



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

IZTACALA

**ANÁLISIS POR CROMATOGRFIA GAS-LÍQUIDO
DE LOS ÁCIDOS GRASOS CELULARES TOTALES DE
Enterobacter agglomerans.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

ISAURA YAÑEZ NOGUEZ

1992.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA

ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA GAS-LÍQUIDO DE LOS
ÁCIDOS GRASOS CELULARES TOTALES DE
Enterobacter agglomerans.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G O

PRESENTA:

ISAURA YAÑEZ NOGUEZ

**ANALISIS POR CROMATOGRAFIA GAS-LIQUIDO DE LOS
ACIDOS GRASOS CELULARES TOTALES DE**

Enterobacter agglomerans.

Con gran amor a mi esposo:

Martín; por tu amor, comprensión y confianza; por tus palabras de aliento siempre oportunas cuando estuve a punto de desistir; por tu apoyo entusiasta y entrega incondicional en todo momento, ayudándome a vencer las adversidades que parecían interminables, por tus desvelos para lograr sobrepasar todos y cada uno de los obstáculos durante la etapa que hoy llega a su fin; gracias por ese amigo que siempre encuentro en tí.

Juntos enfrentaremos la próxima etapa que en un futuro no muy lejano llegará también a su meta como la que hoy se cumple.

Gracias ...

A mis padres, con el más venerable amor y respeto:

Francisco y Amalia, por la oportunidad de darme la vida, su ternura, comprensión y ejemplo que permitieron mi formación personal y profesional, pero principalmente por el amor que recibo día con día.

A mis hermanos:

por cada uno de los momentos que hemos compartido;
por el amigo que encuentro en cada uno de ustedes,
brindándome la oportunidad de convivir a su lado.

A todas y cada una de las personas que integran mi núcleo familiar.

A la memoria de esa persona que dedicó la mayor parte de su vida a nuestro cuidado; y que dentro de sus limitados conocimientos, me apoyó en base a sus posibilidades durante mi formación profesional:

Mi abuelita.

A mis compañeras y amigas: Lulú, Adriana, Martha y en especial a la Dra. Josefina Torres Gómez, que en la etapa de mi formación profesional e individual supieron comprenderme y alentarme para seguir adelante.

A los integrantes de la familia Vargas Zamora por su apoyo entusiasta para conmigo.

Agradecimientos.

Al M. en C. Pedro Ramírez García, por la dirección de la presente tesis y por el apoyo brindado a lo largo de mi estancia en el proyecto;

A la Q.F.B. Esperanza Robles Valderrama, por la asesoría en el desarrollo del trabajo en general, así como en aspectos de cromatografía de gases;

Al Dr. Víctor Rivera Aguilar, por su apoyo y valiosas observaciones y sugerencias en el desarrollo general del trabajo;

Al Biól. Angel Durán, por su valiosa colaboración y asesoría en la parte estadística y sugerencias en aspectos generales;

Al I.Q. Gilberto González Villanueva, por sus sugerencias;

Al Programador Martín Vargas Zamora, por su valiosa colaboración y asesoría en la elaboración de la presente tesis, así como sus valiosas observaciones en aspectos de redacción y sugerencias para una mejor presentación del trabajo;

A la Biól. Blanca Martínez y a las P. de Biol. Emelia Campoy, Guadalupe Sáinz y Diana Zayas, por su gran amistad, compañerismo y sugerencias que me fueron de gran utilidad;

Al H. jurado por su participación y

A todos aquellos que de alguna manera contribuyeron en la realización de esta tesis.

INDICE

RESUMEN.	1
ANTECEDENTES.	3
INTRODUCCION.	5
FUNDAMENTOS TEORICOS.	8
Cromatografía de gases.	8
Lípidos en bacterias.	10
Ácidos grasos constituyentes de la célula bacteriana.	11
Esterificación de ácidos grasos.	12
Características generales de <u>Enterobacter agglomerans</u>	15
JUSTIFICACION.	17
OBJETIVOS.	18
MÉTODOS.	19
Preparación del cultivo puro.	19
Preparación de la biomasa.	19
Cosecha de la bacteria.	19
Liofilización del paquete celular.	20
Esterificación.	20
Obtención del cromatograma.	21
Análisis estadístico.	21
normalización.	22
medidas estadísticas descriptivas.	22
RESULTADOS.	26
DISCUSION.	36
CONCLUSIONES.	42
BIBLIOGRAFIA.	43

RESUMEN

La clasificación e identificación de las bacterias progresan con el enfoque numérico de la taxonomía, que hizo posible clasificar a los organismos con base en un gran número de características.

En la actualidad la taxonomía de bacterias se basa en atributos funcionales; en la práctica se ha demostrado que los métodos en la identificación bacteriana proveen una amplia información que en ocasiones por razones de tiempo no es utilizada totalmente, además de implicar mayor trabajo en el laboratorio.

La quimiotaxonomía con el uso del análisis de los lípidos en bacterias propone una alternativa: menos tiempo, métodos más sencillos y mayor exactitud con la utilización de nuevas técnicas, como la propuesta por el Dr. Häusler del Instituto de Investigación del Agua en Praga, Checoslovaquia.

Esta técnica consiste en identificar enterobacterias por cromatografía gas-líquido mediante los constituyentes de las células bacterianas, específicamente el contenido de ácidos grasos, para lo cual es necesario formar un banco de datos, donde se obtengan los perfiles cromatográficos de las principales especies de esta familia, para que después se puedan identificar muestras comparando los perfiles.

De esta forma, el objetivo del presente trabajo es obtener el perfil de la composición de ácidos grasos por cromatografía gas-líquido de Enterobacter agglomerans, que se utilizará como carácter taxonómico y que contribuye a formar parte de dicho banco de datos.

La metodología utilizada consiste en: obtención de la biomasa a partir de una cepa pura proveniente de la American Type Culture Collection (ATCC 27155); centrifugación, liofilización, esterificación, análisis cromatográfico y análisis estadístico. E. agglomerans presentó la siguiente constitución de ácidos grasos distribuidos por orden de elución, la cual va en orden creciente tanto de su peso molecular como del número de átomos de carbono; dodecanoico, tetradecanoico, pentadecanoico, 3-hidroxitetradecanoico, Cis-9-hexadecenoico, hexadecanoico, Cis-9,10-metilenhexadecenoico, heptadecanoico, Trans-Cis-9,11-octadecenoico, octadecanoico y Cis-9,10-metilenoctadecenoico.

Esta técnica nos ofrece una gran resolución o capacidad de separación de los componentes, los cuales no podrían ser separados por otras técnicas, por lo que dichos ácidos forman el perfil cromatográfico de E. agglomerans.

ANTECEDENTES

La bacteriología se ha desarrollado como una disciplina científica, que sirve principalmente a propósitos epidemiológicos y médicos, sin embargo en los últimos años se ha puesto especial atención a los aspectos ecológico-ambientales, y esto ha hecho necesario agilizar los procesos de identificación de microorganismos que de alguna manera afectan al hombre y su ambiente. Los procesos de identificación, tradicionalmente se han apoyado en las respuestas bioquímicas de cada microorganismo, que presenta un sólo tipo de respuesta, positiva o negativa. (Häusler, 1989 (32))

Entre los primeros trabajos con aplicación microbiológica, en los que se utilizó la cromatografía de gases, está el reportado por James y Martin 1956 (35), quienes trabajaron en la separación e identificación de ésteres metílicos de ácidos saturados e insaturados por cromatografía gas-líquido para determinar ácidos grasos bacterianos, al esterificar un extracto de Pseudomonas aeruginosa. En noviembre del mismo año elaboraron un aparato muy sensible para la detección de vapores de sustancias a separar, utilizando cromatografía gas-líquido (34).

Abel (1) y colaboradores en 1963 sugirieron la clasificación de especies de la familia *Enterobacteriaceae* por medio del análisis de cromatografía gas-líquido. En 1962 Kaneda (38) efectuó el aislamiento e identificación de los ácidos grasos provenientes de Bacillus subtilis y en 1967 (39) analizó la producción de ácidos grasos en especies del género Bacillus por cromatografía gas-líquido. Para 1968 (13) Cecchini y O'brien contribuyeron en la diferenciación de Escherichia coli con otras bacterias utilizando cromatografía de gases. Brooks et al en 1969 (8) diferenciaron Clostridium sordelli y Clostridium bifermentans por cromatografía de gases, y en 1971 (9) analizaron los ácidos grasos provenientes de extractos de especies de Neisseria por cromatografía de gases.

En 1971 Kaneda (40) estudió los factores que afectan la concentración de ácidos grasos en Bacillus cereus, como son la temperatura y el medio de cultivo utilizado. En 1972 (3) Amstein y Hartman diferenciaron algunos enterococos usando la técnica de cromatografía de gases.

En un intento para demarcar la taxonomía de la familia *Enterobacteriaceae*, Gehrke y Goerlits en 1963 (22), Brian y Gardner en 1967 (7), Cronan en 1975 (15), Boe en 1980 (4), Häusler en 1983 (30) y Veys en 1989 (66) utilizaron la cromatografía de gases para identificar y esclarecer

la posición taxonómica de diversos géneros y especies de enterobacterias.

En 1975 Moss et al (54) realizaron un estudio para la identificación de microorganismos con el análisis de ácidos grasos celulares por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas. Posteriormente Holmes y Willcox (33) en 1978 contribuyeron al estudio e identificación de la familia *Enterobacteriaceae* por el sistema de identificación bioquímica comercial para enterobacterias API 20 E. Más tarde, Moss (55) reportó en 1980 el uso de cromatografía de gases para el análisis de los ácidos grasos de *Propionibacterium acnes* y *Propionibacterium shermanii*. En el año de 1982 (56) Moss y Montiel reportaron el análisis de ácidos grasos de cadenas cortas en *Clostridium difficile* por medio de cromatografía gas-líquido con una columna capilar de sílice fundido.

Bousfield et al en 1983 (6) elaboraron un análisis numérico del total de los perfiles de los ácidos grasos para la identificación de coryneformes, nocardioformes y algunas otras bacterias; Häusler y Richter realizaron la identificación de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* por cromatografía de gases, en 1985 (31). En 1986 Rasoamanjara et al (59), caracterizaron especies de *Flavobacterium* por el análisis de los ácidos grasos. En 1987 Verhulst et al (67) realizaron un análisis sistemático de los ácidos grasos de cadena larga de *Eubacterium lentum*. En 1988 Monteoliva (52) realizó un estudio sobre la composición de ácidos grasos celulares de *Deleya halophila* y el efecto que provoca la temperatura y la concentración de sales en su crecimiento. En 1988 Eerola et al (21) estudiaron por medio de cromatografía de gases el procedimiento para la identificación de bacterias aisladas en clínica. En 1989 Johnson et al (37) desarrollaron un método específico de identificación de *Clostridium difficile* por cromatografía gas-líquido.

Brondz et al (10) en 1989 realizaron una evaluación de los ácidos grasos de levaduras por cromatografía de gases, como una alternativa a los métodos quimiotaxonómicos usuales. En 1990 Ahmad et al (2) elaboraron un árbol filogenético de un grupo de enterobacterias aplicando la biosíntesis de aminoácidos aromáticos, por otra parte Matsuyama et al en 1990 (48) estudiaron los niveles de glucolípidos y la producción de ácidos grasos en *Serratia rubidea*, por último en 1990 Okuyama et al (57) analizaron los ácidos grasos trans-insaturados en bacterias psicrófilas, *Vibrio sp.* cepa ABE-1.

