



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
" I Z T A C A L A "

ANALISIS DE LOS ESTERES METILICOS DE LOS
ACIDOS GRASOS CELULARES DE Enterobacter
aerogenes POR CROMATOGRAFIA GAS-LIQUIDO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A

ADRIANA MONICA CERERO CRUZ



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.

Director de tesis:

Dr. Victor Rivera Aguilar.

A quien agradezco el interés y el apoyo mostrado durante el desarrollo del presente trabajo, así como el haberme brindado su amistad.

Agradezco los comentarios y sugerencias de:

Q.F.B. Esperanza Robles Valderrama.

M. en C. Pedro Ramirez.

Biol. José Luis Muñoz.

Q.R.B. Irma Delfín.

Con todo mi cariño y con el
más hermoso recuerdo de ellos.

A la memoria de :

Román Cruz y

Melesio Cerero.

A mis padres:

Elfego Cerero Hernández y

Esperanza Cruz de Cerero

Por que ellos son la luz de mi
camino y la fuerza que me impulsa
a salir a adelante.

Gracias por su amor y su
confianza, los quiero mucho.

A mis hermanos :

Jorge, Edith y Victor

de quienes he recibido apoyo
y mucho amor, por lo que este
logro también es suyo.

A Leticia Avila Valdés, con quien he compartido muchos momentos, y con quien comparto una amistad que va más allá de la compañía y el cariño. Gracias por todo tu apoyo y comprensión.

Este trabajo también es dedicado a dos grandes amigas: Lourdes Hernández e Isaura Yáñez, con quienes compartí grandes momentos durante toda la carrera; esperando que nuestra amistad sea perdurable.

Las quiero mucho.

A las compañeras y amigas de laboratorio: Emelia, Blanca, Lupita y Diana; por su amistad y su alegría, haciendo más agradable el trabajo en el laboratorio.

Mi agradecimiento a la Dr. Josefina Torres, por su ayuda y su apoyo incondicionales. La recuerdo siempre con cariño.

A mis amigos: Marco Antonio, Rodolfo, Francisco, Manuel Arturo, Jorge y Rosa Martha, esperando verlos muy pronto alcanzar esta meta.

Un reconocimiento especial a:

I. Q. Gabriel Cortés Torreblanca

A quien agradezco su apoyo brindado en todo momento, sin el cual hubiera sido imposible conseguir esta meta; esperando seguir contando con su amistad.

ANALISIS DE LOS ESTERES METILICOS

DE LOS ACIDOS GRASOS CELULARES DE

Enterobacter aerogenes POR CROMATOGRAFIA GAS-LIQUIDO

INDICE

1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	2
2.1. Características del grupo.....	3
2.2. Importancia clínica del grupo.....	4
2.3. Lípidos en la célula bacteriana.....	5
3. Antecedentes.....	8
4. Objetivos.....	11
5. Métodos.....	12
5.1. Organismos y condiciones de cultivo.....	12
5.2. Liofilización.....	13
5.3. Esterificación y extracción de los ácidos grasos.....	14
5.4. Análisis de los ácidos grasos esterificados.....	15
5.5. Análisis estadístico.....	16
5.5.1. Normalización.....	16
6. Resultados.....	19

7. Discusión.....	32
8. Conclusiones.....	37
9. Bibliografía.....	39

El presente trabajo de tesis forma parte de la línea de investigación : Identificación de bacterias por cromatografía, de gases que se está desarrollando en el laboratorio de Bacteriología del Proyecto de Conservación y Mejoramiento del Ambiente (CyMA), que se ubica en la Unidad de Investigación de la E. N. E. P. Iztacala-UNAM.

El objetivo principal de esta investigación es la determinación de los ácidos grasos celulares de la especie Enterobacter aerogenes (ATCC 13048) usando para este fin el método analítico de la cromatografía gas-líquido y como carácter taxonómico el contenido de sus ácidos grasos.

El método de la cromatografía gas-líquido se basa en la retención, relación y concentración de los ácidos grasos contenidos en la célula bacteriana. Los ácidos determinados en forma de ésteres metílicos son comparados contra un patrón o estándar constituido por una mezcla de ésteres metílicos de ácidos grasos bacterianos, bajo las mismas condiciones de operación, tomando como base la comparación entre los tiempos de retención de los ácidos grasos de Enterobacter aerogenes, obtenidos a través de una previa liofilización y esterificación, con el estándar.

El análisis cromatográfico dió como resultado una serie de cromatogramas característicos de Enterobacter aerogenes observándose la presencia de 12 ácidos grasos celulares permitiendo diferenciarla de una manera clara y precisa de otras especies bacterianas.

En los últimos años se han incrementado los problemas de contaminación causadas por microorganismos, por lo tanto, la importancia que éstos tienen como agentes contaminantes recae en los problemas que causan en la industria alimentaria y farmacéutica, entre otras, además de encontrarse en cuerpos de agua tanto recreacionales como residuales. En el caso particular de las bacterias, el desarrollo y la transferencia de la tecnología en nuestro país abre las puertas para incrementar la investigación bacteriológica dentro de las áreas: clínica (epidemiológica y sanitaria), alimenticia, agrícola y ecológica (agua, tierra y aire). Es así, que los procesos de identificación tradicionales se están sustituyendo por métodos que requieren de menor tiempo en el proceso, siendo la cromatografía de gases uno de los métodos que ofrecen mejores resultados, así como uno de los más utilizados.

La identificación y clasificación de las bacterias es uno de los problemas que ofrecen mayor dificultad en la microbiología, pues mientras en la mayoría de los grupos la identificación se basa en las características más fácilmente observables en las bacterias este criterio no es satisfactorio. En la actualidad la taxonomía de bacterias se basa en atributos funcionales y en la práctica se ha demostrado que si bien los métodos de identificación bioquímica proveen una amplia información, en ocasiones por razones técnicas y de tiempo no se utilizan totalmente, además implican mayor trabajo de laboratorio con mayor consumo de tiempo en el proceso, sobre todo en sectores como el clínico, el de ingeniería sanitaria, el de análisis de calidad del agua y la industria alimentaria; es así que se han desarrollado métodos alternativos como la quimiotaxonomía, la cual proporciona ventajas como: menos tiempo, métodos más sencillos y mayor exactitud. Hasta ahora se han realizado diversos trabajos sobre quimiotaxonomía de

diferentes géneros y especies de la familia Enterobacteriaceae, así como de otras familias como son: Pseudomonadaceae, Vibrionaceae y algunas levaduras (7, 9, 10, 14, 19, 29, 52), analizándose con mayor frecuencia moléculas de primordial importancia como son los polisacáridos, aminoácidos y en especial los diferentes lípidos. La técnica que ha demostrado ser más promisoría en la identificación y clasificación de bacterias, a través de la determinación de sus ácidos grasos, es la cromatografía de gases. Esta técnica consiste en la separación de los componentes volátiles de una mezcla, por medio de la elución de éstos a través de una columna capilar de sílice fundido (20, 21, 25).

2.1. CARACTERISTICAS DEL GRUPO.

Los microorganismos de la familia Enterobacteriaceae son bacilos facultativos Gram negativos que fermentan la glucosa. Son oxidasa negativos, reducen los nitratos a nitritos (excepto algunas especies de los géneros Enterobacter y Klebsiella) y no requieren cloruro de sodio para su desarrollo (40). Las bacterias entéricas son no esporuladas, anaerobias y aerobio facultativas. Algunas forman cápsula y otras como Enterobacter producen con frecuencia un mucilago flácido. La mayoría de las bacteria entéricas son móviles debido a la presencia de flagelos peritricos. El tamaño de las células aisladas varía un poco, pero está dentro del intervalo de 1.0 a 1.5 X 2.0 a 6.0 μm y aparecen en parejas o aisladas (23).

La mayoría de las enterobacterias se desarrollan en los medios comunmente empleados en laboratorios de microbiología clínica, utilizando una única fuente de carbono. Algunas muestras con enterobacterias requieren ser cultivadas en agar chocolate o en agar sangre (40). La glucosa es utilizada de manera fermentativa con formación de ácido o de ácido y gas; además dan una reacción negativa a la oxidasa (21).

