vibraciones para carbonilos cetónicos ó de ácidos carboxílicos, y para diferenciarlas es preciso acudir a otras bandas ya discutidas. En los espectros presentados, esta banda es con mayor frecuencia, carboxílica.
- C). Región 1700-1600. Aparecen aquí las vibraciones de tensión de enlaces C=O que señalan la aparición de insaturaciones. Por la situación de estas bandas se puede decidir sobre si el doble enlace es conjugado ó no.
- D). Región 1300-800. Las bandas de vibraciones de tensión del C-O y flexión del O-H que se dan en esta zona nos permitieron en algunos casos decidir sobre la naturaleza del compuesto oxigenado principal.
- E). Finalmente la región 800-625, además de servirnos para estudiar la utilización de cadenas lineales (banda a 720 cm^{-1}) presenta a veces bandas útiles para el estudio de las insaturaciones formadas.

13 - El cultivo de la estirpe G-43 del género Nocardia sobre la fracción parafínica del gas-oil, utilizando el fermentador, fue útil para estudiar los productos de oxidación formados por esta bacteria. Como hemos indicado anteriormente, los productos más abundantes parecen ser ácidos carboxílicos de cadena ramificada, lo cual en el espectro IR queda muy claro por la presencia de un doblete a $1375-1365\text{ cm}^{-1}$. Esto confirmaría nuestra idea de que este tipo de moléculas no puede ser metabolizado posteriormente y, en consecuencia, se acumu-

la en el medio.

La otra fracción eluida con acetona, es más escasa, de mayor polaridad y presenta un esqueleto parafínico de mayor tamaño y sin restos isopropilo.

En esta experiencia el espectro de la fracción parafínica restante indica que fueron utilizadas más del 90% de las cadenas parafínicas lineales, en el crecimiento bacteriano.

- 14 - Finalmente, es interesante observar la semejanza que existe entre los espectros IR de los productos oxidados presentes en el gas-oil original y los que se extraen de los cultivos. Esto puede hacernos suponer que esa oxidación del gas-oil era probablemente del mismo origen.

6. Bibliografía

- ABBOTT (b.j.) CASIDA (L.E.). 1968. "Oxidation of alkanes to internal monoalkenes By a Nocardia". J. Bacteriol., U.S.A. 96,4,925.
- ALBRO (P.W.) Dittmer (J.C.). 1969. "The biochemistry of --- long-chain, monisoprenoid hydrocarbons. III) The metabolic relationship of long-chain fatty acids and hydrocarbons and other aspects of hydrocarbon metabolism in *Sarcina lutea*". Biochemistry U.S.A. 8, 5, 1913-8.
- ALEXANDER (m.) LUSTIGMAN (B.K.). 1966. "Effect of chemical structure on microbial degradation of substituted benzenes". J. Agric. Food. Chem., U.S.A. 14, 4, 410-3.
- ALI KHAN (M.Y.) HALL (A.N.) ROBINSON (D.S.). 1964. "Pro--- ducts of the oxidation of selected alkanes by a gram-negative bacterium". A. van Leeuwenhoek, Nederl. 30, 4, 417-27.
- ALLEN (J.E.) FORNEY (F.W.) MARKOVET (A.J.). 1970. "Micro--- bial subterminal oxidation of alkanes and alk-1-enes". J. Amer. Oil. Chem. 7, 47, 338.
- AMPHLETT (M.J.). 1966. "Petroleum microbiology". Rep. Progr. Appl. Chem. G.B. 51, 486-503.
- ARAI (Y.) YAMADA (K.). 1969. "Studies on the utilization of hydrocarbons by microorganisms: XII) Screening of alicyclic hydrocarbon-assimilating microorganisms and trans-4-ethylcy clohexanol formation from ethyl cyclohexane". Agric. Biol. Chem. Jap. 33, 1, 63-8.
- AZOULAY (E.) 1966. "Metabolisme microbien des hydrocarbures paraffiniques a chaine droite". These Doct. Sci. Phys. Aix-Marseille.
- BAPTIST (J.N.) GHOLSON (R.R.) CONN (M.J.). 1963. "Hydrocar bon oxidation by a bacterial enzyme system. L) Products of octane oxidation". Biochem. Biophys. Acta., Pays-Bas. 69, 1, 40-47.
- BALATTI (A.P.) MAZZA (L.A.) SEGOVIA (R.F.) ERTOLA (J.) 1970. "Estudios sobre producción de proteínas celulares a partir de hidrocarburos" Ion. Esp. 30, 342, 5-13.
- BEERSTECHEER (E.). 1954. "Petroleum microbiology" Elsevier, New-York.
- BELLAMY (L.J.) 1954. "The infrared spectrum of Complex Mole cules". Ed. John Wiley and Sons Inc. New-York.
- BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY Seventh edi-- tion, The Williams & Wilkins Company. Baltimore, 1957.
- BEVERIDGE (J.) MAIR (W.) MARCULAITIS (J.) ROSSINI (F.D.). - 1957. "Separation of the C₁₈ to C₂₅ fraction of Petroleum" Anal. Chem. 29, 1, 92-100.