INTRODUCCION

Durante cientos de años, los biólogos se han dado a la tarea de nombrar y describir especies de **microorganismos**, plantas y animales. Teniendo un gran número de nombres y una descripción adjunta; el siguiente paso es compilar esta información en forma ordenada y sistemática, es decir clasificarla. (45)

La **clasificación e identificación** de microorganismos es uno de los problemas más complejos de la microbiología moderna, que debe basarse en el conjunto de características morfológicas, fisiológicas y de cultivo. Una sola característica, por más importante que sea, no es una base suficiente para clasificar o identificar a un organismo. Por lo que en la actualidad para la identificación precisa deben utilizarse pruebas de tipificación serológica, fagotipificación y algunas otras pruebas o determinaciones como el contenido de bases del ADN, hibridación, electroforesis de proteínas y diferencias en la microestructura celular. (20), (29)

Para conocer con precisión las características bioquímicas de una determinada especie es necesario probar muestras amplias y diversas de cepas y las reacciones de tal especie a cualquier prueba deben expresarse en forma de porcentajes. (45)

El presente trabajo de tesis, forma parte de la Línea de Investigación sobre Bacteriología Ambiental del proyecto de Conservación y Mejoramiento del Ambiente, que se desarrolla en la Unidad de Investigación de la ENEP Iztacala, con el apoyo del CONACyT y en convenio con el Instituto de Investigaciones del Agua en Praga Checoslovaquia, bajo la asesoría del Dr. Häusler y el Dr. Richter, especialistas a nivel mundial de este tema.

El objetivo de la investigación es analizar la composición de los ácidos grasos celulares totales de Enterobacter agglomerans por cromatografía de gases para alimentar un banco de datos que permita la identificación de especies de la familia *Enterobacteriaceae*, con base en el perfil lipídico de cada bacteria.

Con la información del banco de datos se pretende realizar la identificación de enterobacterias en muestras problema de agua y aguas de desecho, que es el tipo de muestras que se analizan en dicho proyecto.

Las cepas atípicas, cuando se les estudia debidamente, resultan ser miembros típicos de un grupo biológico dado, dentro de una especie existente, y a veces son miembros de una nueva especie. (45)

El concepto de especie es complejo. En términos generales, una especie constituye un grupo de individuos (o poblaciones clonales en el caso de los microorganismos) que presentan un elevado grado de similitud fenotípica entre sí, siendo, al mismo tiempo, claramente diferenciables de los integrantes de otros conjuntos de este tipo. (62)

En la década de los 60's la taxonomía numérica (también llamada taxonomía computada o fenotípica) se usó ampliamente. En este método, gran número de características bioquímicas, morfológicas y/o culturales se usan para determinar el grado de semejanza entre los microorganismos, también la susceptibilidad a los antibióticos y compuestos orgánicos se han añadido a las características usadas en la taxonomía numérica. (45)

La clasificación y la identificación de las bacterias progresan con el enfoque numérico de la taxonomía, que hizo posible clasificar a los organismos con base en un gran número de características. (45)

En la mayoría de los grupos, la identificación se basa en las características más fácilmente observables y en las bacterias este criterio no es del todo satisfactorio. En la actualidad la taxonomía de bacterias se basa en atributos funcionales; en la práctica se ha demostrado que los métodos en la identificación bacteriana proveen una amplia información que en ocasiones por razones técnicas y de tiempo no es utilizada totalmente, además de implicar mayor trabajo en laboratorio, con más consumo de tiempo en su proceso, sobre todo en áreas donde el acortar tiempo es importante como en la clínica, ingeniería sanitaria, calidad del agua, veterinaria e industria alimenticia. La quimiotaxonomía con el uso del análisis de los lípidos en bacterias propone una alternativa: menos tiempo, métodos más sencillos y mayor exactitud. (25), (33)

Aunque en años recientes se ha hecho un esfuerzo para acelerar y simplificar la identificación introduciendo varios métodos por micropruebas bioquímicas, tales como el sistema comercial API, que permite una automatización parcial de los procesos y la aplicación de métodos por computadora, la identificación aún permanece muy complicada pues está basada en el mismo principio, la investigación de las propiedades bioquímicas de los microorganismos. Es por ello que varios autores tratan de encontrar una solución reemplazándolos por un método simple que provea al menos la misma cantidad de información, llevando

así la identificación hacia otros principios y buscando características o rasgos, principalmente en la composición química de los microorganismos, por lo que algunos autores centraron su atención en sustancias que están presentes en varios microorganismos en la escala más amplia posible. Estos intentos fueron posibles debido al desarrollo de nuevos y avanzados métodos químicos de análisis de separación especialmente por cromatografía de líquidos y de gases acoplada a espectrometría de masas; electroforesis y espectroscopía de infrarrojo, el desarrollo de la instrumentación y automatización del proceso analítico hace una perfecta separación de los posibles componentes de la muestra analizada con una mínima demanda de tiempo así como de su expresión cuantitativa. La aplicación práctica de estos métodos en el campo de la taxonomía se denomina quimiotaenonomia. (24), (30), (33), (36)

FUNDAMENTOS TEORICOS

Cromatografía de gases

La cromatografía de gases ha sido hasta la fecha un invaluable auxiliar en muchos campos de la investigación científica. Dentro del campo tan amplio de la aplicación que tiene dicha técnica, se han incrementado de un tiempo a la fecha (aproximadamente a partir de 1962) las investigaciones sobre los constituyentes de las células bacterianas específicamente en el contenido de los ácidos grasos, obteniendo con esto un avance en los aspectos taxonómicos, tomando en cuenta que cada día se requieren estudios más rápidos y precisos. (58), (31)

La cromatografía es la separación física de dos o más componentes basada en la diferente distribución de dos fases, una de las cuales es estacionaria y la otra móvil, en el caso de la cromatografía de gases el fluido es un gas. (26)

La cromatografía de gases consiste en la separación de los componentes volátiles de una mezcla, por medio de la elución de estos a través de una fase estacionaria adsorbida sobre un soporte y el paso de una fase móvil o gas acarreador. (16), (64)

Cuando la fase estacionaria es un líquido se habla de cromatografía gas-líquido; y cuando la fase estacionaria es un sólido como carbón o sílica-gel se le llama cromatografía gas-sólido. (26)

Las partes integrantes de un cromatógrafo de gases son:

- 1) Gas acarreador
- 2) Inyector
- 3) Horno
- 4) Columna
- 5) Detector
- 6) Registrador

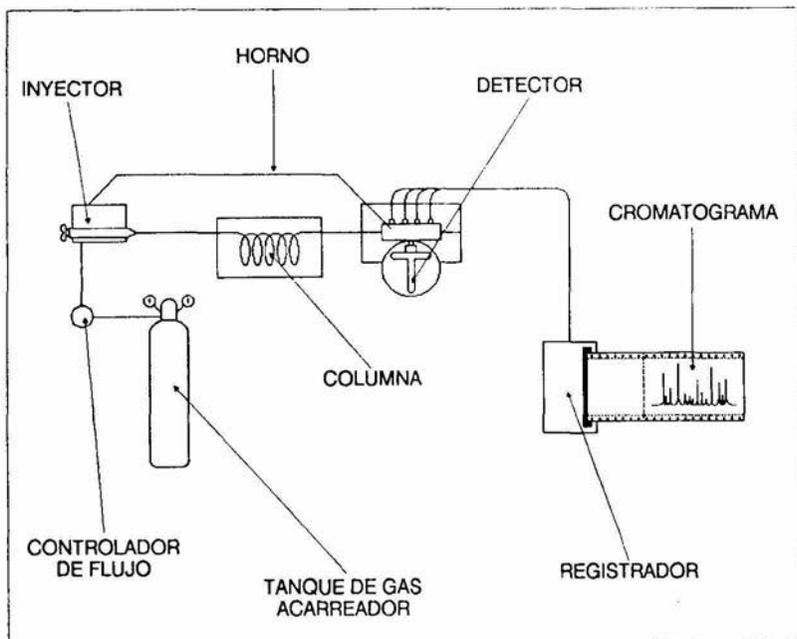


Diagrama de un sistema cromatográfico.

En el cromatógrafo se utiliza un gas acarreador (FASE MOVIL) que bajo presión moviliza una muestra de vapor desde el inyector y a través de una columna (donde se encuentra soportada la FASE ESTACIONARIA); dicha muestra es adsorbida sobre un soporte donde se efectúa la separación, luego pasa al detector donde se convierte en una señal eléctrica, la cual puede registrarse en un graficador. A la gráfica obtenida se le llama **cromatograma**, y los parámetros registrados son **tiempo** en las abscisas y **milivolts** en las ordenadas. (26)

Existe un detector como dispositivo que indica y mide la cantidad de componentes que se separan y fluyen con el gas acarreador. Un detector de "diferenciación" da una respuesta proporcional a la concentración del compuesto eluido, el detector de conductividad térmica y el de ionización de flama, producen cromatogramas formados por picos o curvas que corresponden a cada uno de los componentes de la mezcla, el área bajo la curva de cada pico es proporcional a la masa total del componente. (26)

En el caso particular del presente trabajo el cromatógrafo cuenta con un registrador gráfico, que calcula las áreas bajo la curva de cada pico, obteniéndose de esta manera el registro de tiempos de retención y áreas exactos.

El parámetro utilizado para determinar la elución de un compuesto es el tiempo de retención absoluto (TRA), bajo condiciones constantes de presión, flujo y temperatura, tomando en cuenta que el flujo es lineal con respecto al tiempo. Este tiempo de retención es característico de la muestra, además este parámetro se usa para la identificación de la muestra problema. (26)

La identificación se basa en una comparación de los tiempos de retención de el componente desconocido con los datos obtenidos de un compuesto estandar, analizado bajo las mismas condiciones, (49); los datos de los tiempos de retención de las sustancias se observan fácilmente en el cromatograma al no verse traslapados los picos obtenidos, permitiendo el uso de estos datos para alguna sustancia específica. Por esto la identificación de microorganismos por CGL requiere de especies tipificadas o cepas tipo, con el propósito de hacer comparaciones. (18)

Para la obtención del perfil de los ácidos grasos de Enterobacter agglomerans es necesario abordar la composición química de los lípidos en las bacterias.

Lípidos en bacterias

De primordial importancia es el análisis de los polisacáridos, los aminoácidos y en especial los diferentes lípidos; en las dos últimas décadas se ha abordado el problema de determinar ácidos grasos utilizando la técnica de cromatografía de gases con muy buenos resultados, encontrándose como ventajas particulares, el reducir el tiempo del proceso total, además de minimizar el error humano, así como ampliar la información con respecto a las pruebas bioquímicas tradicionales en una sola operación, lo cual conlleva a la identificación en condiciones muy objetivas. (34)

La composición química de las bacterias es semejante a la de otros microorganismos; el 90% de agua y el 10% de peso seco, este último integrado por ADN, ARN, proteínas, polisacáridos, lípidos y fosfolípidos. (12)

Los lípidos son una clase de constituyentes celulares insolubles en agua y solubles en disolventes no polares, tales como éter, cloroformo y benceno (62). Se han subdividido en lípidos complejos, que se caracterizan porque contienen ácidos grasos como componentes, comprenden a los acilglicéridos, los fosfoglicéridos, los esfingolípidos y las ceras, que difieren en la estructura de los esqueletos a los que se hallan unidos, por covalencia, los ácidos grasos. Reciben, también, el nombre de lípidos saponificables porque producen jabones por hidrólisis alcalina. El otro grupo son los lípidos sencillos, que no contienen ácidos grasos y no son saponificables. (44)

Los lípidos y sus ácidos grasos celulares se encuentran en todos los microorganismos, excepto cierto tipo de virus, este tipo de compuestos bioquímicos presentes en bacterias han sido estudiados por cromatografía de gas-líquido, más que cualquier otro tipo de componente bioquímico. (21), (52), (60)

Para fines del presente trabajo es necesario identificar solamente los ácidos grasos celulares en bacterias.