Los miembros de la familia Enterobacteriaceae se identifican por pruebas bioquímicas que se efectúan a través de diversos métodos, incluyendo una gran variedad de sistemas comerciales. Las pruebas de fermentación de adonitol, arginina dihidrolasa, utilización de citrato, DNasa, gas a partir de glucosa, ácido sulfúrico, producción de indol, lisina descarboxilasa, fenilalanina desaminasa, fermentación de sacarosa, ureasa y Voges-Proskauer son suficientes para la identificación de la mayoría de los aislamientos a nivel de género y de especie (40).

El género Enterobacter es un grupo homogéneo de microorganismos. La mayoría de las especies de Enterobacter se caracterizan por pruebas positivas para citrato, gas a partir de glucosa, ornitina descarboxilasa, Voges - Proskauer y fermentación de sacarosa y otros azúcares (40).

Enterobacter aerogenes se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza; se considera no patógena, con frecuencia inmóvil y por lo general encapsulada. Al contrario de otros microorganismos del mismo grupo, la prueba de rojo de metilo es negativa y la de Voges - Proskauer es positiva; utiliza los citratos como única fuente de carbono, produce indol en caldo peptona, fermenta la glucosa, la galactosa, la lactosa, la levulosa, la arabinosa, la maltosa, la rabinosa y el inositol con producción de ácido y gas; no licúa la gelatina y se desarrolla de manera aerobia a una temperatura de 30 °C. (13).

2.2. IMPORTANCIA CLINICA DEL GRUPO.

Las enterobacterias están ampliamente distribuidas en plantas, en suelos, en el intestino humano y en animales de sangre caliente. Se encuentran asociadas a muchos tipos de enfermedades e infecciones

humanas: abscesos, neumonía, meningitis, septicemia e infecciones intestinales, urinarias y de heridas. Las enterobacterias son un componente intestinal normal, pero son poco frecuentes en otros órganos del ser humano. Algunas personas enfermas son infectadas con frecuencia por enterobacterias, siendo una causa importante de infecciones intrahospitalarias, constituyendo el 80 % de los aislamientos significativos de bacilos Gram negativos y el 50 % de todos los aislamientos clínicos significativos (40).

Enterobacter aerogenes se encuentra en la leche, en los granos de algunos cereales y en el conducto intestinal. Son raras las veces que se encuentra como agente infeccioso en la comunidad y pueden ser responsables de varias infecciones nosocomiales asociadas a hospitales (13, 23).

2.3 LÍPIDOS EN LA CELULA BACTERIANA.

La célula bacteriana, tiene una composición bioquímica muy característica en donde el agua es el mayor componente de la masa celular (3, 50, 51). La detección de componentes únicos y la medición de la proporción relativa de las sustancias comunes se incrementa como una herramienta más en la identificación y clasificación de bacterias y otros microorganismos como amibas, hongos y algas (18, 30, 38, 44).

Los lípidos son insolubles en agua y solubles en solventes orgánicos. Los lípidos se han subdividido arbitrariamente en saponificables y no saponificables, los primeros son por lo general ésteres carboxílicos del glicerol, los cuales son rápidamente hidrolizados; los lípidos no saponificables no se hidrolizan y generalmente no son ésteres. Los saponificables son subdivididos en lípidos simples (grasas y ceras) y lípidos complejos (fosfolípidos, lipopolisacáridos y lipoproteínas)

(14, 24) . Los lípidos salvo pocas excepciones, no forman polímeros y no son exactamente clasificados como macromoléculas. Las grasas son químicamente glicerol ésteres de ácidos grasos (33) .

Los lípidos y los ácidos grasos celulares se encuentran en todos los microorganismos, excepto en cierto tipo de virus. Este tipo de compuestos están presentes en las bacterias y se han analizado por cromatografía de gases, más que otro tipo de componente bioquímico, debido a su estabilidad y abundancia en la pared celular (26, 42, 49).

Los componentes lipídicos que actualmente son analizados por cromatografía de gases, son los ésteres metílicos de los ácidos grasos o menos frecuentemente los ácidos grasos libres, triglicéridos, aldehídos grasos, alcanos y esteroides (1, 33, 46). Esta técnica ha sido aplicada a células bacterianas, ya que presentan una composición química muy similar; es característica en ellas la presencia de hidrógeno, carbono y nitrógeno, aunque en menor proporción incluyen elementos como sodio, potasio, calcio, magnesio y algunos metales como zinc y manganeso. Por otro lado la composición de los ácidos grasos celulares es una característica estable, ya que siempre se encuentran presentes sin sufrir alteraciones, obteniéndose así resultados muy confiables en el análisis cromatográfico; y aunque las bacterias sufren alteraciones genéticas, la composición de sus ácidos grasos tiende a conservarse (2, 5, 17, 28, 50, 51).

El análisis de los lípidos por cromatografía gas-líquido en la actualidad está bien establecido en la taxonomía bacteriana y ha provisto de características para la clasificación e identificación de muchos géneros de bacterias como lo indican Athayle (6), siendo necesaria una alta selectividad y sensibilidad en este tipo de métodos. La cromatografía de gases es una herramienta ideal para detectar ácidos grasos bacterianos y una gran cantidad de productos metabólicos con una mínima cantidad de muestra, lo cual constituye una ayuda invaluable en

la clasificación y en el establecimiento de relaciones taxonómicas de microorganismos. El uso de este método se extiende cada día más debido a que es una rutina rápida e invaluable para la clasificación , otra ventaja es la alta sensibilidad y especificidad obtenidas en los resultados en corto tiempo, así como la posibilidad para muchos laboratorios de usar este procedimiento, ya que en la práctica se ha demostrado que los métodos de identificación bacteriana proveen una amplia información que por razones técnicas y de tiempo implican mayor trabajo en el laboratorio, sin embargo la utilización de pruebas bioquímicas sigue siendo extensiva, y aunque se han acelerado los procesos de identificación a través de micropruebas bioquímicas y una gran variedad de sistemas comerciales (como el API) la identificación aún es complicada, pues en el fondo se utiliza el mismo principio , es por esto que el método de identificación por cromatografía de gases de ácidos grasos y productos metabólicos se ha constituido como una herramienta útil para la identificación de microorganismos.

El análisis de los ésteres metílicos de los ácidos grasos en bacterias por cromatografía de gases se esta utilizando en la actualidad como un método taxonómico aplicando siempre nuevos avances en las columnas cromatográficas eincrementando así la sensibilidad y resolución en estas separaciones.

James y Martin son los primeros investigadores en trabajar sobre cromatografía de gases en 1956, desarrollando un detector de alta sensibilidad en la separación de compuestos químicos (32). También en ese mismo año, James y Martin son los primeros en realizar un análisis por cromatografía gas-líquido para determinar ácidos grasos bacterianos (35). Abel *et al* en 1963 (1) introducen la técnica de cromatografía gas-líquido para determinar especies de la familia Enterobacteriaceae. Para 1967 Kaneda (35) estudia la producción de ácidos grasos de diferentes especies del género Bacillus por cromatografía gas-líquido. En 1968 Cecchini y O'Brien (14) ayudan a diferenciar Escherichia coli de otras bacterias, por cromatografía de gases. Por su parte Brooks *et al* en 1969 (11) hacen una diferenciación entre Clostridium sordelli y Clostridium bifermentans a través de esta técnica. Moss *et al* en 1970 (43) examinan los ácidos grasos presentes en Neisseria gonorrhoeae y Neisseria meningitis. De manera similar Brooks *et al* realizan un análisis "por cromatografía de gases de diferentes especies de Neisseria (12). En 1973, Amstein y Hartman determinan la composición de los ácidos grasos de algunos enterococos por cromatografía de gases (5). Druker en 1974 (19) realiza un estudio quimiotaxonomico y estadístico de Streptococcus salivarius. En 1975 (45) Moss *et al*, identifican diferentes especies de Pseudomonas, a través de la técnica de cromatografía de gases: apoyándose en la espectrometría de masas. La identificación de bacterias por el sistema de identificación bioquímica comercial API 20E se establece por Holmes *et al* en 1978 (31), el cual consiste en la respuesta, positiva o negativa que dan los microorganismos ante medios enriquecidos. Posteriormente, en un intento por establecer la taxonomía de la familia Enterobacteriaceae, Brian y Gardner en 1967 (9), Cronan en 1975 (16), Gehrek y Goerlitz en 1963 (24), Boe y Gjerde en