- BLAKEBROUGH (N.) SHEPHERD (P.G.) NIMMONS (I.). 1967. "Equipment for hydrocarbon fermentations". Biotechnol. and Bioengng, U.S.A. 19, 1, 77-89.
- CATALDI (M.S.) GAY (M.C.). 1969. "Estudio fisiológico de algunas bacterias que utilizan hidrocarburos". An. Soc. Ci. - Argent. 187, 3-4; 58-66.
- CHAMPAGNAT (A.). 1963. "Considerations sur l'eventualité de la production des protéines par l'industrie du petrole". -- Bull. Acad. Nation. Med. Fr. 147, 9-10, 182-188.
- CHAMPAGNAT (A.) VERNET (C.) LAINE (B.) FILOSA (J.). 1967. - "Deparaffinage microbiologique avec production des concentrés proteines-vitamineés". (6th world. petrol. congress. - S.l.n.d. sec IV).
- CLAUS (D.) WALKER (N.). 1964. "The decomposition of toluene by soil bacteria". J. Gen. Microbiol. G.B. 36, 1, 107-22.
- DAGLEY (S.). 1971. "Catabolism of aromatic compounds by microorganisms". Adv. Microb. Physiol. Vol. 6. Academic Press, London, New-York.
- DAVIES (J.I.) EVANS (W.C.). 1964. "Oxidative metabolism of naphthalene by soil pseudomonads". Biochem. J., G.B. 91, 2, 251-61.
- DAVIS (J.B.). 1966. "Microbial intra- and extra-cellular products of hydrocarbon oxidation". Abh. Dtsch. Akad. Wissensch. Berlin, Kl. Chem. Biol. Geol. 2, 129-142.
- DAVIS (J.B.). 1967. "Petroleum microbiology". Elsevier, New-York.
- DE GRAY (R.J.) Killian (L.N.). 1962. "Life in essentially nonaqueous hydrocarbons". Proc. 18th. Gen. Meetg. Develop. Industr. Microbiol. III. Lafayette, Ind. 25, 296-303.
- D'MELLO (J.P.F.). 1972. "A study of the amino acids composition of methane-utilizing bacteria". J. appl. bact., U.S.A. 35, 1, 145-8.
- DUNLAP (K.R.) PERRY (J.J.). 1968. "Effect of substrate on the fatty acid composition of hydrocarbon-and ketone-utilizing microorganisms". J. Bacteriol. U.S.A. 96,2, 318-21.
- DUNN (I.J.). 1968. "An interfacial kinetics model for hydrocarbon oxidation". Biotechnol. and bioengng. U.S.A. 10, 6, 891-4.
- ERTOLA (R.J.). 1968. "Transformación de hidrocarburos por los microorganismos". Ion. Esp. 324, 28, 477-80.
- ERTOLA (R.J.) LILLY (M.D.) WEBB (F.C.) 1965. "Production of cell tissue from hydrocarbons by a microbiological process". Biotechnol. Bioengng. U.S.A. 7,2,309-19.
- ERTOLA (R.J.) MAZZA (L.A.) BALATTI (P.A.) SEGOVIA (R.F.). --