Ácidos grasos constituyentes de la célula bacteriana

El contenido total de ácidos grasos de la mayoría de las especies de bacterias se encuentran distribuidos en la pared celular, membrana plasmática e inclusiones citoplásmicas. (58)

Incluyendo todos los lípidos, estos son mucho más abundantes en la pared de las células gram negativas que en la de las gram positivas (61). Las bacterias no acumulan lípidos como material de reserva, sin embargo contienen cantidades considerables de ellos como constituyentes de sus sistemas membranosos. (28)

Los ácidos grasos se sintetizan por separado y luego son esterificados para formar lípidos más complejos. Se han encontrado muchas clases de ácidos grasos en las bacterias: los que contienen un número diferente de átomos de carbono; son de cadena recta o de cadena ramificada; pueden tener o no dobles enlaces; pueden contener o no grupos -OH; y contener o no anillos de ciclopropano. (62)

Los ácidos grasos de las bacterias pueden ser saturados o no saturados, o tener uno o más dobles enlaces, y el precursor de dichos ácidos grasos es la Acetil Coenzima A (Acetil CoA). (28)

Los ácidos grasos saturados iso y anteiso se encuentran en las bacterias gram positivas. Las gram negativas contienen cadenas lineales de ácidos grasos con una doble ligadura. Esta característica se utiliza como guía para la clasificación taxonómica de bacterias. Los ácidos grasos no saturados iso y anteiso son aún raros en la naturaleza. La determinación de la posición de la doble ligadura en estos ácidos grasos se consideró necesaria en aspectos de biosíntesis, esto incrementa el valor taxonómico. (5)

La biosíntesis se lleva a cabo por un procedimiento que difiere significativamente del proceso opuesto a la oxidación de ácidos grasos y tal vez la diferencia más inesperada estriba en que el dióxido de carbono (CO_2) es esencial para la síntesis de ácidos grasos en extractos celulares. (44)

La composición de ácidos grasos presente en los fosfolípidos juega un papel importante en la membrana de los microorganismos ya que determina la extensión de los flúidos en la membrana. Este flúido es necesario para funciones relacionadas con la membrana en procesos metabólicos. (5)

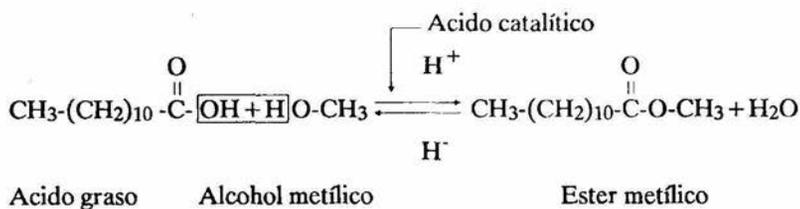
Los ácidos grasos se analizan debido a que representan un medio rápido para la identificación de bacterias con fines taxonómicos, aunque también se han analizado en relación a estudios metabólicos.

Sin embargo los ácidos grasos no se pueden analizar cromatográficamente como tales, por lo tanto es necesario extraerlos por medio de la esterificación.

Esterificación de ácidos grasos

La reacción para efectuar la esterificación es un ejemplo importante de sustitución nucleofílica, en donde los ácidos grasos reaccionan con el alcohol metílico (CH_3OH) o con una molécula semejante a éste y que realice la misma función, como es el caso del metóxido de sodio (CH_3ONa), ya que el alcohol metílico o el metóxido de sodio son necesarios para la metilación del ácido graso o ácidos grasos.

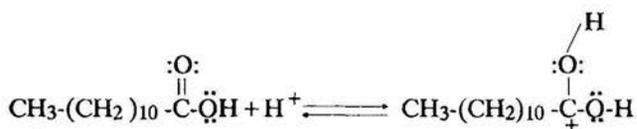
Esterificación con alcohol metílico



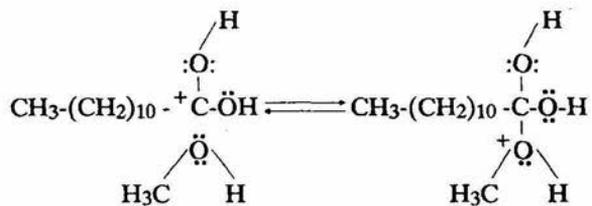
Esterificación con metóxido de sodio



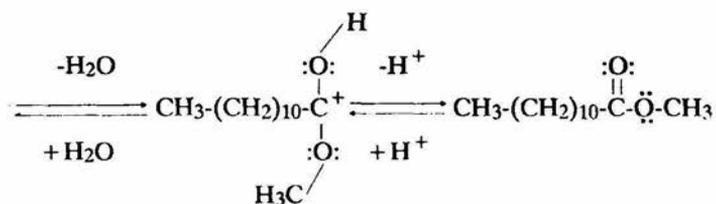
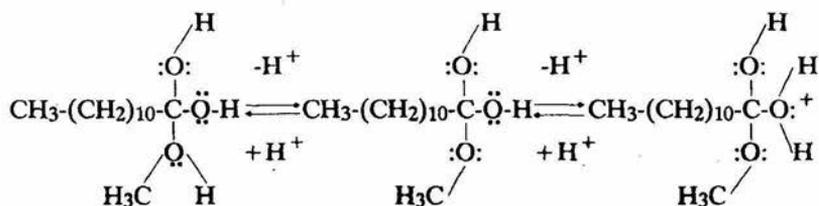
La reacción de esterificación requiere de la presencia de un ácido catalizador. El primer paso de la reacción es la protonación del grupo carboxilo hacia el doble enlace de oxígeno del ácido graso.



El grupo carboxilo protonado es rápidamente atacado nucleofílicamente.



El producto formado por este ataque bajo una transferencia del ion hidronio y una eliminación, dan el producto final. (23), (51)



Ester metílico

Características generales de Enterobacter agglomerans

La familia de las *Enterobacteriaceae* constituye un gran grupo heterogéneo de bastoncillos gram negativos cuyo hábitat natural es el tubo intestinal del hombre y los animales mamíferos. Las enterobacterias son aerobias o anaerobias facultativas, fermentan gran cantidad de carbohidratos, poseen una estructura antigénica compleja y producen diversas toxinas y otros factores de virulencia. Hoy en día se sabe que miembros de esta familia bacteriana son notables como agentes causales de infecciones urinarias y pueden aislarse de múltiples focos infecciosos distintos del tracto digestivo. Las enterobacterias son probablemente causa de más padecimientos humanos que cualquier otro grupo. (11), (43), (46)

La taxonomía de las enterobacterias es compleja y está cambiando con rapidez conforme se efectúan estudios de homología del ADN, los cuales son muy similares a los resultados obtenidos de un análisis cromatográfico. (50)

La familia *Enterobacteriaceae* se caracteriza desde el punto de vista bioquímico por la capacidad de sus miembros para reducir los nitratos a nitritos y para fermentar la glucosa con producción de ácido o ácido y gas. (45)

Los miembros de esta familia son primordialmente móviles, aunque algunas cepas no lo son (géneros Shigella y Klebsiella). Las especies móviles poseen flagelos peritricos. (45)

El grupo Enterobacter es indicador de contaminación fecal asociado a infecciones intestinales además de ser cosmopolita encontrándose en aguas recreacionales, aguas municipales y agua potable; sobreviviendo a los detergentes al igual que otros grupos de la familia *Enterobacteriaceae*, también se llega a encontrar en alimentos como chocolates y cacao en polvo. (14), (17), (41)

Una propiedad bioquímica que distingue a algunas de las cepas de Enterobacter (aunque no todas) de otras bacterias entéricas es su capacidad de fijar nitrógeno. Esta propiedad sólo se manifiesta en condiciones anaeróbicas de crecimiento, ya que la nitrogenasa de estas bacterias se desnaturaliza rápidamente en presencia de oxígeno. (45)

Enterobacter agglomerans representa aproximadamente el 6% del total de especies aisladas de Enterobacter, es quizá la más difícil de identificar. Se reconocen once grupos de E. agglomerans, basados en

las reacciones de pruebas de reducción de nitrato, indol y Voges Proskauer. La mayoría de los cultivos de esta especie pueden diferenciarse de los géneros Klebsiella y Enterobacter y también de casi todas las enterobacterias, por su capacidad para descarboxilar cualquiera de los tres aminoácidos; por la producción de un colorante amarillo (alrededor de 72%) y algunas otras reacciones. (45)

JUSTIFICACION

Uno de los puntos principales en los estudios de contaminación bacteriológica se enfoca a la determinación del origen de la contaminación fecal, por lo que hace énfasis en el grupo coliforme (enterobacterias), los cuales son claros indicadores de contaminación fecal y en consecuencia representan la existencia de un peligro potencial para la salud.

Por esta razón, es necesario acelerar los procesos de identificación de los microorganismos que afectan directamente al hombre y su ambiente. (32)

Las técnicas tradicionales de identificación de microorganismos se basan principalmente en sus características fisiológicas, morfológicas, y en pruebas serológicas. Para el uso de estas técnicas, es necesario efectuar previamente numerosos pasos en diferentes medios de cultivo.

Debido a los inconvenientes que implica el uso de técnicas tradicionales de identificación de microorganismos, se hace necesaria, en nuestro país, la implementación o el uso de nuevas técnicas; como es el caso de la identificación de enterobacterias por cromatografía de gases, que de entre sus características, destaca la minimización del error humano y reducción del tiempo del proceso total de identificación, ampliando la información con respecto a las pruebas bioquímicas y como consecuencia de esto aumenta la posibilidad de investigación bacteriológica en diversas áreas, como la alimenticia, la agrícola, la ecológica, la sanitaria y la clínica.

OBJETIVOS

Obtener un perfil de la composición de ácidos grasos, por cromatografía de gases, de Enterobacter agglomerans, y que se utilizará como carácter taxonómico.

Contribuir a formar un banco de datos para la identificación de enterobacterias de interés sanitario y clínico en México.

METODOS

La bacteria que se utilizó es Enterobacter agglomerans y la cepa procede de la American Type Culture Collection (ATCC 27155), cuya cepa se encuentra depositada en el Centro de Investigaciones Avanzadas del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV).

Preparación del cultivo puro

Para obtener un crecimiento del microorganismo estudiado, se preparó un cultivo puro en un medio agar inclinado marca DIFCO. Ya que en reportes anteriores de identificación o diferenciación de bacterias por cromatografía de gases establecen que para el análisis de productos metabólicos se requiere de cultivos puros. (13)

Del medio inclinado, en el que se mantuvo la cepa pura, se sembró una caja petri, con 25 ml de agar, de tal manera que se cubrieran los cuatro lados de la caja con el fin de obtener una colonia perfectamente aislada; la caja se incubó a 37°C por 24 hrs.