1980 (7), Hausler y Richter en 1983 (29) y Veys *et al* en 1989 (52) , utilizan la cromatografía de gases para identificar y esclarecer la composición taxonómica de diversas especies y géneros de enterobacterias. Moss *et al* en 1980 (47) estudian los ácidos grasos de dos especies de Propionibacterium por cromatografía de gases utilizando una columna capilar de sílice fundido. En 1982, Moss y Nuñez-Montiel realizan de nuevo un estudio de ácidos grasos con la misma técnica en una cepa de Clostridium difficile (44) . En ese mismo año, Moss *et al* realizan un estudio de la composición de los ácidos grasos celulares de algunas levaduras (46). Para 1983, Bousfiel *et al* (8) realizan un análisis numérico total de los ácidos grasos para la identificación de bacterias corineformes, nocardioformes y otro tipo de bacterias. Lambert y Moss en 1983 (37) realizan una comparación de los ácidos grasos celulares de diferentes especies de bacterias con base en una hidrólisis alcalina, hidrólisis ácida y metanólisis ácida: procesos utilizados para obtener los ácidos grasos. Athayle *et al* en 1985 (6) realizan un análisis de los ácidos grasos para la identificación de bacterias corineformes de importancia médica. Más adelante , en 1988 (42) Monteoliva-Sánchez *et al* estudian el efecto de la temperatura y la concentración de sales en el crecimiento y producción de los ácidos grasos de Deleya halophyla. Por su parte en ese mismo año Eerola y Lehtonen, utilizan la cromatografía de gases para determinar la composición de los ácidos grasos celulares de bacterias de importancia clínica, apoyándose en un sistema de identificación automatizado (22).

Durante 1989 hay una gran producción de trabajos, en relación a la cromatografía de gases, tal es el caso de Johnson *et al* (34) quienes desarrollan un método de alta sensibilidad para la identificación de Clostridium difficile, basado en la detección de productos metabólicos de este organismo, por cromatografía de gases. Por su parte, Brondz *et al* (10) llevan acabo un método alternativo de quimiotaxonomía para la determinación de ácidos grasos de levaduras. Así mismo, Larson *et al* (39) realizan un estudio para la determinación de lípidos característicos de micobacterias por cromatografía de gases a través de un detector de

captura de electrones; en ese mismo año Cookson *et al* realizan un estudio cuantitativo y cualitativo de los ácidos grasos celulares de Streptococcus milleri por cromatografía de gases en columna capilar (15).

En 1990. Okuyama *et al* (48) determinan el nivel de ácidos grasos insaturados de Vibrio sp cepa ABE-1; Matsuyama *et al* (41) analizan los niveles de glucolípidos y la producción de los ácidos grasos de Serratia rubidea. y Amhad *et al* (2) realizan un árbol filogenético del conjunto de bacterias entericas considerando la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos.

La utilización de diversas técnicas hace necesario que el trabajo se estandarice para poder automatizar totalmente los métodos de identificación y clasificación de bacterias: ya que a pesar que la cromatografía de gases de ácidos grasos celulares en bacterias tiene más de treinta años de desarrollo, aún no existe una técnica universalmente aceptada (29, 31).

4.

OBJETIVOS.

- Determinar los ácidos grasos celulares de Enterobacter aerogenes.
- Establecer el perfil cromatográfico de los ácidos grasos celulares en la especie Enterobacter aerogenes, como una contribución a la construcción de un banco de datos para la identificación y clasificación de las enterobacterias de interés sanitario y clínico en México.

5.1. ORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.

La bacteria utilizada en el presente trabajo proviene directamente de la American Type Culture Collection (ATCC) Rockville, Md. (4), la cual se encuentra depositada en custodia en el Laboratorio de Cultivos Microbianos del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), lo anterior con el fin de garantizar la visibilidad y estabilidad genética de la cepa a trabajar.

Una vez obtenida la cepa bacteriana, se procedió a realizar un aislamiento a partir del cultivo puro, haciéndose crecer en dos cajas Petri con medio de agar nutritivo DIFCO lote 50922 , con el fin de obtener un crecimiento abundante del microorganismo. La inoculación en las cajas petri se hizo a partir de un tubo de agar inclinado que contenía la cepa bacteriana pura. Las cajas Petri se incubaron a 37 °C por 24 horas, obteniéndose así la cepa en etapa exponencial: después de obtenerla, se procedió a la preparación de la biomasa, utilizando dos cajas petri con agar nutritivo por muestra . Cada caja contenía 25 ml de agar nutritivo, preparado según las indicaciones del fabricante. El medio sin inocular se sometió a prueba de esterilidad a 37°C por 24 horas. Posteriormente se procedió a inocular las cajas Petri, con la cepa , incubándose a 37 °C por 24 horas.

Debido a que la cantidad de biomasa obtenida, por muestra, debía pesar aproximadamente 20 mg ,la inoculación se hizo por estria sobre toda la superficie del agar.

Una vez obtenida la biomasa se procedió a la cosecha de la misma, realizándose en primer lugar el lavado de la superficie del medio de cultivo, agregando a éste 5 ml de solución de formaldehído al 0.5 % , esto con el fin de fijar a la bacteria. El desprendimiento celular se realizó con la ayuda de una varilla de vidrio previamente esterilizada. La suspensión celular obtenida fue vaciada directamente en tubos de centrifuga, utilizando un embudo para cada cepa. Los tubos de centrifuga fueron previamente lavados con hexano, con el fin de eliminar las grasas presentes.

El contenido de cada tubo fue centrifugado a 15 000 rpm , durante 10 minutos a una temperatura de 4 °C, repitiéndose la operación tres veces. Después del primer centrifugado, el sobrenadante se desechó cuidadosamente. Para los siguientes dos lavados se agregó 5 ml se solución fisiológica (NaCl al 0.85 %) a cada tubo., agitando con la ayuda de un vórtex.

Para la obtención de la materia seca por liofilización, se transfirió la pastilla del tubo de centrifuga a tubos de vidrio, previamente lavados con hexano, dicha transferencia se realizó con la ayuda de una cucharilla de metal, lavada con hexano, repartiendo la biomasa sobre las paredes del tubo de vidrio, con el propósito de obtener un secado más eficiente y rápido durante la liofilización. Los tubos de vidrio permanecieron cerrados en todo momento, para evitar cualquier posible contaminación, hidratación u oxidación de los ácidos grasos.(29, 45).

5.2. LIOFILIZACION.

Para obtener la materia seca , se procedió a la liofilización de las muestras. Los tubos de vidrio fueron colocados en una liofilizadora marca Labconco, modelo LYPH de 4.5 l de capacidad, la cual fué previamente acondicionada a -50 °C y un vacío de 25 micrones de

mercurio (25×10^{-3} Torr.). El proceso de liofilización duró aproximadamente 3 horas, obteniéndose en cada operación 10 muestras.

Cuando fué necesario, las muestras se almacenaron a -20°C en un congelador. Posteriormente, se pesaron en una balanza analítica 20 mg de materia seca, para cada muestra. Todo el material utilizado para pesar y transferir la muestra, se lavado previamente con hexano.

5.3. ESTERIFICACION Y EXTRACCION DE LOS ACIDOS GRASOS.

Los 20 mg de biomasa liofilizada fueron sometidos a un proceso de esterificación, para lo cual se agregó 1 ml de solución de metóxido de sodio (Solución A), dejando reposar por 5 minutos. En seguida se le adicionaron de 0.6 a 0.7 ml de solución de metanol saturado de gas cloro (Solución B) hasta alcanzar un pH de 1 ó 2, y se dejó en agitación con movimientos circulares ligeros por espacio de 30 minutos, finalmente se agregaron 2 ml de solución fisiológica al 0.85 % (Solución C) y se agitó por 5 minutos más.

Para la extracción de los ácidos grasos, el proceso consistió en agregar a cada tubo 1 ml de hexano, agitando la muestra por espacio de 5 minutos; posteriormente se dejó que se separara el hexano que contenía los ésteres metílicos, dejando reposar la muestra por 5 minutos, formándose así una capa superior transparente. Esta fué transferida a tubos de ensaye con la ayuda de una pipeta pasteur. Cada tubo de ensaye contenía sulfato de sodio anhidro, para extraer el agua que pudiera estar presente. Los lavados se repitieron dos veces más, para cada muestra. Finalmente la muestra fué transferida con la ayuda de una pipeta pasteur a frascos viales, previamente lavados con hexano, y sellados herméticamente para evitar la evaporación de los ésteres metílicos. En seguida la muestra fué sometida a una evaporación con N_2 gas, hasta un volúmen de 10 μl .