1969. "Gas-oil utilization by a Micrococcus strain". J. Ferment. Technol., Jap. 47, 9, 536-41.
- ERTOLA (R.J.) MAZZA (L.A.) BALATTI (A.P.) SANAHUJA (J.). --- 1969. "Composition of cell material and biological value of the cellular protein of a micrococcus strain grown on hydrocarbons". Biotechnol. and Bioengng. U.S.A. 11, 3, 409-16.
 - EVANS (W.C.) FERNLEY (H.N.) GRIFFITHS (E.). 1965. "Oxidative metabolism of phenanthrene and anthracene by soil pseudomonads. The ring-fission mechanism". Biochem. J. G. B. 95, 3, 819-31.
 - FERNLEY (H.N.) GRIFFITHS (E.) EVANS (W.C.). 1964. "Oxidative metabolism of phenanthrene and anthracene by soil bacteria: The inicial ring-fission step". Biochem. J., G. B. 91, 2, 15-16.
 - FINNERTY (W.R.) DEN (H.) JENSEN (D.) VOSS (E.). 1966. "Mechanisms of hydrocarbon oxidation by microorganisms". Abh. Dtsch. Akad. Wissensch. Berlin., Kl. Chem. Geol. Biol. 2, 143-50.
 - FORNEY (F.W.) MARKOVET (A.J.). 1970. "Subterminal oxidation of aliphatic hydrocarbons". J. Bacteriol., U.S.A. 1, 102, 281.
 - FOSTER (J.W.). 1962. "Hydrocarbons as substrates for microorganisms". Antonie van Leeuwenhoek, Ned. 28, 3, 241-274.
 - FREDRICKS (K.M.). 1966. "Adaptation of bacteria from one type of hydrocarbon to another". Nature G.B. 209, 1047.
 - FREDRICKS (K.M.). 1966. "Experiments in bacterial adaptation". Nature G.B. 212, 5061, 539-40.
 - FREDRICKS (K.M.). 1967. "Products of the oxidation of n'decane by Pseudomonas aeruginosa and Mycobacterium rhodochrous". Antonie van Leeuwenhoek Ned. 33, 1, 41-8.
 - GIBSON (D.T.). 1968. "Microbial degradation of aromatic compounds". Science. 3846, 161, 1093.
 - GIBSON (D.T.) WOOD (J.M.) CHAPMAN (P.J.) DAGLEY (S.). 1967. "Bacterial degradation of aromatic compounds". Biotechnol -- and bioengng. U.S.A. 9, 1, 33.
 - GLOBAL IMPACTS OF APPLIED MICROBIOLOGY. II. Varios autores. Editor: Elmer L. Ganden, Jr. 1969.
 - HOLDOM (R.S.) TURNER (A.G.) 1969. "Growth of Mycobacterium rhodochrous on n-decane: a new growth factor and emulsifying agent". J. Appl. Bacteriol. G.B. 32, 4, 448-56.
 - HUMPHREY (A.E.) 1967. "A critical review of hydrocarbon fermentations and their industrial utilizations". Biotechnol. -- and Bioengng. U.S.A. 9, 1, 3-24.
 - IIZUKA (H.) KOMAGATA (K.). 1964. "Microbiological studies on petroleum and natural gas. I) Determination of hydrocarbon-utilizing bacteria". J. Gen. Appl. Microbiol. Jap. 10, 2-207-21.