Preparación de la biomasa

Para la obtención de la biomasa, la inoculación se hizo a partir de la colonia aislada y se prepararon dos cajas petri por cepa bacteriana utilizando 25 ml de agar nutritivo (20 g/l de solución estéril) por caja, incubando a 37°C por 24 hrs.

Cosecha de la bacteria

Se cosechó la bacteria después de las 24 hrs de incubación, adicionando 5 ml de formaldehído al .5% a cada caja, y raspando suavemente con una varilla de vidrio en forma de "L" para desprender todo el crecimiento celular.

El contenido de las dos cajas petri (6 ml aproximadamente) se vació en tubos de centrifuga mediante un embudo, utilizando uno diferente para cada cepa, previamente enjuagados con hexano y se sometió a centrifugar a 15,000 rpm durante 10 min.

El sobrenadante del primer lavado se desechó, para posteriormente agregar 5 ml de suero fisiológico de NaCl al 0.85%, para realizar el segundo lavado, se procedió a centrifugar nuevamente a 15,000 rpm durante 10 min. Este proceso se repitió una vez más para el tercer lavado, obteniendo finalmente un paquete celular.

Liofilización del paquete celular

La biomasa obtenida se repartió perfectamente sobre las paredes de tubos viales con la finalidad de obtener un secado más rápido y eficiente durante la liofilización, que tuvo una duración aproximada de 3 hrs a -50°C, el liofilizado debe quedar esponjoso y separado para su posterior esterificación.

Esterificación

Se pesan aproximadamente 20 mg de materia seca obtenida del liofilizado y se colocan en un tubo de ensaye al que se le agrega 1 ml de metóxido de sodio, se deja reposar por 5 min. Posteriormente se adicionan de 0.6 a 0.7 ml de metanol saturado con cloro gas y se mide el pH, si no es de 1 ó 2, se ajusta con metanol saturado de ácido sulfúrico, manteniéndose en agitación con movimientos circulares ligeros durante 30 min, después de los cuales se agregan 2 ml de solución fisiológica al 0.85% mezclando con movimientos circulares ligeros, por espacio de 5 a 7 min.

El proceso de extracción de los ésteres metílicos con hexano se realiza agregando 1 ml de hexano, agitando mecánicamente por espacio de 5 min y se deja reposar 5 min para dejar que se separen las capas y extraer el hexano con los ésteres metílicos (capa superior transparente); con una pipeta Pasteur se transfiere a un tubo de ensaye con algunos granos de sulfato de sodio anhidro para extraer el agua que se pueda presentar. Este proceso de extracción se repite dos veces más para cada una de las muestras analizadas.

Obtención del cromatograma

Al final se obtiene un volumen aproximado de 3 ml de hexano con los ésteres metílicos. El hexano se evapora con gas nitrógeno hasta obtener un volumen de 10 ^{Ml} aproximadamente, de los cuales se toma 1 ^{Ml} con una microjeringa para inyectarse posteriormente en el cromatógrafo donde se realiza la separación y determinación de los ésteres metílicos.

Las especificaciones del equipo y accesorios para el análisis de la composición de los ácidos grasos son las siguientes: cromatógrafo Hewlett Packard HP 5890 A, acondicionado con un detector de ionización de flama alcalina, una columna capilar de 30 m x 0.25 cm de diámetro interno, en Heliflex, RSL 150 y espesor de película de 0.25; usando nitrógeno como gas acarreador con flujo de 30 ml/min; las temperaturas del inyector y detector fueron isotérmicas (270°C); el programa de temperatura del horno fue de 120°C, 4°C x min hasta alcanzar 270°C, el tiempo de análisis varió según las necesidades de cada muestra entre 30-40 min.

Los resultados se capturan en un integrador electrónico Hewlett Packard HP 3396 A, acoplado al cromatógrafo.

Los datos obtenidos y registrados en el integrador aparecen en un cromatograma, en el cual se muestran los tiempos de retención y las áreas bajo la curva que son proporcionales a la cantidad de los ácidos grasos que constituyen la célula bacteriana. Se obtuvieron un total de 57 cromatogramas que fueron comparados contra un estándar de ácidos grasos para lograr la identificación de los mismos.

Análisis estadístico

De los picos que se obtuvieron en los cromatogramas, el punto de interés son los ácidos grasos con el número de átomos de carbono en el intervalo de 12 a 28. Los ácidos con una cadena más corta que 12 aparecen como productos intermedios y no se toman en consideración. Una vez seleccionados los picos de importancia comparados con el cromatograma estándar, se procesa la información por las técnicas que se citan a continuación:

Normalización

Este es el primer paso para el procesamiento numérico a efectuarse con los datos obtenidos, con el fin de estandarizar las unidades porcentuales de medición de las áreas dadas por el cromatograma, preparando así los datos de la especie Enterobacter agglomerans.

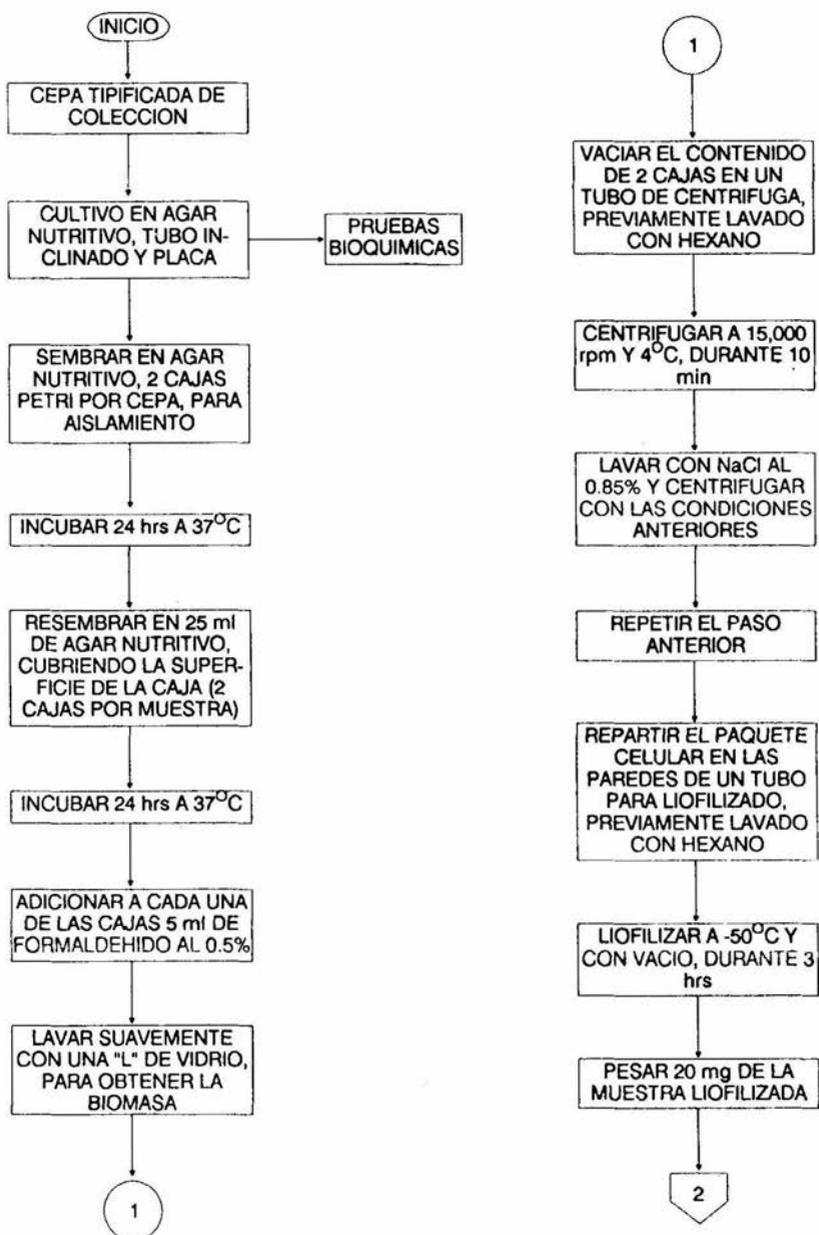
El proceso de normalización se efectúa transformando los datos numéricos de área y tiempo a partes proporcionales en porcentaje en relación a un dato de área y tiempo tomando como referencia el 100%.

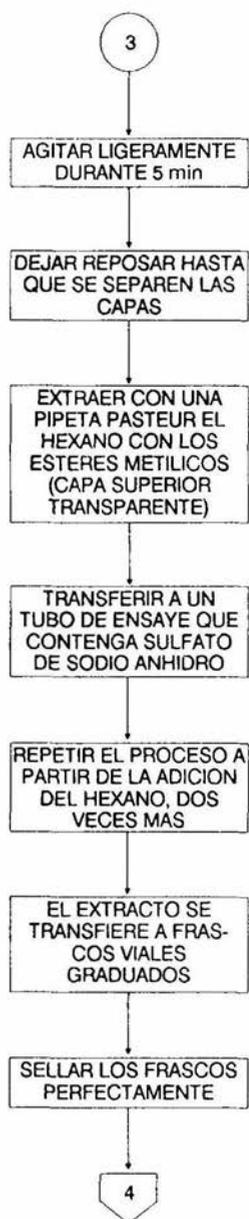
El criterio para obtener el dato referente de área y tiempo se elige de los datos originales arrojados por el cromatograma, aquel que presenta el pico o área más alta y se toma como el 100%. Ya que se obtienen los datos normalizados se procede a tabularlos y graficarlos por las repeticiones efectuadas para esta cepa.

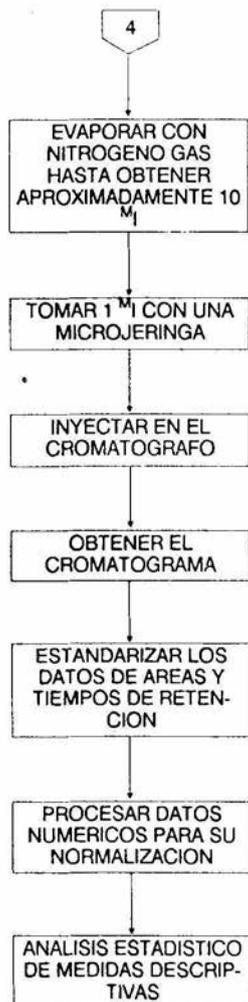
Medidas estadísticas descriptivas

Se calculó la media aritmética, desviación estándar, coeficiente de variación, límite superior, límite inferior a $\pm 2 S$, máximo y mínimo para las áreas de los picos y tiempos de retención de los carbonos de las cadenas de ácidos grasos. Para eliminar el efecto de la variación por el tamaño del inóculo, los valores se calculan como porcentajes del total del área del pico.

DIAGRAMA DE LA TECNICA CROMATOGRAFICA PARA LA DETERMINACION DE
ACIDOS GRASOS CELULARES DE BACTERIAS







RESULTADOS

Para la evaluación del análisis por cromatografía gas-líquido de los ácidos grasos celulares totales a partir de muestras esterificadas de Enterobacter agglomerans, se analizaron los resultados de manera cualitativa y cuantitativa, para lo cual se realizó la estandarización de los tiempos de retención y áreas de los picos de las cadenas de cada uno de los ácidos grasos mediante el procedimiento citado en el método, con los datos normalizados se llevó a cabo el análisis descriptivo correspondiente.