El número de muestras procesadas en total, para Enterobacter aerogenes, fué de 59.

5.4. ANALISIS DE LOS ACIDOS GRASOS ESTERIFICADOS.

De la muestra de ésteres metílicos obtenidos, una fracción de 1µl fue analizada en un cromatógrafo de gases (5890A 3396, Packard Instrument Co. Rockville, Md.) equipado con un inyector sólido (Chrompack 8990, Packard) y detector de ionización de flama de hidrógeno SGE OCI-3, con una columna capilar de sílice fundido (FSL-150 . 30 m por 0.25 mm (diámetro interno)) cubierta con CPS: 15 (0.25 µm de capa) como fase estacionaria; y aunque la mezcla de ésteres de ácidos grasos puede separarse tanto en columna normal como en columna capilar, los resultados en una columna capilar son más confiables, debido a la separación que se puede obtener en ella, sobre todo en isómeros con la misma longitud de carbonos, así como los derivados hidroxilados y en la que desde luego interviene la longitud y el tipo de fase empleada.

Las condiciones de operación fueron las siguientes:

- Temperatura del inyector 250 °C .
- Temperatura del detector 250 °C.
- Presión de nitrógeno de 50 kg/p²
- Temperatura programada de la columna de 120 °C a 250 °C cada 4 minutos, con incrementos de 4 °C.

El gas acarreador fue nitrógeno con un flujo aproximado de 5 ml por minuto al puerto de inyección. Bajo estas condiciones los ésteres metílicos de los ácidos grasos de 10 a 20 carbonos de longitud, eluyeron de la columna en aproximadamente 30 minutos.

Se utilizó un integrador electrónico Hewlett Packard 3396 A , para obtener la cuantificación de las áreas y tiempos de los picos de los ácidos grasos.

Para la identificación de los picos de los ésteres metílicos de los ácidos grasos, se procedió a la comparación de los tiempos de retención de cada cepa con los tiempos de retención de una mezcla comercial estándar de ésteres metílicos de los ácidos grasos de referencia 4-7080. La mezcla contiene un total de 10 mg/ml de ésteres metílicos en metil caproato, Supelco Inc., Bellafonte Pa.

5.5. ANALISIS ESTADISTICO.

Se hicieron 59 repeticiones para obtener los cromatogramas en los que aparecen los ésteres metílicos de los ácidos grasos de Enterobacter aerogenes, en donde el punto de interés fueron los ácidos con el número de átomos de carbono de 12 en adelante; ya que los ácidos con una cadena de menos de 12 carbonos aparecen como productos intermedios y no se toman en consideración.

Una vez determinados los picos de importancia en el cromatograma del estándar seleccionado, se procedió a procesar la información de la siguiente manera:

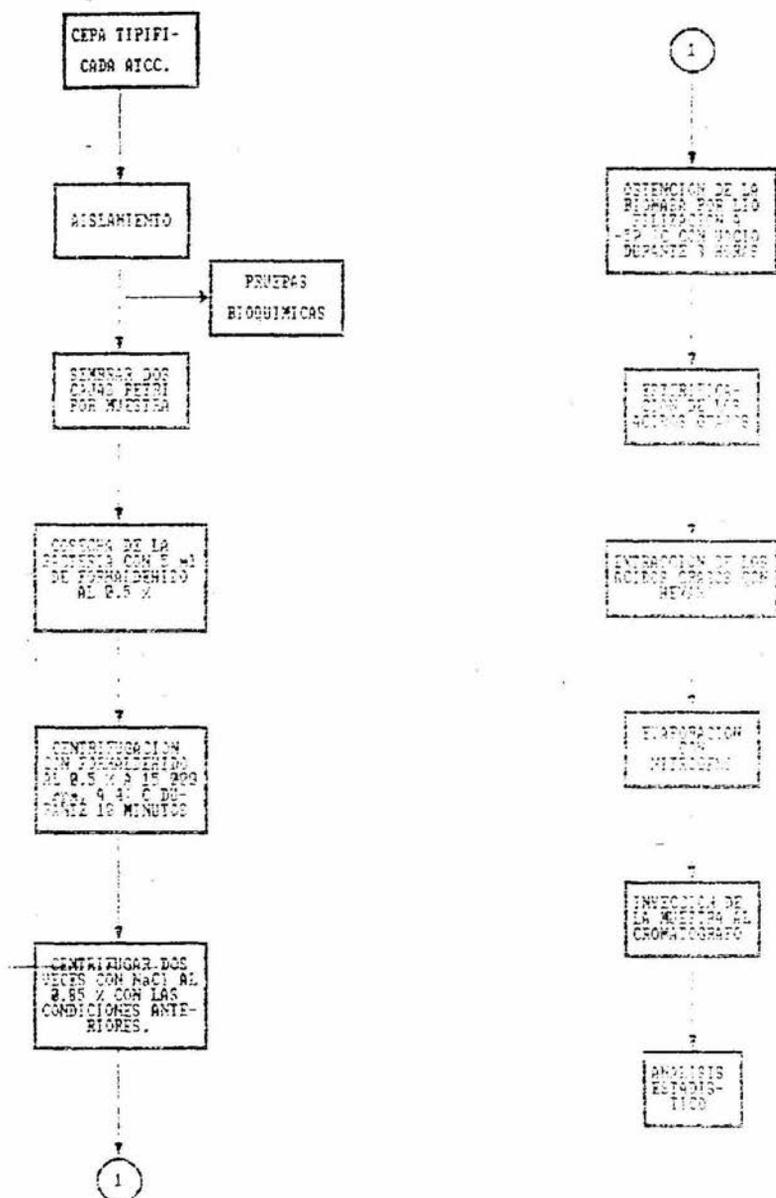
5.1.1. NORMALIZACION.

El primer paso fué la estandarización de los datos obtenidos. El proceso de normalización se efectuó transformando los datos numéricos de áreas y tiempos a porcentajes, para lo cual se tomo un valor de tiempo y área referente que se considera el 100 % .El criterio para obtener el dato de área y tiempo referente fué el siguiente: de los datos originales

arrojados por el cromatograma, se eligió como dato referente, para la normalización, aquel que pertenece al pico o al área más alta y se le asoció su tiempo de retención.

Los datos normalizados se tabularon y graficaron con las repeticiones efectuadas. La normalización se realizó con el propósito de estandarizar las unidades de áreas y tiempos en porciento, preparando así los datos de Enterobacter aerogenes para el análisis estadístico (19).

DIAGRAMA DE LA TECNICA CROMATOGRAFICA PARA LA DETERMINACION
DE ACIDOS GRASOS CELOLARES DE BACTERIAS.



RESULTADOS.

La comparación de los 59 cromatogramas con el perfil de referencia de los ésteres metílicos de los ácidos grasos, estableció la ocurrencia e identidad de 12 picos de los ácidos grasos. (Tabla 1 y Figura 3).

Para evaluar el análisis cromatográfico de los ácidos grasos, como un procedimiento para la identificación de bacterias, se analizaron inicialmente los resultados de una manera cualitativa y posteriormente cuantitativa.

La figura 1 muestra el cromatograma del estándar de la mezcla de metil ésteres de ácidos grasos, utilizada en el laboratorio y que consta de 26 ácidos grasos utilizándolo para comparar los cromatogramas de las muestras esterificadas de los ácidos grasos bacterianos (Figura 2), ambos corridos bajo las mismas condiciones de operación.

La tabla 1 muestra los ácidos grasos identificados para Enterobacter aerogenes. Esta especie presenta 12 ácidos grasos característicos: ácido dodecanoico (C 12:0), ácido tetradecanoico (C 14:0), ácido pentadecanoico (C 15:0), ácido 3-hidroxitetradecanoico (3-OH C 14:0), ácido cis-9-hexadecenoico (C 16:1⁹), ácido hexadecanoico (C 16:0), ácido cis-9,10-metilhexadecenoico (C 17:0^Δ), ácido heptadecanoico (C 17:0), ácido trans-9-octadecenoico (C 18:1⁹), ácido cis-11-octadecenoico (C 18:1¹¹), ácido octadecanoico (C 18:0) y ácido cis-9,10-metiloctadecenoico (C 19:0^Δ).