- IIZUKA (H.) KOMAGATA (K.). 1964. "Microbiological studies on petroleum and natural gas. II) Determination of pseudomonads isolated from oil-brines and related materials. J. Gen. Appl. Microbiol. Jap. 10,3,223-31.
- IIZUKA (H.) KOMAGATA (K.). 1965. "Microbiological studies on petroleum and natural gas. III) Determination of Brevibacterium, Arthrobacter, Micrococcus, Sarcina, Alcaligenes, and Achromobacter isolated from oil-brines in Japan". J. Gen. -- Agric. Microbiol., Jap. 11,1,1.
- IIZUKA (H.) NISHIMURA (Y.). 1969. "Microbiological studies on petroleum and natural gas. X) Carotenoids pigments of hydrocarbon-utilizing bacteria". J. Gen. Appl. Microbiol. Jap. 15,2,127,34.
- IMADA (Y.) PANTSKHA (E.C.) YAMADA (K.). 1967. "Utilization of hydrocarbons by microorganisms. IX) Influence of several factors on L-glutamate production from hydrocarbons". Agric. Biol. Chem., Jap. 31,2,245.
- IMADA (Y.) TAKAHASHI (J.) YAMADA (K.) UCHIDA (K.). 1967. --- "Production of l-glutamic acid from hydrocarbons: Incorporation of molecular oxygen". Biotechnol. and Bioengng. U.S.A. 9,1,45-54.
- IMADA (Y.) YAMADA (K.). 1969. "Utilization of hydrocarbons by microorganisms. XIV) Formation of a-Ketoglutarate, L-glutamate and DL-alanine by Corynebacterium hydrocarboclastus S10B1". Agric. Biol. Chem. Jap. 33,9,1326-32.
- IMADA (Y.) YAMADA (K.). 1971. "Utilization of hydrocarbons by microorganisms. XXI) Biochemical studies upon microbial production of alpha-ketoglutarate, L-glutamate and DL-alanine from hydrocarbons". Agric. Biol. Chem., Jap. 1,35,18.
- JENKINS (P.G.) RABOIN (D.) MORAN (F.). 1972. "Mutants of Mycobacterium rhodochrous with modified patterns of n-paraffin utilization". J. Gen. Microbiology. G.B. 72,2,395-98.
- JOHNSON (M.J.). 1967. "Growth of microbial cells on hydrocarbons. Microbial protein feeds from hydrocarbons could be --- abundant if technological problems were solved". Science --- U.S.A., 155,3769,1515-9.
- JONES (J.G.). 1968. "Metabolism of hydrocarbons by soil microorganisms". J. Gen. Microbiol., G.B. 53,1,9.
- JONES (J.G.). 1969. "The determination of microbial hydrocarbon metabolism in natural environments". Arch. Mikrobiol., - Dtsch. 67,4,397-407.
- JONES (J.G.) EDINGTON (M.A.). 1968. "An ecological survey of hydrocarbon-oxidizing microorganisms". J. Gen. Microbiol., - G.B. 52,3,381-90.
- KARBAN (V.I.) KUCHER (R.V.) MIRONENKO (N.I.) (en ruso). 1969. "Quimismo y particularidades fisicoquímicas de los procesos microbiológicos de oxidación de hidrocarburos del petróleo". Usp. Kim. S.S.S.R. 38,3,539-59.

- KESTER (A.S.) FOSTER (J.W.). 1963. "Diterminal oxidation of long-chain alkanes by bacteria". J. Bacteriol. U.S.A. 85,4, 859-69.
- KHAN (M.Y.A.) HALL (A.N.) ROBINSON (D.S.). 1964. "Products of oxidation of selected alkanes by a gram-negative bacterium". A. van Leeuwenhoek., Ned. 30,4,417.
- KLEIN (D.A.). 1968. "Growth of an aquatic-derived bacterium in presence of long-chained alkanes". Appl. Microbiol. U.S.A. 16,2,421.
- KLEIN (D.A.) DAVIS (J.A.) CASIDA (L.E.Jr). "Oxidation of n-alkanes to ketones by an Arthrobacter species". A. van Leeuwenhoek, Ned. 1968. 34,4,495-503.
- KLUG (M.J. MARKOVETZ (A.J.). 1971. "Utilization of aliphatic hydrocarbons by microorganisms". Avd. Microb. Physiol. Vol. 6. Academic Press. London, New-York.
- KODAMA (K.) NAKATANI (S.) UMEHARA (K.) SHIMIZU (K.) MINODA (Y.) YAMADA (K.). 1970. "Microbial conversion of petro-sulfur compounds. III) Isolation and identification of products from dibenzothiophene". Agric. Bioo. Chem. Jap. 34,9,1320.
- KOLATTUKUDY (P.E.) HANKIN (L.). 1968. "Production of w-halo esters from alkyl halides by Micrococcus cerificans". J. -- Gen. Microbiol., G.B. 54,1,145-53.
- KRUCHKOV (A.P.) RODIONOV (G.S.) MIKHAYLOV (V.V.) DINANSKA - (E.M.). 1969. "Microbiological and physiological principles in biosynthesis of protein and fatty substances from petroleum hydrocarbons". Biotechnol. Bioengng., U.S.A. 11,1,99.
- KREJN (S.E.) BESSMERTNYJ (K.I.) NETTE (I.T.) GRESHUSHKINA (N.N.). 1969. (en ruso). "Efecto de los microorganismos sobre las propiedades de los carburantes". Prikl. Biokhin. Mi krob. S.S.S.R. 2,233-6.
- LEE (E.G.H.) WALDEN (C.C.). 1969. "Biosynthesis of piocyane by a paraffin hydrocarbon-oxidizing strain of Pseudomonas aeruginosa". Appl. Microbiol., U.S.A. 17,4,520-3.
- LINDAY (E.M.) DONALD (M.B.) 1961. "Small-scale studies of - microbiological oxidation of hydrocarbons to long-chain fatty acids". J. Biochem. Microbiol. Technol. Engng., U.S.A. 3,3,219-233.
- MAKULA (R.) FINNERTY (W.R.) 1968. "Microbial assimilation - of hidrocarbons. I) Fatty acids derived from normal alka--- nes". J. Bacteriol., U.S.A. 95,6,2102-7.
- MAKULA (R.) FINNERTY (W.R.). 1968. "Microbial assimilation of hydrocarbons. II) Fatty acids derived from 1-alkenes". - J. Bacteriol. U.S.A. 95,6,2108-11.
- MALESSET-BRAS (M.) AZOULAY (E.) 1965. "Degradation bacté--- rienne du maphtaléne". Ann. Inst. Pasteur, Paris. 109,6, 894-906.