Los resultados se obtuvieron por análisis repetitivo de los 57 cromatogramas (repeticiones). La identificación de los picos se realizó en base a un estándar conocido de ésteres metílicos de ácidos grasos para enterobacterias SUPELCO Cat. # 4-7080 lote LA26756 1990, analizado bajo las mismas condiciones en que fueron analizadas las muestras de E. agglomerans.

Para el análisis se tomaron en consideración las cadenas de ácidos grasos con una composición de entre 12 y 28 carbonos, ya que son los característicos encontrados en estas células procaríotes, los de menor longitud se omiten debido a que presentan un área menor al 1%, por lo que su aparición no fue significativa para la determinación, esto se apoya con un estudio realizado por Eerola, 1988 (21).

Por consiguiente los resultados cualitativos nos permiten determinar la siguiente constitución de ácidos grasos: C 12:0, C 14:0, C 15:0, C 3-OH 14:0, C 16:1⁹ (Cis), C 16:0, C 17:0^{9,10} (Cis), C 17:0, C 18:1⁹ (Trans) y C 18:1¹¹ (Cis), C 18:0 y 19:0^{9,10} (Cis); con los siguientes nombres: dodecanoico, tetradecanoico, pentadecanoico, 3-hidroxitetradecanoico, Cis-9-hexadecenoico, hexadecanoico, Cis-9,10-metilenhexadecenoico, heptadecanoico, Trans-Cis-9,11-octadecenoico, octadecanoico y Cis-9,10-metilenoctadecenoico. (Tabla 1)

La metodología a seguir durante el presente análisis, permite la distribución de los componentes de la mezcla de ácidos grasos (obtenidos a partir de la esterificación) presentes en los lípidos membranosos de E. agglomerans.

La Gráfica 1, muestra los resultados de los datos normalizados para los tiempos de retención de los componentes eluidos de la muestra analizada, las barras representan la media aritmética, en la que se observa

que el primer componente eluido fue el ácido dodecanoico con un tiempo medio de 44.50, una desviación estándar de 0.15 y un coeficiente de variación de 0.34%, el cual está formado por una cadena lineal saturada de 12 carbonos; la más corta y sencilla que se presentó en el perfil ya que no presenta ni dobles ligaduras, ni metilaciones, ni hidroxilaciones.

Posteriormente se presentó el ácido tetradecanoico con las mismas características que el anterior, pero como su nombre lo dice con 14 carbonos en su cadena y un valor promedio de 70.58, una desviación estándar de 0.12 y un coeficiente de variación de 0.16%; inmediatamente después se presentó otro ácido graso saturado con una cadena de 15 carbonos y sin ninguna modificación química en su molécula, este es el pentadecanoico con un valor de media aritmética de 84.99, una desviación estándar de 0.43 y un coeficiente de variación de 0.50%.

Después apareció el ácido 3-hidroxitetradecanoico, compuesto de 14 carbonos en su cadena con la modificación de que este es un hidroxácido con un grupo hidroxilo en el carbono 3 y representa uno de los más complejos encontrados en el presente perfil, el valor promedio del tiempo es de 90.55, una desviación estándar de 0.20 y un coeficiente de variación de 0.22%.

En quinto lugar se observa el pico correspondiente a un ácido graso insaturado ya que presenta una doble ligadura en el carbono 9 y una isomería geométrica con radicales -H en el mismo lado de la molécula, por lo que se le llama Cis-9-hexadecenoico con 16 carbonos en su cadena y un porcentaje promedio del tiempo de retención de 96.02, con una desviación estándar de 0.16 y un coeficiente de variación de 0.17%; el siguiente ácido graso es el hexadecanoico con 16 carbonos dispuestos en una cadena lineal saturada y sin ningún tipo de configuración; este ácido es el característico de la familia *Enterobacteriaceae* y presentó un valor promedio del 100%, por lo que fue el representativo y se tomó como dato referente.

Posteriormente se observó la presencia del Cis-9,10-metilenhexadecenoico, que tiene como característica primordial un mecanismo de resonancia dado por el grupo metil presente, además de una doble ligadura en los carbonos 9 y 10 lo que le caracteriza como insaturado y presentó un valor de 111.77, una desviación estándar de 0.12 y un coeficiente de variación de 0.10%.

El ácido heptadecanoico fue el que se presentó enseguida con un valor medio de 114.27, una desviación estándar de 0.25 y un coeficiente

de variación de 0.22%, este ácido es representado por una cadena lineal de 17 carbonos por lo que es una cadena simple saturada que no presenta ningún tipo de configuración; posteriormente se presentó un ácido con una isomería geométrica Trans con radicales -H en posición opuesta alrededor de la doble ligadura presente en el carbono 9, aunque puede cambiar su orientación realizando un giro de 30° y convertirse en Cis cambiando la doble ligadura al carbono 11; este ácido es llamado Trans-Cis-9,11-octadecenoico y presenta un valor medio de 125.03, una desviación estándar de 0.22 y un coeficiente de variación de 0.18%.

El penúltimo ácido que se presenta es el octadecanoico con 18 carbonos que componen su cadena lineal saturada, la cual no es afectada por ningún tipo de modificación, este presenta un valor promedio de 128.5, una desviación estándar de 0.31 y un coeficiente de variación de 0.24%.

Por último se presentó el Cis-9,10-metilenoctadecenoico, que al igual que el anterior se compone de 18 carbonos, sin embargo este presenta un mecanismo de resonancia y es insaturado ya que hay una doble ligadura entre el carbono 9 y 10 con un grupo metil, este ácido tiene un tiempo de retención de 140.03, 0.34 de desviación estándar y 0.24% de coeficiente de variación. (Tabla 2)

En promedio el porcentaje de los cromatogramas que caen dentro de los límites es del 95% para los 11 ácidos.

El análisis cuantitativo revela que el área producida por cada pico es proporcional a la concentración del componente, donde el factor de respuesta va a ser específico para cada componente y su valor dependerá de las propiedades físicas, químicas y del principio de detección. Esto puede usarse para determinar la concentración exacta de cada uno de los componentes. La exactitud obtenida por cromatografía de gases depende de la técnica usada, detector, método de integración y concentración de la muestra.

Considerando el aspecto cuantitativo, es necesario desglosar el análisis estadístico para cada uno de los componentes ya que cada ácido graso posee sus propias características.

En la Gráfica 2, las barras representan el valor promedio dado en porcentaje del área del pico de cada ácido graso cuantificado, ya que se analizaron 57 determinaciones para tener un tamaño de muestra lo suficientemente considerable que nos permitiera obtener resultados confiables.

En la evaluación de los análisis cromatográficos de los ácidos grasos, se observó que el ácido graso más abundante para *E. agglomerans*, es el correspondiente al hexadecanoico, el cual mantiene su abundancia en las 57 corridas cromatográficas sin variación considerable, por lo que se tomó como referencia para obtener el porcentaje de los restantes ácidos grasos; ya que el 100% de los valores obtenidos caen dentro de los límites establecidos podemos decir que este ácido graso mantiene sus propiedades químicas con una estabilidad alta.

Siguiendo en abundancia el Cis-9,10-metilenhexadecenoico con un valor medio de área de 50.69, una desviación estándar de 3.07 y un coeficiente de variación de 6.06%, donde sólo el 92.29% de los cromatogramas se encuentran dentro de los límites establecidos, este ácido graso tiene una variación, con respecto a su abundancia, baja; la desviación estándar nos dice que este se vió afectado de alguna manera durante el desarrollo de la técnica, debido posiblemente al mecanismo de resonancia dado por el grupo metil y la insaturación de este.

Después se presentó el ácido Trans-Cis-9,11-octadecenoico con un área promedio de 27.13, una desviación estándar de 5.28 y un coeficiente de 19.46%, esto nos dice que la abundancia de este ácido graso no se mantuvo muy constante, sin embargo el 94.73% de los cromatogramas cayeron dentro de los límites.

Le sigue el ácido graso tetradecanoico que presenta una abundancia promedio de 20.03, un valor correspondiente de desviación estándar de 3.5 y un coeficiente de variación de 17.47%, y al marcarse los límites vemos que el 96.49% del total de las muestras analizadas se encuentran dentro de estos; posteriormente se presentó el Cis-9-hexadecenoico con una media de 19.18 y una desviación estándar de 4.28 así como un coeficiente de variación de 22.31%, el 94.73% de los cromatogramas se encuentran dentro de los límites establecidos.

Después tenemos el ácido graso Cis-9,10-metilenoctadecenoico, con un valor medio en el área de 14.58, una desviación estándar de 2.43 y un coeficiente de variación 16.70%, donde la abundancia fue más o menos constante; para este el 94.73% de las muestras analizadas están dentro de los límites.

Siguiendole en abundancia se presentó el 3-hidroxitetradecanoico con una media de 6.42, siendo éste uno de los menos abundantes y que presenta una desviación estándar de 4.33 con un coeficiente de variación de 67.44%, este alto porcentaje de variación fue posiblemente debido a que el grupo hidroxilo presente en el carbono 3 le confiere inestabilidad

al ácido; aquí observamos que sólo el 85.96% de los cromatogramas se encuentran dentro de los límites, lo que confirma la alta inestabilidad de este ácido.

Los siguientes cuatro ácidos grasos son los de menor abundancia en el perfil. El pentadecanoico con un valor medio de 5.16, una desviación estándar de 1.04 y un coeficiente de variación de 20.16% y el 98.24% de los cromatogramas se encuentran dentro de los límites; enseguida se presenta el heptadecanoico con una abundancia muy baja ya que sólo representa el 2.74, una desviación estándar de 0.46 y un coeficiente de variación de 16.79%, para este el 96.49% de los cromatogramas se encuentran dentro de los límites establecidos.

Después se presentan los dos ácidos grasos menos abundantes que son el octadecanoico con una media de 1.94, una desviación estándar de 0.59, así como un coeficiente de variación de 30.54%, lo cual nos dice que la abundancia de este ácido tiene una variación considerable, para el que un 94.73% de las muestras caen dentro de los límites.