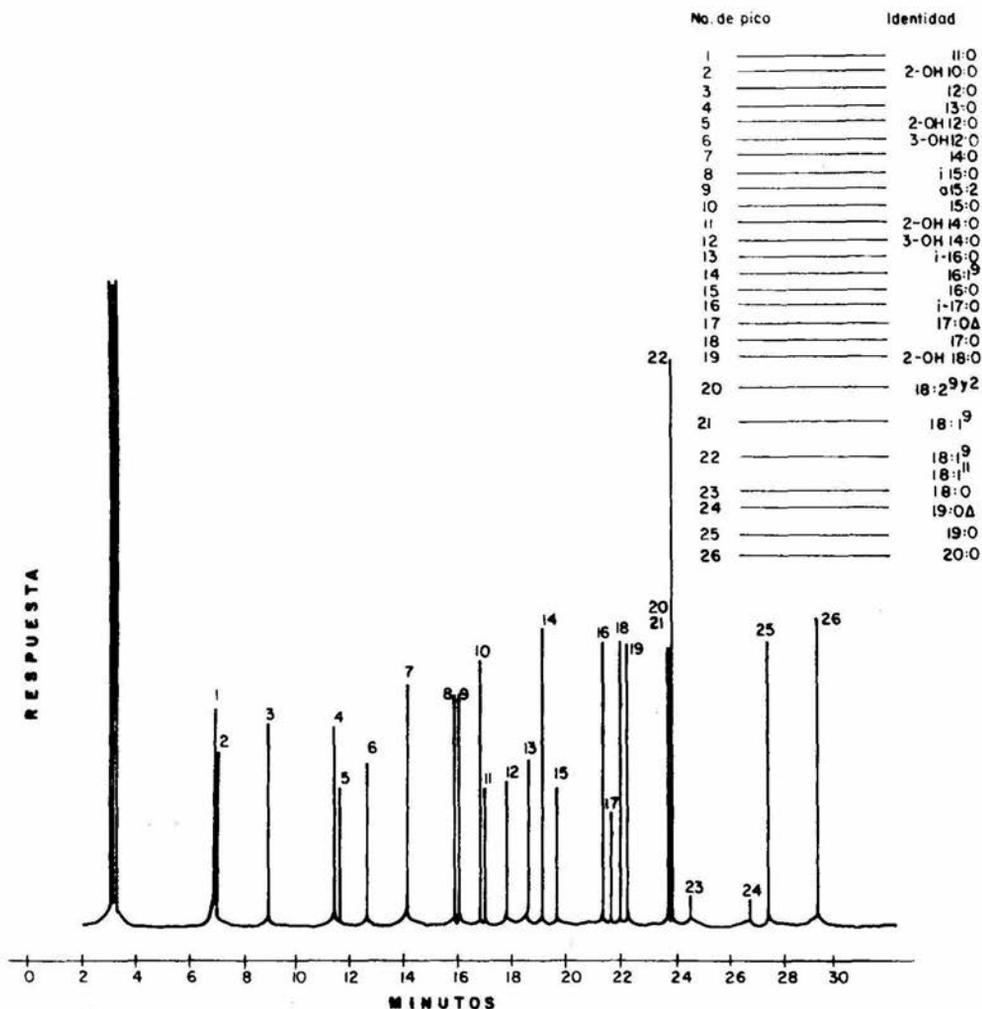


Fig.1. Cromatograma del standar de los ácidos grasos de los ésteres metílicos analizados en una columna capilar de sílice fundido (30m x 0.25mm.), con un espesor de capa de 0.25 μm., velocidad lineal: 20 cm/sec. Temperatura de la columna: calentamiento 4 min. a 120°C hasta 250°C a 4°C/min. Temperatura del inyector: 250°C, Temperatura del detector 250°C. La mezcla de ésteres metílicos contienen un total de 10 mg/ml en metil caproato.

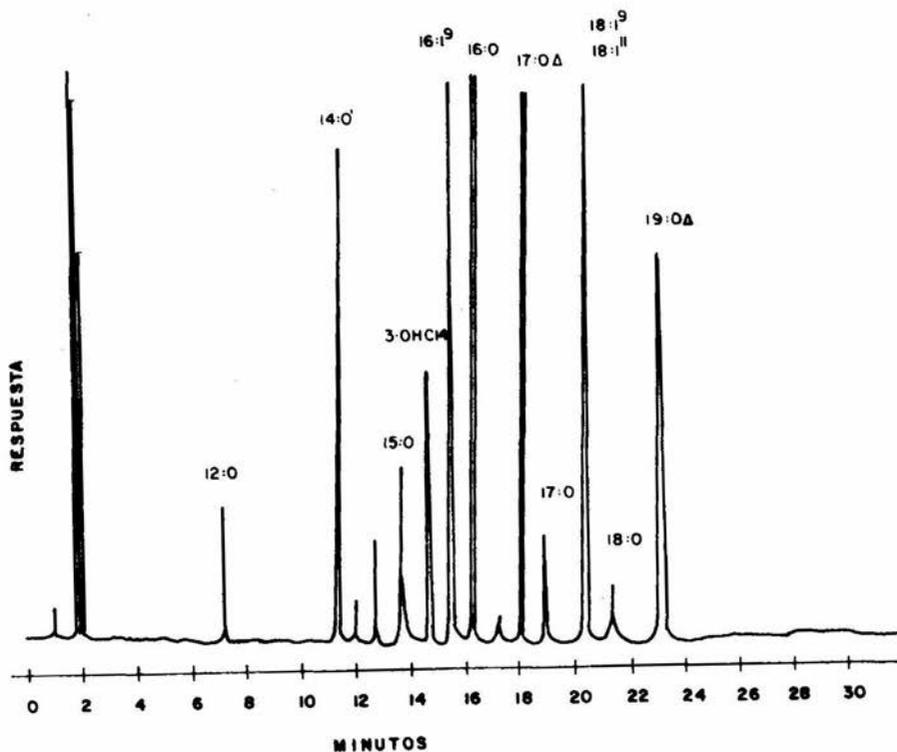


Fig.2. Cromatograma de los ácidos grasos esterificados de *Enterobacter aerogenes*, analizados en una columna capilar de sílice fundido (30m x 0.25mm). Flujo de nitrógeno: 5 ml/min.

Tabla 1. Principales ácidos grasos identificados de *Enterobacter aerogenes*.^a

No. de pico	Fórmula del ácido graso.	Nombre
3	C 12:0	Acido dodecanoico (ac. laúrico)
7	C 14:0	Acido tetradecanoico (ac. mirístico)
10	C 15:0	Acido pentadecanoico
12	3-OH C 14:0	Acido 3-hidroxitetradecanoico
14	C 16:1 ⁹	Acido cis-9-hexadecenoico (ac. palmitoleico)
15	C 16:0	Acido hexadecanoico (ac. palmitico)
17	C 17:0 Δ	Acido cis-9.10-metilhexadecenoico
18	C 17:0	Acido heptadecanoico (ac. margárico)
22	C 18:1 ⁹	Acido trans-9-octadecenoico (ac. oleico)
	C 18:1 ¹¹	Acido cis-11-octadecenoico (ac. eláidico)
23	C 18:0	Acido octadecanoico (ac. esteárico)
24	C 19:0 Δ	Acido cis-9.10-metiloctadecenoico.

^a: Los ácidos grasos son enumerados de acuerdo al orden de elución de la columna de cromatografía de gas-liquido.