- MARKOVETZ (A.J.) KLUG (M.J.) FORNEY (F.W.). 1967. "Oxidation of 1-tetradecene by *Pseudomonas aeruginosa*". J. Bacteriol., U.S.A. 93,4,1289-93.
- MCKENNA (E.J.). 1968. "Microbial oxidation of isoalkanes". - Amer. Chem. Soc., Div. Petroleum Chem., 13,4,23.
- MCKENNA (E.J.) COON (M.J.). 1970. "Purification and properties of Hydroxylase component of an n-alkane omega-oxidation system from *Pseudomonas oleovorans*". J. Amer. Oil. Chem. 7, 47, 345.
- MCKENNA (E.J.) COON (M.J.). 1970. "Enzymatic omega-oxidation. IV) Purification and properties of omega-hydroxylase of *Pseudomonas oleovorans*". J. Biol. Chem., U.S.A. 245,3882-97.
- MCKENNA (E.J.) KALLIO (R.E.). 1965. "The biology of hydrocarbons". Ann. Rev. Microbiol., U.S.A. 19,183-208.
- MCKENNA (E.J.) KALLIO (R.E.). 1971. "Microbial metabolism of isoprenoid alkane pristane". P. Nas., U.S.A. 7,68,1552.
- MEDEM (V.M.) BARMENKOV (J.P.) NAZAROV (I.I.) SHEVCOV (D.A.) NEMKOVA (N.S.). 1965. (en ruso). "Proceso bioquímico de oxidación de fracciones de petróleo". Khim. Tekhnol. Topl. Ma-sel., S.S.S.R. 10,4,31-35.
- MORCILLO (J.) MADROÑERO (R.). 1962. "Aplicaciones prácticas de la espectroscopía infrarroja". Fac. Ci. Univ. Madrid.
- MUELLER (J.C.) 1969. "Preferential utilization of the methane component of natural gas by a mixed culture of bacteria". Canad. J. Microbiol. 15,9,1114-6.
- NAKATANI (N.) AKASAKI (T.) KODAMA (K.) MINODA (Y.) YAMADA (K.). 1968. "Microbial conversion of petro-sulfur compounds. II) Culture conditions of dibenzothiophene-utilizing bacteria". Agric. Biol. Chem., Jap. 32,10,1205-11.
- NORRIS (K.P.) 1959. "Infra-red spectroscopy and its applications to microbiology". J. Hyg., Camb. 57,326.
- NOZAKA (J.) KUSUNOSE (M.) 1968. "Metabolism of hydrocarbons by microorganisms. I) Oxidation of p-xylene and toluene by cell free enzyme preparations of *Pseudomonas aeruginosa*". - Agric. Biol. Chem., Jap. 32,8,1033-9.
- NOZAKA (J.) KUSUNOSE (M.). 1969. "Metabolism of hydrocarbons by microorganisms. II) Degradation of toluene by cell-free extracts of *Pseudomonas mildembergii*". Agric. Biol. Chem., Jap. 33,6,962-4.
- NYNS (E.J.) WIAUX (A.L.). 1969. "Biologie des hydrocarbures". Agric., Belg. 17,2,3-56.
- OMORI (T.) HORIGUCHI (S.) YAMADA (K.). 1967. "Studies on utilization of hydrocarbons by microorganisms. X) Screening of aromatic hydrocarbon assimilating microorganisms and p-toluic acid formation". Agric. Biol. Chem., Jap. 31,33,1337.