Por último se encuentra el dodecanoico con una abundancia de 1.39, una desviación estándar de 0.65 y un coeficiente de variación de 46.59%, y el 94.73% de los cromatogramas están dentro de los límites establecidos. (Tabla. 3)

TABLA 1. PRINCIPALES ACIDOS GRASOS AISLADOS

IDENTIDAD		
NOMBRE COMUN	ABREVIATURA	NOMBRE SISTEMATICO
ACIDO LAURICO	* C 12:0	DODECANOICO
ACIDO MIRISTICO	* C 14:0	TETRADECANOICO
-----	C 15:0	PENTADECANOICO
ACIDO HIDROXIMIRISTICO	C 14:0 3-OH	3-HIDROXYTETRADECANOICO
ACIDO PALMITOLEICO	C 16:1 ⁹ (Cis)	Cis-9-HEXADECENOICO
ACIDO PALMITICO	* C 16:0	HEXADECANOICO
-----	C 17:0 ^{9,10} (Cis)	Cis-9,10-METILENHEXADECENOICO
-----	C 17:0	HEPTADECANOICO
ACIDO OLEICO	C 18:1 ⁹ (Trans)	Trans-9-OCTADECENOICO
	C 18:1 ¹¹ (Cis)	Cis-11-OCTADECENOICO
ACIDO ESTEARICO	* C 18:0	OCTADECANOICO
-----	C 19:0 ^{9,10} (Cis)	Cis-9,10-METILENOCTADECENOICO

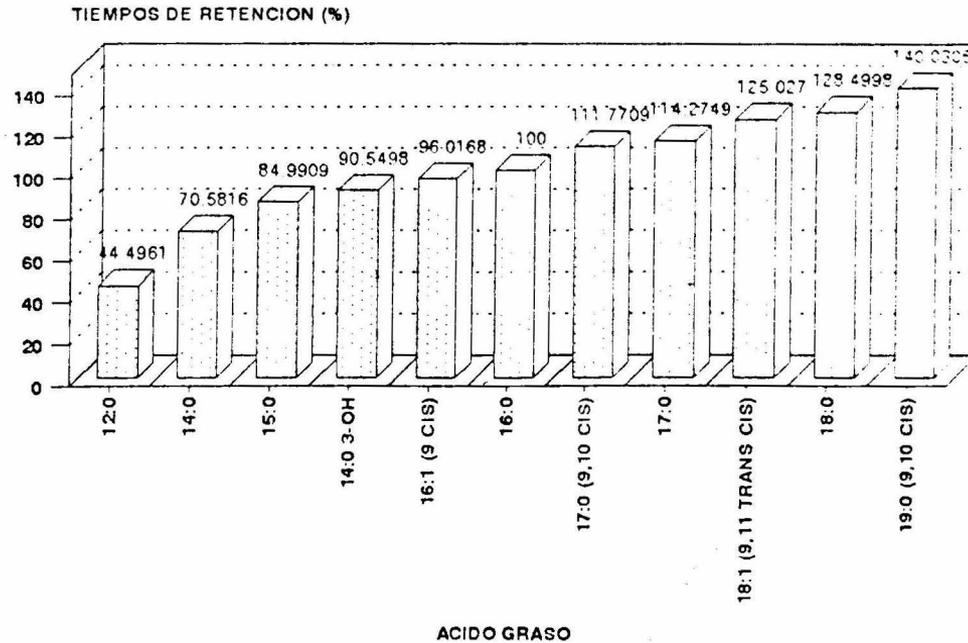
Se muestran los ácidos grasos obtenidos del perfil cromatográfico de Enterobacter agglomerans.

Nota: Los ácidos grasos son enumerados de acuerdo al orden de elución de la columna de cromatografía gas-líquido.

* Característicos de enterobacterias.

Enterobacter agglomerans

ACIDOS GRASOS



Gráfica 1. Medias del tiempo de retención por ácido graso de *E. agglomerans*

TABLA 2. MEDIDAS DESCRIPTIVAS POR ACIDO GRASO (TIEMPOS DE RETENCION)

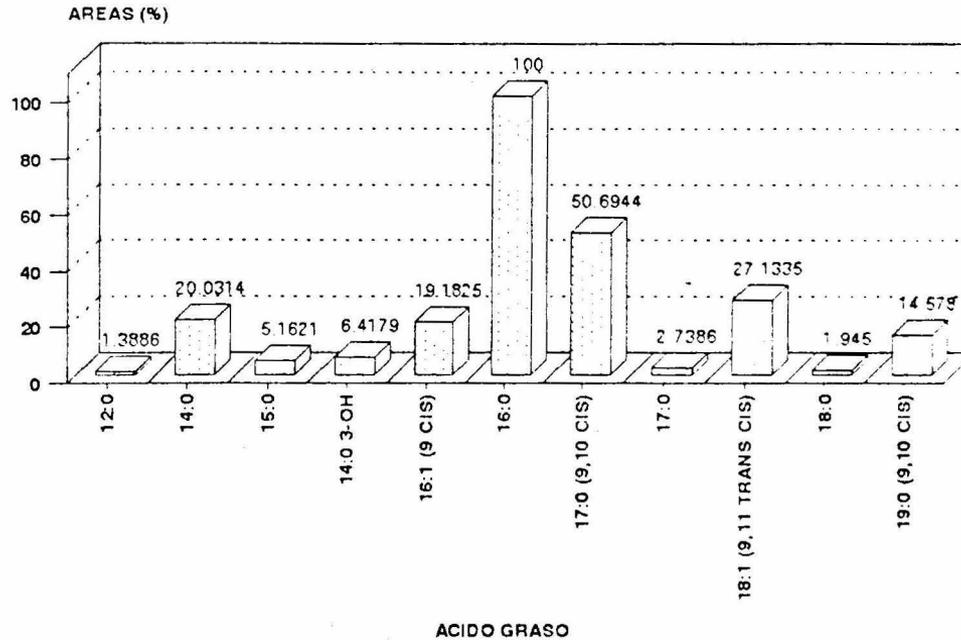
ACIDO	MEDIA	D. EST.	C. V. %	MIN.	MAX.	*L.INF.	*L.SUP.	%D.LIM.
C 12:0	44.50	0.15	0.34	43.77	44.67	44.19	44.79	100.00
C 14:0	70.58	0.12	0.16	70.26	70.74	70.34	70.81	96.49
C 15:0	84.99	0.43	0.50	82.10	85.29	84.13	85.84	98.24
C 14:0 3-OH	90.55	0.20	0.22	90.05	90.99	90.14	90.95	96.49
C 16:1 ⁹ (Cis)	96.02	0.16	0.17	95.61	96.23	95.69	96.33	98.24
C 16:0	100.00	0.00	0.00	100.00	100.00	98.00	100.00	100.00
C 17:0 ^{9,10} (Cis)	111.77	0.12	0.10	111.53	112.09	111.53	112.03	98.24
C 17:0	114.27	0.25	0.22	113.67	114.79	113.76	114.78	94.73
C 18:1 ⁹ (Trans) y 18:1 ¹¹ (Cis)	125.03	0.22	0.18	124.52	125.66	124.58	125.47	96.49
C 18:0	128.50	0.31	0.24	127.75	129.29	127.87	129.12	96.49
C 19:0 ^{9,10} (Cis)	140.03	0.34	0.24	139.33	141.00	139.34	140.71	96.49

Medidas descriptivas del perfil cromatográfico de Enterobacter agglomerans, para los tiempos de retención de cada uno de los ácidos grasos aislados.

* Los límites fueron obtenidos como $\bar{X} \pm 2 (S)$.

Enterobacter agglomerans

ACIDOS GRASOS



Gráfica 2. Medias de las áreas bajo la curva por ácido graso de *E. agglomerans*

TABLA 3. MEDIDAS DESCRIPTIVAS POR ACIDO GRASO (AREAS)

ACIDO	MEDIA	D. EST.	C. V. %	MIN.	MAX.	*L.INF.	*L.SUP.	%D.LIM.
C 12:0	1.39	0.65	46.59	0.47	3.46	0.09	2.68	94.73
C 14:0	20.03	3.50	17.47	14.39	29.15	13.03	27.03	96.49
C 15:0	5.16	1.04	20.16	3.72	7.31	3.07	7.24	98.24
C 14:0 3-OH	6.42	4.33	67.44	1.00	19.10	2.25	15.09	85.96
C 16:1 ⁹ (Cis)	19.18	4.28	22.31	11.35	29.79	10.61	27.75	94.73
C 16:0	100.00	0.00	00.00	100.00	100.00	98.00	100.00	100.00
C 17:0 ^{9,10} (Cis)	50.69	3.07	6.06	42.95	58.07	44.50	56.78	92.29
C 17:0	2.74	0.46	16.79	1.77	3.76	1.82	3.65	96.49
C 18:1 ⁹ (Trans) y 18:1 ¹¹ (Cis)	27.13	5.28	19.46	19.05	41.72	16.58	37.68	94.73
C 18:0	1.95	0.59	30.54	1.01	3.25	0.75	3.13	94.73
C 19:0 ^{9,10} (Cis)	14.58	2.43	16.70	9.95	22.04	9.70	19.44	94.73

Medidas descriptivas del perfil cromatográfico de Enterobacter agglomerans, para las áreas bajo la curva de cada uno de los ácidos grasos aislados.

* Los límites fueron obtenidos como $\bar{X} \pm 2 (S)$.

DISCUSION

Para el análisis de la composición de los ácidos grasos celulares totales de Enterobacter agglomerans se utilizó una columna capilar de sílice fundido, debido a que los isómeros iso y anteiso de los ácidos grasos con la misma longitud de carbonos y también los derivados hidroxilados y metilados presentes en bacterias gram negativas como es el caso del presente análisis, se separan completamente en esta columna.

La separación de los componentes se logró en un tiempo total aproximado de 30 *min*; esta característica de la cromatografía de gases en cuanto a la rapidéz del análisis, es debida primordialmente a la baja densidad del gas acarreador (fase móvil), el cual permitió la difusión rápida del componente vaporizado en la columna, así como el equilibrio casi instantáneo logrado entre las fases, según Dabrio, 1973. (16)

El tiempo de retención es una propiedad característica para cada componente de la muestra, con una fase líquida en condiciones constantes de operación en lo que se refiere a la velocidad del flujo y la temperatura, es lo que se denomina tiempo de retención, que va desde la inyección de la muestra hasta el máximo del pico, como lo reporta González, 1987 (26). El tiempo de retención es primordial y su importancia radica en su utilización para identificar cada componente de la muestra, expresado como un pico en el cromatograma; por lo que este tiempo nos dió la pauta para la identificación de los picos. Esta identificación se hizo comparando el cromatograma de la muestra problema contra un estándar conocido, como lo reporta Mc Nair, 1968 (49), que se inyectó diariamente bajo las mismas condiciones de acondicionamiento del cromatógrafo en las que se analizaron las muestras de E. agglomerans, sin embargo también se tuvo especial cuidado en que la frecuencia de aparición de los picos no variara, lo cual es recomendado por Goran, 1984 (27).

La comparación de los cromatogramas a partir de muestras esterificadas de los ácidos grasos de E. agglomerans, con el perfil de referencia de los ésteres metílicos de los ácidos grasos, permitió la identificación de un total de 11 picos.

Para cada uno de los picos, el tipo de ácidos grasos celulares presentes en E. agglomerans son cadenas lineales saturadas e insaturadas, lo cual es característico de enterobacterias. De los picos presentes, los correspondientes a los ácidos dodecanoico, tetradecanoico,

hexadecanoico y octadecanoico, se han establecido como característicos de la familia *Enterobacteriaceae*, los cuales permiten incluir a *E. agglomerans* dentro de esta según Boe, 1980 (4); Cecchini, 1968 (13) y Häusler, 1985 (31).

Debido a que la técnica utilizada es sensible a los cambios producidos durante su seguimiento, se realizaron estimaciones de valores máximos y mínimos alrededor del porcentaje del valor medio calculado para cada uno de los ácidos grasos eluidos.

Por lo que respecta a los porcentajes de los tiempos de retención se puede hablar en términos generales de los 11 ácidos grasos obtenidos que conforman el perfil lipídico, ya que no se observó traslape de picos y estos fueron perfectamente diferenciados, esta característica se tomó en cuenta basándose en lo reportado por Drucker, 1973 (19), y cada uno de los ácidos se presentó en un tiempo determinado que mantuvo su constancia sin variaciones significativas.

Como de los 11 ácidos grasos identificados, 9 de ellos resultaron con un 95% de cromatogramas dentro de los límites establecidos ($\pm 2 S$) y con un coeficiente de variación alrededor del 20% (tabla 2), se indica una gran homogeneidad de resultados y por lo tanto reproducibilidad de estos.