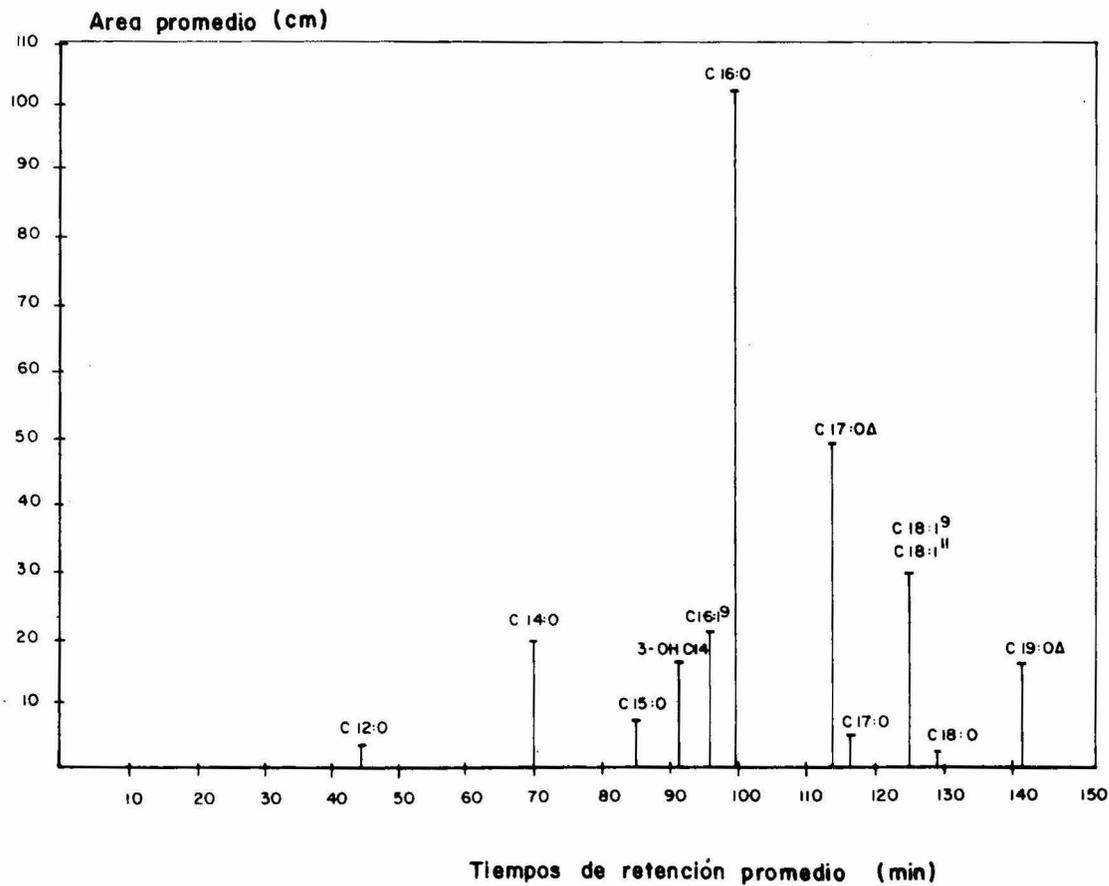


Fig. 3. Valores promedio en tiempos y áreas normalizadas en los ácidos grasos de *Enterobacter aerogenes*.

Los ácidos grasos más abundantes para Enterobacter aerogenes fueron el ácido hexadecanoico (C 16:0) con un área promedio de 100 %, le sigue el ácido cis-9,10-metilhexadecenoico (C 17:0 Δ) con un área promedio de 48.61 % , después la mezcla constituida por los ácidos trans-9-octadecenoico (C 18:1^o) y cis-11-octadecenoico (C 18:1¹¹) cuya área promedio es de 27.74 % ; en seguida el ácido cis-9-hexadecenoico (C 16:1⁹) con un valor de área promedio de 22.40 % y por último el ácido tetradecanoico (C 14:0) con un valor promedio de área de 20.90 % (Tabla 3 y Figura 3).

El análisis estadístico descriptivo de media aritmética, desviación estándar y coeficiente de variación para los tiempos de retención de los ácidos grasos celulares de Enterobacter aerogenes , muestra que el primer ácido en eluir en la columna capilar fue el ácido dodecanoico con un tiempo promedio de 43.98 y una desviación estándar de 0.84, mientras que su coeficiente fue el más alto con un porcentaje menor al 2 % ; el siguiente fué el ácido tetradecanoico con un valor de tiempo promedio de 70.17, una desviación de 0.95 y un coeficiente menor al 1.4 % , lo que refleja una alta reproducibilidad; le sigue el ácido pentadecanoico con un tiempo promedio de 84.97, una desviación estándar de 0.38 y un coeficiente de variación menor al 0.5 % , considerándose los valores de tiempo de retención del ácido graso, altamente reproducibles; enseguida se encuentra el ácido 3-hidroxi-decanoico con un tiempo promedio de 90.53, una desviación de 0.22 y un coeficiente de 0.24 % ; después sigue el ácido cis-9-hexadecenoico con un tiempo promedio de 96.01, una desviación de 0.19 y un coeficiente de variación menor a 2 % ; le sigue el ácido hexadecenoico con un tiempo promedio de 100 % , por lo cual fue considerado como el ácido graso de referencia; el siguiente en eluir fue el ácido cis-9,10-metilhexadecenoico con un tiempo promedio de 111.96 y una desviación de 0.40 y un coeficiente de variación menor a 0.4 % ; sigue el ácido heptadecanoico con un tiempo promedio de 114.60, con una desviación de 0.50 y un coeficiente de variación menor a 0.5 % ; posteriormente encontramos una mezcla formada por los ácidos trans-9-octadecenoico y cis-11-octadecenoico que muestran un tiempo

promedio de 125.42, una desviación estándar de 0.67 y un coeficiente de 0.53 % ; el penúltimo ácido en eluir fue el ácido octadecanoico con un tiempo promedio de 128.80 y una desviación de 0.87, mientras que su coeficiente de variación fue de 0.6 % y el último ácido en eluir fue el cis-9, 10-metiloctadecenoico con un tiempo promedio de 140.60, una desviación de 0.88 y un coeficiente de variación de 0.63. (Tabla 2). En general se observa que ningún coeficiente de variación es mayor al 2 % ; lo que lleva a afirmar que la identificación cualitativa de los ácidos grasos con base en sus tiempos de retención es una característica estable y reproducible (Tabla 2 y Figura 4).

El área de los ácidos grasos fue sometida al mismo tipo de análisis estadístico, presentando para el ácido dodecanoico un área promedio de 2.44, una desviación estándar de 1.90 y un coeficiente de variación menor al 77 % ; le sigue el ácido tetradecanoico cuya área promedio es de 20.91 y su desviación es de 7.25 con un coeficiente de variación menor de 35 % ; para el ácido pentadecanoico el área presenta un valor promedio de 5.80, una desviación de 1.27 y un coeficiente menor de 22 % ; le sigue el ácido 3-hidroxitetradecanoico mostrando un valor de área promedio de 15.70, una desviación estándar de 12.71 y un coeficiente menor a 81 % ; el ácido cis-9-hexadecenoico presenta un valor de área promedio 22.40 con una desviación estándar de 7.60 y un coeficiente de 34 % ; el ácido hexadecenoico con un valor de área de 100 % fue considerado el ácido graso de referencia para este análisis; para el ácido cis-9,10-metilhexadecenoico el área promedio tiene un valor de 48.61, una desviación de 5.22 y un coeficiente de variación de menos de 11 % ; en seguida el ácido heptadecanoico presentó un área promedio de 4.30, una desviación estándar de 5.40 y un coeficiente de variación mayor al 100 % ; para el caso de la mezcla formada por el ácido trans-9-octadecenoico y cis-11-octadecenoico el valor de área promedio encontrado es de 27.74, con una desviación de 11.02 y un coeficiente de variación de 40 % ; mientras que el ácido octadecanoico presenta un valor de área promedio de 2.11, una desviación estándar de 2.90 y un

Tabla 2. Medidas descriptivas para los tiempos normalizados en los ácidos grasos de *Enterobacter aerogenes*.

No. de pico	Acido graso	T.N.	D.E.	C.V.	MAX.	MIN.
3	C 12:0	45.98	0.84	1.90	44.84	42.10
7	C 14:0	70.17	0.95	1.35	70.91	65.60
10	C 15:0	84.97	0.38	0.45	85.96	84.00
12	3-OH C 14:0	90.53	0.22	0.24	90.90	90.00
14	C 16:1 ⁹	96.01	0.19	0.19	96.25	95.50
15	C 16:0	100.00	0.00	0.00	100.00	100.00
17	C 17:0Δ	111.96	0.40	0.36	114.29	111.11
18	C 17:0	114.60	0.50	0.43	116.96	113.70
22	C 18:1 ⁹	125.42	0.67	0.53	127.83	124.56
	C 18:1 ¹					
23	C 18:0	128.79	0.87	0.67	130.19	124.76
24	C 19:0Δ	140.60	0.88	0.63	142.36	139.45

T.N. : Media del tiempo normalizado.