- OMORI (T.) YAMADA (K.). 1969. "Studies on the utilization of hydrocarbons by microorganisms. XIII) Oxidation of m-xylene and pseudocumene by *Pseudomonas aeruginosa*". Agric. Biol. -- Chem., Jap. 33,7,979-85.
- OYAMA (J.) FOSTER (J.W.). 1965. "Bacterial oxidation of cycloparaffinic hydrocarbons". A. van Leeuwenhoek., Ned. 31,1, 45-65.
- PERRY (J.J.). 1968. "Substrate specificity in hydrocarbon utilizing microorganisms" A. van Leeuwenhoek., Ned. 34,1,27.
- PERRY (J.J.) SCHELD (H.W.). 1968. "Oxidation of Hydrocarbons by microorganisms isolated from soil". Canad. J. Microbiol. 14,4,403.
- PHILLIPS (U.A.) TRAXLER (R.W.). 1963. "Microbial degradation of asphalt". Appl. Microbiol. U.S.A. 11,3,235-38.
- RAO (C.N.R.). 1963. "Chemical applications of infrared spectroscopy". Ed. Academic Press. New-York.
- RAYMOND (R.L.). 1961. "Microbial oxidation of n-paraffinic hydrocarbons". Proc. 17th. Gen. Meetg. Develop. Industr. Microbiol. II) Stillwater, Okla. N. York. Plenum Press. 17, 23-32.
- RAYMOND (R.L.) JAMISON (V.W.) HUDSON (J.O.). 1970. "Hydrocarbon co-oxidation in microbial systems". J. Amer. Oil. Chem. 7,47,346.
- REISFELD (A.) ROSEMBERG (E.) GUTNICK (D.). 1972. "Microbial degradation of crude oil: factors affecting the dispersion in sea water by mixed and pure cultures". Appl. Microbiology., U.S.A. 24,3,363-68.
- RIDDLE (J.W.) KABLER (P.W.) KENNER (B.A.) BORDNER (R.H.) --- ROCKWOOD (S.W.) STEVENSON (H.J.R.). 1956. "Bacterial identification by infrared spectrophotometry". J. Bacteriol. 72, 593.
- ROBINSON (D.S.). 1964. "Oxidation of selected alkanes and related compounds by a *Pseudomonas* strain". A. van Leeuwenhoek, Ned. 30,3,303-16.
- ROMERO (E.M.) BRENNER (R.R.). 1966. "Fatty acids synthesized from hexadecane by *Pseudomonas aeruginosa*". J. Bacteriol., - U.S.A. 91,1,183-8.
- SCHLIPKÖTER (H.W.) GRÜNSPAN (M.). 1969. "Infrarotspektrometrische untersuchungen über den Mikrobiellen Abbau von Paraffin am Beispiel des Heptadecan". Arch. Hyg.
- SEIDMAN (M.M.) TOMS (A.) WOOD (J.M.). 1969. "Influence of side-chain substituents on position of cleavage of benzene ring by *Pseudomonas fluorescens*". J. Bacteriol. U.S.A. 97,3,1192.
- SENEZ (J.C.). 1969. "Acquisitions et perspectives économiques de la microbiologie du pétrole". Bull. Ins. Pasteur., Fr. 67, 8, 1771-88.