Esto quiere decir que las condiciones bajo las cuales se manejó el cromatógrafo se mantuvieron homogéneos, permitiendo la migración diferencial entre los componentes; dicha migración depende según Martin, 1986 (47) en gran medida de las diferentes afinidades de los componentes por la fase estacionaria ya que los componentes con mayor afinidad se mueven con mayor lentitud a través de la columna y consecuentemente alcanzan el extremo final después de aquellos con afinidad relativamente menor, sin embargo también hay que tomar en cuenta que el orden de elución de los componentes va en sentido creciente tanto de su peso molecular como de el número de átomos de carbono de la cadena, también se debe tener presente que al llevar a cabo la metilación durante el proceso de esterificación la polaridad de los ácidos grasos aumenta, por lo que aunque tengan el mismo número de carbonos, e incluso menor, aparecen después como es el caso del 3-hidroxitetradecanoico que presenta 14 carbonos y sin embargo aparece después del pentadecanoico que tiene 15, no obstante los ácidos grasos insaturados con isomerías geométricas aparecen antes que los lineales saturados con el mismo número de carbonos.

Por lo que se refiere al análisis cualitativo, el método empleado resulta adecuado ya que se lograron caracterizar 11 ácidos grasos que representan el perfil de E. agglomerans.

No obstante la sola caracterización cualitativa no es del todo suficiente para establecer un perfil lipídico de la especie analizada, por lo que es mejor recurrir a complementar con el análisis cuantitativo donde se asocia la abundancia relativa en términos de su área normalizada.

Las medidas descriptivas permiten establecer el ácido graso hexadecanoico es el que se presenta con mayor abundancia en E. agglomerans.

Los valores del coeficiente de variación permiten determinar que los ácidos 3-hidroxitetradecanoico, dodecanoico y octadecanoico son los que presentan un alto nivel de variación en su abundancia ya que el coeficiente de variación es mayor al 20%, lo que refleja que los datos son muy dispersos; de tal manera, los 8 ácidos grasos restantes se encuentran más estables ya que su coeficiente de variación se encuentra al rededor de este valor. Sin embargo, más del 95% de los cromatogramas caen dentro de los límites establecidos ($\pm 2 S$); a excepción del 3-hidroxitetradecanoico con un 85.96% y del Cis-9-10 metilhexadecenoico.

Según estudios reportados por Goran, 1984 (27); el área del pico depende de la cantidad de muestra inyectada, sin embargo la variación que se presentó no se adjudica a este factor debido a que se mantuvo controlado, y por otra parte la alta variación no se manifestó en todos los cromatogramas ni en todos los picos, sino que solamente son tres ácidos grasos los que varían de manera considerable.

Esta variación se atribuye más que nada a que según la bibliografía reportada por Starr, 1981 (63) y Manual Bergey's, 1984 (42); E. agglomerans es una especie muy heterogénea en lo que respecta a la abundancia de los ácidos grasos celulares y aún presenta problemas en su ubicación taxonómica. Por lo que en otros estudios se recurre a reacciones metabólicas en medios diferenciales.

La extrema variación en la abundancia del 3-hidroxitetradecanoico se explica en relación a lo expuesto en el párrafo anterior y por otra parte se puede relacionar con lo dicho por Tuppie, 1982 (65), quien menciona que la variación en la abundancia de los hidroxiacidos puede explicarse a partir del tipo de columna y el tiempo de uso, ya que en columnas capilares de sílice fundido como la que se utilizó en el presente estudio y

cuyo uso haya sido extensivo, el análisis de los ácidos grasos de enterobacterias se afecta variando los resultados, por lo que es necesario tener muy presente el tiempo de vida media de las columnas.

La mayoría de los ácidos grasos presentes en *E. agglomerans*, son cadenas lineales saturadas, aunque también hay ácidos grasos de cadenas insaturadas, así como metilaciones e hidroxilaciones. Este estudio concuerda con los reportados por Boe (4) y Cecchini (13), que indican la ausencia de cadenas ramificadas, poliinsaturadas y oxigenadas para la familia *Enterobacteriaceae*.

Las cadenas insaturadas de los ácidos grasos del perfil obtenido sólo presentan una doble ligadura, lo cual concuerda con lo reportado anteriormente, esto es característico de las bacterias gram negativas según lo reportado por Boon, 1977 (5); el cual establece que la posición de la doble ligadura se considera necesaria en aspectos de biosíntesis; esta característica se utiliza como guía para la clasificación taxonómica de bacterias.

El análisis por cromatografía gas líquido es una técnica valiosa para caracterizar muchas especies de bacterias como lo reporta Moss, 1982 (56); esto se usa subsecuentemente para ayudar a la identificación y clasificación de una gran variedad de microorganismos, incluyendo miembros de la familia *Enterobacteriaceae*.

Las ventajas de la cromatografía, como lo reporta Martin, 1986 (47), son su sensibilidad extrema, que permite separar mezclas de cantidades muy pequeñas, y el hecho de que las columnas puedan usarse repetidamente, aunque como se dijo con anterioridad se debe tener presente el tiempo de vida media de la columna ya que nos puede llevar a reportar resultados variables; otra de las ventajas que conlleva la cromatografía gas-líquido es la de proponer mayor exactitud en menos tiempo, ya que en la práctica se ha demostrado que los métodos en la identificación bacteriana proveen una amplia información que en ocasiones por razones técnicas y de tiempo no se utilizan totalmente, además de implicar mayor trabajo en el laboratorio según lo reportado por Goodfellow, 1985 (25) y Holmes, 1978 (33), ya que para conocer con precisión las características bioquímicas de una determinada especie es necesario probar muestras amplias y diversas de cepas de acuerdo a lo que reporta Lennette, 1982 (45), y aunque en años recientes se ha hecho un esfuerzo para acelerar y simplificar la identificación introduciendo varios métodos por micropruebas bioquímicas, tales como el sistema comercial API, que permite una automatización parcial de los procesos y la aplicación de métodos por computadora, la identificación aún permanece muy com-

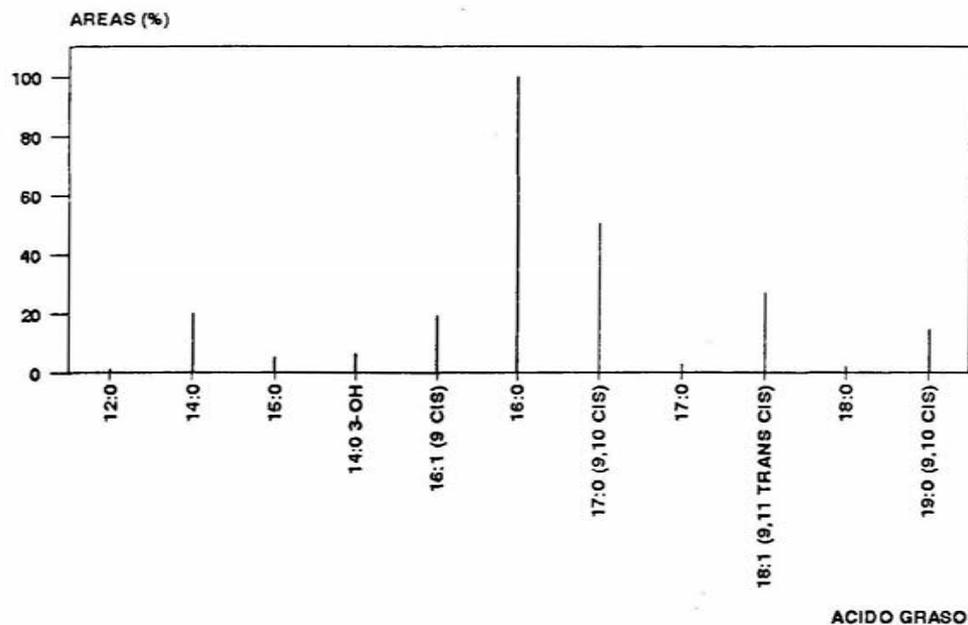
plicada pues se basa en el mismo principio que es la investigación de las propiedades bioquímicas de los microorganismos, es por esto que la ventaja de la técnica por cromatografía de gas-líquido consiste en el análisis principalmente de la composición química de los microorganismos, básicamente ácidos grasos constituyentes de los lípidos de la membrana en las bacterias, haciendo una perfecta separación de los posibles componentes de la muestra analizada, con una mínima demanda de tiempo así como su expresión cuantitativa.

No obstante a que la técnica ya ha sido estandarizada y utilizada en otros laboratorios, cabe mencionar que se debe tener un especial cuidado en el manejo de ésta ya que cada laboratorio tiene sus propias condiciones de trabajo.

Basandose en los estudios reportados por Drucker, 1972 (19) se asevera que el perfil cromatográfico de la composición de los ésteres metílicos de los ácidos grasos en las bacterias representan la "huella digital" de estas.

En los resultados del presente estudio se obtuvo el perfil cromatográfico de E. agglomerans a partir de las 57 repeticiones del análisis y se representa en la Gráfica 3.

Perfil cromatográfico de *Enterobacter agglomerans*



Gráfica 3. Estructura del perfil cromatográfico obtenido con los valores promedio de los tiempos de retención y las áreas bajo la curva.

CONCLUSIONES

I. Los resultados del presente estudio permiten identificar a E. agglomerans a partir de la técnica de análisis de ésteres metílicos de los ácidos grasos por cromatografía de gas-líquido ya que cada microorganismo posee su propia "huella química", que le permite diferenciarse de los otros microorganismos bacterianos.

II. Es importante establecer que el contenido de ácidos grasos de E. agglomerans puede tomarse como criterio taxonómico y utilizarse a nivel de identificación para esta especie de enterobacteria.

III. El presente análisis puede utilizarse en muestras problema de análisis de agua y adaptarlo en un futuro a laboratorios clínicos, y servir como un método reproducible para rutinas de identificación y/o clasificación de E. agglomerans en México.

IV. Hay que considerar que se debe tener un especial cuidado en variables que influyan negativamente en la utilización del método, como condiciones de cultivo bacteriano y proceso cromatográfico. Ya que siempre que existan modificaciones se obtendrán variaciones considerables en la concentración de los ácidos grasos.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Abel, K., De Scchmertzing, H. & Peterson, J. I. 1963. Classification of microorganisms by analysis or chemical composition. I. Easibility of utilizing gas chromatography. J. Bacteriol. **85**: 1039-1044.
- 2.- Ahmad, S., Weisburg, G. W. & Jensen, R. A. 1990. Evolution of aromatic amino acid biosynthesis and application to the fine-tuhed phylogenetic positioning of enteric bacteria. J. Bacteriol. **172**: 1051-1061.
- 3.- Amstein, C. F. & Hartman, P. A. 1973. Differentiation of some enterococci by gas chromatography. J. Bacteriol. **133**: 38-41.
- 4.- Boe, B. & Gjerde, J. 1980. Fatty acid patterns in the classification of some representative of the families Enterobacteriaceae and Vibrionaceae. J. Gen. Microbiol. **116**: 41-49.
- 5.- Boon, J. J., Leew, J. W., Hoek, G. J. & Vasjan, J. H. 1977. Significance and taxonomic value of Iso and Anteiso monoenoic fatty acids and branched α -hydroxy acids in Desulfovibrio desulfuricans. J. Bacteriol. **129** (3): 1183-1191.
- 6.- Bousfield, I. J., Smith, G. L., Dando, T. R. & Hobbs, G. 1983. Numerical analysis of total fatty acid profiles in the identification of coryneform, nocardioform and some other bacteria. J. Gen. Microbiol. **129**: 375-394.
- 7.- Brian, B. L. & Gardner, E. W. 1967. Preparation of bacterial fatty acid methyl esters for rapid characterization by gas liquid chromatography. Appl. Microbiol. **15**: 1499-1500.
- 8.- Brooks, J. B., Moss, W. C. & Dowel, V. R. 1969. Differentiation between Clostridium sordelii and Clostridium bifermentans by gas chromatography. J. Bacteriol. **100**: 528-539.