D.E. : Desviación estándar.

C.V. : Coeficiente de variación.

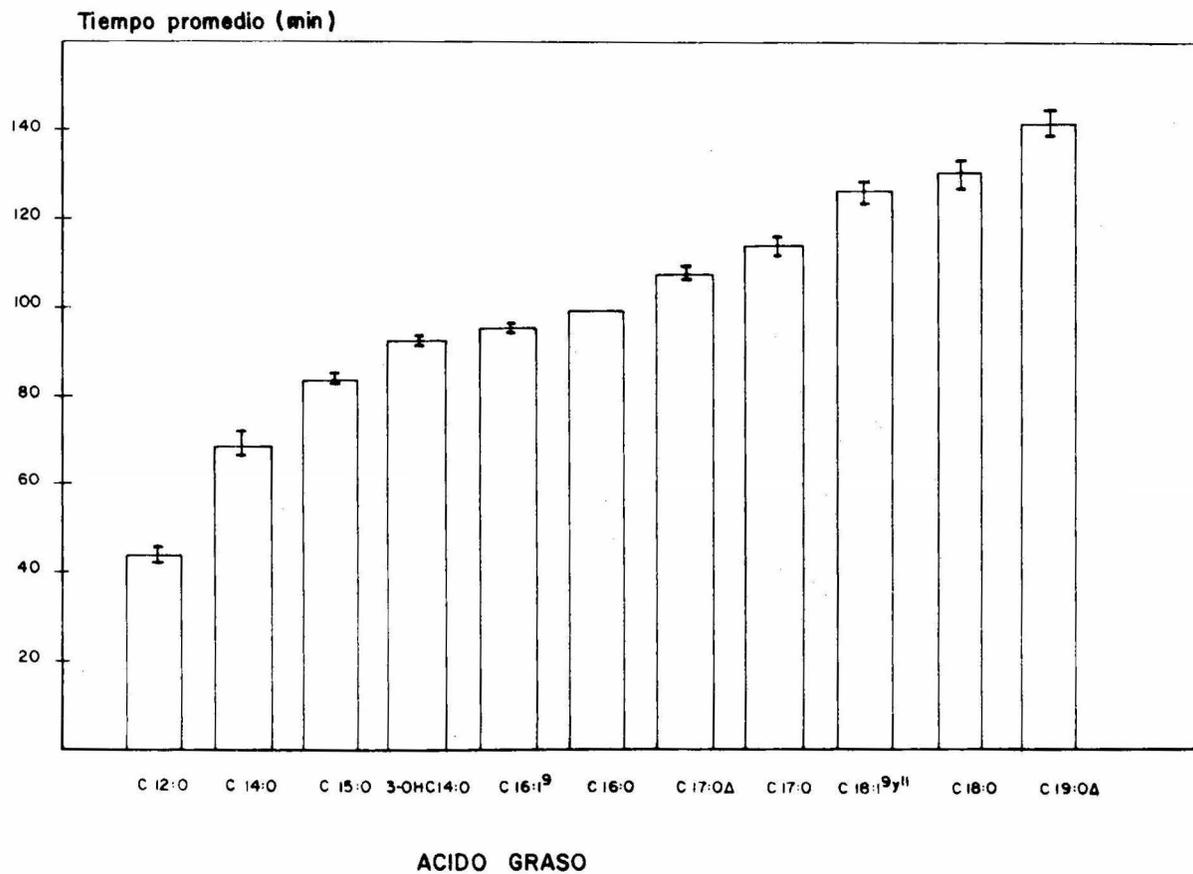


Fig. 4. Tiempos promedio de los picos de los acidos grasos de *Enterobacter aerogenes*.

coeficiente mayor al 100 % ; y por último el ácido cis-9,10-metilocta-decenoico muestra un área promedio de 14.53, una desviación estándar de 5.39 y un coeficiente de variación de 37 % (Tabla 3 y Figura 5). En general se observa que para cada ácido graso existe una área determinada, que depende del orden de elución de los compuestos, reflejando la cantidad con que cada ácido graso se encuentra en la bacteria; así se observa que los 3 ácidos grasos más abundantes son el ácido hexadecanoico con un valor de 100 %; el ácido cis-9,10-metilhexadecenoico con un 48 % y la mezcla formada por los ácidos cis-9-octadecenoico y cis-11-octadecenoico con un 27 % (Figura 5).

A diferencia de la alta estabilidad en los tiempos de retención. los valores de las áreas de los ácidos grasos presentan fluctuaciones de un análisis a otro; sin embargo, al obtener los intervalos se observa que a pesar de estas fluctuaciones , el valor de área para ácido graso es confiable al obtenerse porcentajes por arriba del 80 %, presentándose para el ácido 3 hidroxitetradecanoico un porcentaje menor y no obteniéndose intervalo para los ácidos heptadecanoico y octadecanoico por presentar un coeficiente de variación superior al 100 %; los factores que pueden producir tal efecto, serán abordados en la discusión.(Tabla 4)

Tabla 3. Medidas descriptivas para las áreas normalizadas en los ácidos grasos de *Enterobacter aerogenes*.

No. de pico	Acido graso	A.N.	D.E.	C.V.	MAX.	MIN.
3	C 12:0	2.44	1.90	76.98	9.25	0.28
7	C 14:0	20.91	7.25	34.66	42.10	1.94
10	C 15:0	5.80	1.27	21.87	9.42	3.05
12	3-OH C 14:0	15.70	12.71	80.94	51.53	1.27
14	C 16:1 ⁹	22.40	7.60	33.94	39.93	11.22
15	C 16:0	100.00	0.00	00.00	100.00	100.00
17	C 17:0Δ	48.61	5.22	10.75	65.62	36.48
18	C 17:0	4.30	5.40	125.54	44.36	1.99
22	C 18:1 ⁹	27.74	11.02	39.74	42.78	0.16
23	C 18:1 ¹					
23	C 18:0	2.11	2.90	137.30	21.70	0.37
24	C 19:0Δ	14.53	5.39	37.07	85.59	2.27

A.N. : Media del área normalizado.
 C.V. : Coeficiente de variación.

D.E. : Desviación estándar.

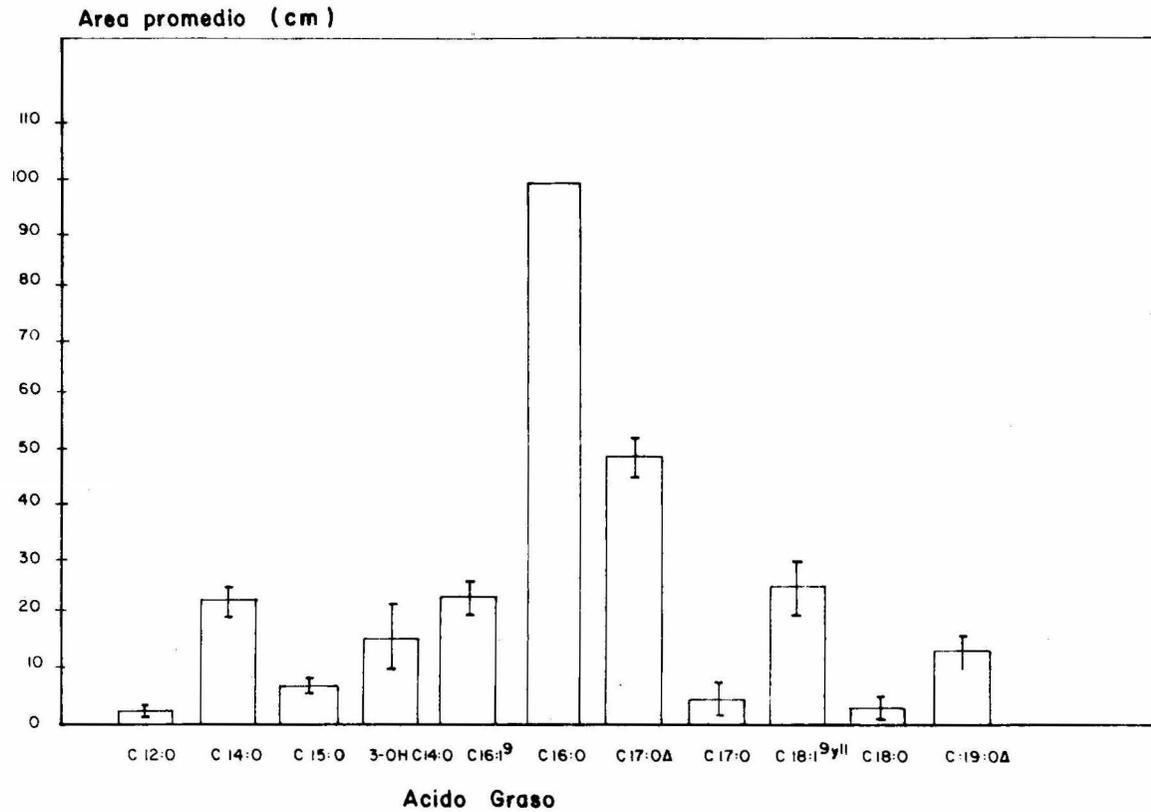


Fig. 5. Areas promedio de los picos de los ácidos grasos de *Enterobacter aerogenes*.