- SHAH (F.H.) SEDI (M.H.) SHEIKH (T.H.). 1967. "Synthesis of amino acids from hydrocarbons. I) Isolation of amino acid producing microorganisms from soil". Agric. Biol. Chem., Jap. 31,6,645-50.
- SHAKS (I.A.). 1964. "Comparative study, based on infra-red absorption spectra of changes in petroleum of various types and age during bacterial oxidation under aerobic and anaerobic conditions" (en ruso). Trudy. Vses. Neft. Nauchno. Issled. geol. Razv. Inst. 227,71-79.
- SHIIO (I.) OTSUKA (S.I.) ISHII (R.) KATSUYA (N.) IISUKA (H.). 1963. "Microbial production of amino acids from hydrocarbons. I) Preliminary screening of glutamic acid producing bacteria". J. Gen. Appl. Microbiol., Jap. 9,1,23-30.
- SHIIO (I.) UCHIO (R.). 1969. "Microbial production of amino acids from hydrocarbons. IV) L-glutamic acid production by Corynebacterium hydrocarboplastus R-7". J. Gen. Appl. Microbiol., Jap. 15,1,65-84.
- SILVERMAN (M.P.) GORDON (J.N.) WENDER (I.). 1966. "Food from coal-derived materials by microbial synthesis". Nature, G.B. 211,5050,735-6.
- SIMON (W.) CLERC (T.). 1970. "Elucidación estructural de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos". Ed. Alhambra.
- SKERMAN (V.B.D.). 1967. "A guide to the identification of the genera of bacteria". The Williams & Wilkins Company. 2^a Edic. Baltimore.
- SOLARI (A.A.) HERRERO (M.) CREMASCHI (M.S.D.). 1958. "Sobre algunas propiedades bioquímicas de Pseudomonas aeruginosa. I) Acción sobre los hidrocarburos". Rev. Fac. Ci. Quim. Argent. 31,45-8.
- STEVENSON (I.L.). 1967. "Utilization of aromatic hydrocarbons by Arthrobacter sp.". Canada J. Microbiol. 13,2,205-11.
- SÜSS (A.) NETZSCH-LEHNER (A.). 1969. "Beeinflussung der Abbauintensität von Dieselölkompnenten durch verschiedene Mikroorganismen". Z. Pflanzenernähr. Bodenkde, Dtsch. 123,3,232-9.
- SUZUKI (T.) TANAKA (K.) KINOSHITA (S.). 1969. "The extracellular accumulation of trehalose and glucose by bacteria grown on n-alkanes". Agric. Biol. Chem., Jap. 33,2,190-05.
- SZYMANSKI (H.A.). 1964. "Interpreted infrared spectra". Plenum Press., New-York.
- TAKAHASHI (J.) IMADA (Y.) YAMADA (K.). 1963. "Lipase formation by microorganisms from hydrocarbons". Agric. Biol. Chem. Jap. 27,5,396.
- TAKAHASHI (J.) KOBAYASHI (K.) KAWABATA (Y.) YAMADA (K.). 1963. "Studies on the utilization of hydrocarbons by microorganisms. II) Production of bacterial cell from hydrocarbons". Agric. Biol. Chem., Jap. 27,12,836-842.