- 9.- Brooks, J. B., Kellogg, D. S., Thacker, L. & Turner, E. M. 1971. Analysis by gas chromatography of fatty acids found in whole cultural extracts of Neisseria species. Can. J. Microbiol. 17: 537-543.
- 10.- Brondz, I., Olsen, I. & Sjm, M. 1989. Gas chromatography assessment of alcoholized fatty acids from yeasts: a new chemotaxonomic method. J. Clin. Microbiol. 27: 2815-2819.
- 11.- Burrows, W., 1974. Tratado de microbiología. 20^a Ed. Interamericana. México.
- 12.- Carpenter, P., 1979. Microbiología. 4^a Ed. Interamericana. México.
- 13.- Cecchini, G. L. & O'brien, R. T. 1968. Detection of Escherichia coli by gas chromatography. J. Bacteriol. 95: 1205-1206.
- 14.- Clark, A. J., Burger, A. C. & Sabatinos, E. L. 1982. Characterization of indicator bacteria in municipal raw water, drinking water and new main samples. Can. J. Microbiol. 28: 1002-1013.
- 15.- Cronan, J. E., 1975. Thermal regulation of the membrane lipid composition of Escherichia coli. J. of Biol. Chem. 250:7074-7077.
- 16.- Dabrio, M. V. 1973. Cromatografía de gases II. 1^a Ed. Alhambra. Madrid.
- 17.- De Simón Serra, M., Ferrer, E. D., Dericos, B. E. & Fernández, P. F. 1986. Study of microbiological contamination of cacao derived and products. Ann. Bromatology. 37: 341-349.
- 18.- Drucker, D. B., Griffith, C. J. & Melville, T. H. 1973. Fatty acids fingerprints of Streptococcus mutans grown in chemostat. Microbios. 7:17-23.
- 19.- Drucker, D. B. et al. 1972. The Identification of Streptococci by

gas-Chromatography. Microbios, 5: 109-112.

- 20.- Edwards, P. R. & Ewing, W. H. 1962. Identification of Enterobacteriaceae. 2nd Ed. Burgess Publishing Co. Mineapolis Minn.
- 21.- Eerola, E. & Lehtonen, O. 1988. Optimal data processing procedure for automatic bacterial identification by gas-liquid chromatography of cellular fatty acids. J. Clin. Microbol. 9: 1745-1753.
- 22.- Gehrke, C. W. & Goerlitz, D. F. 1963. Quantitative preparation of methyl esters of fatty acids for gas chromatography. Analyt. Chem. 35: 76-80.
- 23.- Glass, R. L. 1971. Alkohlisis, Sapopnification and preparation of fatty Acids Methyl Esters. Lipids, 6. 919.
- 24.- Goodfellow, M. & Board, R. G. 1980. Microbiological classification identification. Acad. Press. London.
- 25.- Goodfellow, M. & Minnikin, D. E. 1985. Introduction to chemosystematics. In chemical methods in bacterial systematics, p. 1-15. Edited by M. Goodfellow & D. E. Minnikin. Academic Press. London & New York.
- 26.- González, A. M. 1987. Fundamentos teóricos y principios de la cromatografía en fase de vapor. Proyecto de Conservación y Mejoramiento del Ambiente (CyMA). ENEP-Iztacala. UNAM. México.
- 27.- Goran, O. L. & Anders, M. 1984. Gas chromatography, mass spectrometry applications in microbiology. Plenum Press. New York.
- 28.- Gottschalk, G. 1979. Bacterial metabolism. Springer Verlag Ed. New York.

- 29.- Gurr, M. I. & James, A. T. 1980. Fatty acids, In Lipid Biochemistry: and introduction. p. 18-88. Chapman & Hall, New York.
- 30.- Häusler, J. & Richter, V. 1983. A process of identification microorganism using chromatography. UKpatent application GB 2 121-434 A.
- 31.- Häusler, J. & Richter, V. 1985. Identification of bacteria of famiiy Enterobacteriaceae by gas chromatography. Separaum, Publishing House of the Hungarian Academy of Sciences. Budapest.
- 32.- Häusler, J. & Richter, V. 1989. Identification of Pseudomonads Insolated from water by chromatography. V Curso Simposio Internacional sobre Biología de la contaminación. UNAM, ENEP- IZTACALA, SEDUE, IPN. México.
- 33.- Holmes, B., Willcox, W. R. & Lapage, S. P. 1978. Identification of Enterobacteriaceae by the API 20E System. J. Clin. Pathol. **31**: 22-30.
- 34.- James, A. T. & Martin, J. P. 1956. Gas-liquid chromatography: The gas-density meter, a new apparatus for the detection of vapours in flowing gas streams. J. Biochem. **63**: 138-143.
- 35.- James, A. T. & Martin, J. P. 1956. Gas-liquid chromatography: The separation and identification of methyl esters of saturated and unsaturated acids from formic acid to n-octadecanoic acid. J. Biochem. **63**: 144-152.
- 36.- Janzen, E., 1984. Analysis of cellular components in bacterial classification and diagnosis, p. 257-302. In G. Odhan L. Larson, and P. A. Mardh (ed.), Gas chromatography mass spectrometry applications in microbiology. Plenum Publishing Corp., New York.
- 37.- Johnson, L. L., McFarland, L., Dearing, P., Raisys, V. & Shoenknecht,

- F. D. 1989. Identification of Clostridium difficile in stool specimens by culture-enhanced gas-liquid Chromatography. J. Clin. Microbiol. **27**: 2218-2221.
- 38.- Kaneda, T., 1962. Biosynthesis of branched chain fatty acids: Isolation and Identification of fatty acids from Bacillus subtilis ATCC 7059. J. Biol. Chem. **238**: 1222-1228.
- 39.- Kaneda, T., 1967. Fatty acids in the genus Bacillus: Iso and anteiso fatty acids as characteristic constituents of lipids in 10 species. J. Bacteriol. **93**: 894-903.
- 40.- Kaneda, T., 1971. Factors affecting the relative ratio of fatty acids in Bacillus cereus. Can J. Microbiol. **17**: 269-275.
- 41.- Kramer, T. & Nickerson, W. K. 1984. Prevalence of extreme detergent resistance among the Enterobacteriaceae. Can J. Microbiol. **30**: 711-713.
- 42.- Krieg, N. R. 1984. Bergey's manual of systematic Bacteriology. 9th Ed. 1-5: Williams & Wilkins.
- 43.- Lapage, S. P., Rowe, B., Holmes, B. & Gross, R. J. 1979. Biochemical Identification of Enterobacteriaceae. p. 123-141. Edit. by Skinner F. A. & Lovelock D. W. in Identification for microbiologist. Academic Press Inc. London.
- 44.- Lehninger, A. L. 1979. Bioquímica. 2^a Ed. ENUSA. Barcelona.
- 45.- Lennette, E., et al. 1982. Microbiología clínica. 3^a Ed. Panamericana. Buenos Aires.
- 46.- Lorraine, S. A., 1980. Fundamentos de microbiología. EUNSA. Barcelona.
- 47.- Martin, W. D., Mayes, A. P., Rodwell, W. V. y Granner, K. D. 1986. Bio-

- 48.- Matsuyama, T., Kaneda, K., Ishizuka, I., Toida, T. & Yano, I. 1990. Surface active novel glycolipid and Linked 3-hydroxy fatty acids produced by Serratia rubidaea. J. Bacteriol. **172**: 3015-3022.
- 49.- Mc Nair, H. M. & Bonelli, E. J. 1968. Basic gas chromatography. Varian Co. Consolidate Printers, Berkeley, California 123-125.
- 50.- Mitruka, B. M., Jonas, A. M. & Kunderagi, R. S. 1973. Rapid differentiation of certain bacteria inmixedpopulations by gas-liquid chromatography. Yale. J. Biol. and Med. **46**: 104-112.
- 51.- Monson, S. R. & Shelton, C. F. 1974. Fundamentals of organic Chemistry. McGraw Hill. Kogakusha. 300.
- 52.- Monteoliva-Sanchez, M., Ferrer, M. R., Ramos, C. A., Quesada, E. & Monteoliva, M. 1988. Cellular fatty acid composition of Deleya halophila: effect of growth temperature and salt concentration. J. Gen. Microbiol. **134**: 199-203.
- 53.- Moss, C. W., Samuels, S. B., Liddle, J. & McKinney, R. M. 1988. Ocurrence of branched-chain hydroxy fatty acids in Pseudomonas malthophilia. J. Bacteriol. **114**(3): 1018-1024.
- 54.- Moss, C. W. & Dees, S. B. 1975. Identification of microorganisms by gas chromatographic-mass spectrometric analysis of cellular fatty acids. J. Chromatogr. **112**: 595-604.
- 55.- Moss, C. W., Dees, S. B. & Guerrant, G. O. 1980. Gas-liquid chromatography of bacterial fatty acids with a fused-silica capillary column. J. Clin. Microbiol. **12**: 127-130.
- 56.- Moss, C. W. & Montiel, N. L. 1982. Analysis of short-chain acids from bacteria by gas-liquid chromatography with a fused-silica capillary column. J. Clin. Microbiol. **15**: 308-311.

- 57.- Okuyama, H., Sasaki, S., Higashi, S. & Murata, N. 1990. A trans-unsaturated fatty acid a psychrophilic bacterium. Vibrio sp. strain ABE-1. J. Bacteriol. 172: 3515-3518.
- 58.- O'Leary, W. W. 1962. The fatty acids of bacteria. J. Bacteriol. 26: 421-447.
- 59.- Rasoamanjara, D., Peladan, F., Turlot, C. J., Monteil, H. & Richard, C. 1986. Characterization of Flavobacterium species by analysis of volatile fatty acids production. J. Gen. Microbiol. 132: 2723-2732.
- 60.- Schleifer, K. H., et al. 1983. Molecular systematics of prokaryotes. Ann. Rev. Microbiol. 37: 143-171.
- 61.- Sénez, J. C., 1976. Microbiología general. 1ª Ed. Alhambra. Madrid.
- 62.- Stainer, R., et al. 1986. Microbiología. 4ª Ed. REPLA. Barcelona.
- 63.- Starr, M. P., Stolp, H., Tripper, H. G., Balows, A., & Shlegel, G. H. 1981. The prokaryotes; A handbook on habitats, isolation and identification of bacteria. Springer-Verlag. New York.
- 64.- Storch de Gracia, J. M. 1975. Fundamentos de cromatografía de gases. 2ª Ed. Alhambra. Madrid.
- 65.- Tuppie, M. L. 1982. Single derivation method for routine analysis of bacterial whole-cell fatty acid methyl esters, Including Hydroxy Acids. J. Clin. Microbiol. 16:584-586.
- 66.- Veys, A., Callewaert, W., Waelkens, E. & Van Den Abbeele, K. 1989. Application of gas-liquid chromatography to the routine identification of nonfermenting gram-negative bacteria in clinica specimenens. J. Clin. Microbiol. 7: 1538-1542.

67.- Verhulst, A., Van Hespén, H., Symons, F. & Eyssen, H. 1987. Systematic Analysis of the long-chain components of Eubacterium lentum. J. Gen. Microbiol. 133: 275-286.