- TAKEDA (I.) IGUCHI (T.) KAWAMURA (T.) HORIGUCHI (S.) HAYAKAWA (S.) SENOH (S.). 1965. "Protuction of microbial cells --- from hydrocarbons". Agric. Biol. Chem., Jap. 29,9,796-803.
- TAKEDA (I.) TSUCHIMOTO (N.) MIWA (S.). 1968. "Production of coenzyme Q by hydrocarbon-assimilating bacteria". Appl. Microbiol., U.S.A. 16,11,1806.
- THIJSSSE (G.J.E. VAN der LINDEN (A.C.)). 1963. "Pathways of hydrocarbon dissimilation by a Pseudomonas as revealed by chloramphenicol". A. van Leeuwenhoek., Ned. 29,1,89-100.
- TRAXLER (R.W.). 1966. "Microbial deterioration of asphalts". S.C.I. Monogr., G.B. 23,244-52.
- TRAXLER (R.W.). 1970. "Role of microorganisms in bitumen degradation". J. Amer. Oil. Chem. 47,7,338.
- TRAXLER (R.W.) BERNARD (J.M.). 1969. "The utilization of n-alkanes by Pseudomonas aeruginosa under conditions of anaerobiosis. I). Preliminary observation". Internation. Biodeterior. Bull., G.B. 5,1,21-25.
- TRAXLER (R.W.) BERNARD (J.M.). 1969. "Effect of alkylbenzenes on n-alkane utilization". Biotechnol. and Bioengng., U.S.A. 11,3,441-8.
- TRAXLER (R.W.) PROTEAU (P.R.) TRAXLER (R.N.). 1965. "Action of microorganisms on bituminous materials. I) Effect of bacteria on asphalt viscosity". Appl. Microbiol. U.S.A. 13,6, 838-41.
- TRAXLER (R.W.) ROBINSON (J.A.) WETMORE (D.E.) TRAXLER (R.N.). 1966. "Action of microorganisms on bituminous materials. II) Composition of low molecular weight asphaltic fractions determined by microbial action and infra-red analyses". J. -- appl. Chem., G.B. 16,9,266-71.
- TRECCANI (V.). 1965. "La degradazione microbica degli idrocarburi e dei detergenti di sintesi". Ann. Inst. Sup. Sani-tá., Ital. 1,11-12,805-819.
- VALERO (L.) HIDALGO (A.) "Estudio de la naturaleza química de los betunes asfálticos". Tes. Doct. Lab. Transp. Mec. del Suelo. 23, Madrid 1967.
- VAN der LINDEN (A.C.). 1963. "Epoxidation of alfa-olefins by heptane grown Pseudomonas cells". Biochim. Biophys. Acta., - Pays-Bas. 77,1,157-9.
- VAN der LINDEN (A.C.) THIJSSSE (G.J.E.). 1965. "The mechanisms of microbial oxidations of petroleum hydrocarbons". Adv. Enzymol., U.S.A. 27,469-546.
- VAN EIK (J.) BARTELS (T.J.). 1968. "Paraffin oxidation in Pseudomonas aeruginosa. I) Induction of paraffin oxidation". J. Bacteriol., U.S.A. 96,3,706-12.
- VARY (P.S.) JOHNSON (M.J.).1967. "Cell yields of bacteria -- grown on methane". Appl. microbiol., U.S.A. 15,6,1473.

- VERNET (C.). 1965. "Biosynthèse des protéines á partir du pe
trole". Industr. Chim. Belg. 30,3,213-26.
- VERNET (C.) EVANS (C.H.) LAINE (B.). 1966. "Developpements -
recent dans la fermentation de fractions petrolieres". In---
dustr. Chim., Belg., 31,9,179.
- VESTAL (J.R.) PERRY (J.J.). 1969. "Divergent metabolic path-
ways for propane and propionate utilization by a soil isola-
te". J. Bacteriol., U.S.A. 99,1,216-21.
- WAGNER (F.) KLEEMANN (T.) ZAHN (W.). 1969. "Microbial trans-
formations of hydrocarbons. II) Growth constants and cell --
composition of microbial cells derived from n-alkanes". Bio-
technol. and Bioengng., U.S.A. 11,3,393-408.
- WALTERS (A.H.). 1971. "Microbiological and allied aspects of
biodeterioration". Progr. in ind.microbiology. Vol. 10.
- WHITTENBURY (R.). 1969. "Microbial utilization of methane".
Process. Biochem., G.B. 4,1,51-6.
- WODZINSKI (R.S.) JOHNSON (M.J.). 1968. "Yields of bacterial
cells from hydrocarbons". Appl. Microbiol., U.S.A. 16,12,
1886-91.
- WOLFE (R.S.). 1971. "Microbial formation of methane". Adv. -
Microb. Physiol. Vol. 6. Academic. Press. London, New-York.
- YAMADA (K.) MINODA (Y.) KODAMA (K.) NAKATANI (S.) AKASAKI --
(T.). 1968. "Microbial conversion of petro-sulfur compounds.
I) Isolation and identification of dibenzothiophene-utilizing
bacteria. Agric. Biol. Chem., Jap. 32,7,840.
- YAMADA (K.) TAKAHASHI (J.) KOBAYASHI (K.). 1962. "The utiliza-
tion of hydrocarbons by microorganisms". Agric. Biol. Chem.,
Jap. 26,9,636.
- YAMADA (K.) TAKAHASHI (J.) KOBAYASHI (K.). 1963. "Utiliza---
tion of hydrocarbons by microorganisms". Nature., G.B. 198,
4885, 1115.
- YAMADA (K.) TAKAHASHI (J.) KOBAYASHI (K.). 1963. "Studies on
the utilization of hidrocarbons by microorganisms. II) Taxo-
nomical studies on the amin acids-producing bacteria from hy
drocarbons". Agric. Biol. Chem., Jap. 27,11,773-83.