Tabla 4. Intervalos de las áreas normalizadas.

No. de pico	Acido graso	Intervalo	Cromatogramas dentro
3	C 12:0	(0.54, 4.34)	80 %
7	C 14:0	(6.41, 35.41)	93 %
10	C 15:0	(3.26, 8.34)	92 %
12	3-OH C 14:0	(2.99, 28.41)	76 %
14	C 16:1 ⁹	(7.2, 37.6)	100 %
15	C 16:0	(100, 100)	100 %
17	C 17:0 Δ	(38.17, 59.05)	100 %
18	C 17:0		
22	C 18:1 ⁹	(5.7, 49.78)	92 %
	C 18:1 ¹¹		
23	C 18:0		
24	C 19:0 Δ	(3.75, 25.31)	97 %

a: Para los picos 3 y 12 el intervalo se calculó a partir de $X \pm 6$; para los picos 7, 10, 14, 15, 17, 22 y 24 a partir de $X \pm 2S$. Para los picos 18 y 23 no se contruyó intervalo por presentar un coeficiente de variación superior al 100 %.

La utilización de una columna capilar de sílice fundido para la identificación de los ácidos grasos celulares de Enterobacter aerogenes, permitió llevar a cabo una completa separación de los compuestos, ya que una característica de esta columna es la capacidad de resolver isómeros de los ácidos con la misma longitud de carbonos en la cadena, los isómeros iso y anteiso en otro tipo de columna pueden coeluir apareciendo como un pico en el cromatograma, sin embargo, en una columna capilar estos isómeros así como los derivados hidroxilados, característicos de bacterias Gram negativas, como en el caso del presente trabajo, son separados completamente.

La elución de los ácidos grasos bacterianos requirió de un tiempo aproximado de 30 minutos para la separación completa de los compuestos, este tiempo de elución característico le da a la cromatografía de gases un gran valor en la identificación de bacterias, reduciendo considerablemente el tiempo en el proceso, en relación a las técnicas tradicionales de identificación.

El tiempo de retención es una característica primordial en el análisis cromatográfico, ya que a través de él se pudo identificar cada uno de los componentes de la mezcla problema a nivel cualitativo, así se observó que el tiempo de retención es característico y único para cada ácido graso de Enterobacter aerogenes y que éste se incrementa de manera directa con el aumento en el número de carbonos de la cadena. La identificación de los picos separados fué establecida por comparación de los tiempos de retención de la muestra problema con aquellos de una mezcla patrón que se inyectó diariamente, ambos se realizaron bajo las mismas condiciones de operación cromatográfica. En general, la ocurrencia de los diferentes ácidos grasos identificados y su cantidad

aparecen constantes en cada muestra inyectada.

Cada uno de los picos de los ácidos grasos identificados para Enterobacter aerogenes, corresponden a cadenas lineales saturadas e insaturadas, características de enterobacterias. Los ácidos tetradecanoico (C 14:0) , cis-9-hexadecenoico (C 16:1⁹), hexadecanoico (C 16:0) , cis-9, 10-metil tilhexadecenoico (C 17:0) y la mezcla formada por los ácidos trans-9-octadecenoico y cis-11-octadecenoico aislados en la presente investigación, corresponden a los ácidos grasos más abundantes, lo cual concuerda con trabajos anteriores, por lo que se han establecido como característicos para la familia Enterobacteriaceae por diversos autores como Boe y Gjerde (7), Cechini y O'Brien (14) y Hausler y Richter (29), permitiendo incluir a Enterobacter aerogenes dentro de esta familia.

A través del análisis de los porcentajes de los tiempos de retención, se pudo establecer la presencia de 12 ácidos grasos para Enterobacter aerogenes, los cuales conforman su perfil lipídico en el que no se observa traslape de picos, ya que éstos fueron diferenciados perfectamente, presentando un tiempo característico para cada ácido graso, el cual mantuvo su constancia sin variaciones significativas de un análisis a otro (Tabla 2 y Figura 4):

Lo anterior nos lleva a establecer que dado que las condiciones de operación cromatográfica se mantuvieron constantes, permitiendo la elución diferencial de los componentes a través de la columna. El tiempo que tardan los diferentes compuestos en emigrar a través de la columna depende, en gran medida de la fase estacionaria empleada, ya que ésta es la única parte activa de la columna. Este proceso se observa como una serie de particiones donde la muestra pasa a la solución ó es adsorbida en la fase estacionaria y subsecuentemente es vaporizada. La afinidad de la muestra con la fase estacionaria da el tiempo en que los componentes individuales de la mezcla permanecen en la columna, es decir, los

compuestos con menor afinidad eluyen primero y los de mayor afinidad salen al final. Sin embargo debe tomarse en cuenta que el orden de elución de los compuestos también se incrementa con el número de carbonos presentes en la cadena, aunado a esto el orden de elución también se ve afectado por el aumento en la polaridad de los compuestos durante el proceso de metilación, por lo que ácidos grasos con menor número de carbonos eluyen después que aquellos con mayor número de carbonos, como el caso del ácido 3 hidroxitetradecanoico con 14 átomos de carbono que aparece después del ácido pentadecanoico con 15 átomos de carbono, sin embargo, los ácidos grasos insaturados con isomerías geométricas aparecen antes que los lineales saturados con el mismo número de átomos de carbono. Así al evaluar el análisis cualitativo de los ácidos grasos como un procedimiento para la identificación de bacterias Gram negativas, se observa que el método empleado resulta ser el adecuado y que la composición de los ácidos grasos es característica para cada especie, obteniéndose resultados confiables en el análisis cromatográfico y aunque las bacterias sufren alteraciones genéticas, la composición de sus ácidos grasos tiende conservarse, como lo señalan Ahmad (2), Dees (17), González (25), Guerrant (28) y Tomabene (51).

Lo anterior solo da una caracterización cualitativa respecto a la presencia de los ácidos grasos, la cual no es del todo suficiente para definir el perfil lipídico de bacterias, siendo necesario realizar un análisis cuantitativo de las áreas de los picos, presentados como un porcentaje del total de las áreas de los picos de los ácidos grasos, para de esta manera determinar su abundancia relativa.

Al observar los resultados obtenidos a través del análisis de las áreas, se establece que el ácido graso más abundante para Enterobacter aerogenes fue el ácido hexadecanoico (C16:0) y que al mismo tiempo es el que le ubica dentro de la familia Enterobacteriaceae.

Los valores de coeficiente de variación muestran que los ácidos dodecanoico (C 12:0), 3-hidroxitetradecanoico (3-OH C 14:0), heptadecanoico (C 17:0) y octadecanoico (C 18:0) son los que presentan una alta variación en su abundancia, ya que el coeficiente de variación es mayor al 70 %. lo que refleja que los datos son muy dispersos, sin embargo, los 8 ácidos grasos restantes tienden a ser más estables, lo cual se ve reflejado en sus coeficientes de variación que se encuentran por debajo de este valor (Tabla 3).

Se analizaron los porcentajes de los datos normalizados en relación a los límites establecidos ($X \pm 2S$) y se observó que para los ácidos tetradecanoico, pentadecanoico, cis-9-hexadecenoico, hexadecanoico, cis-9,10-metilhexadecenoico, la mezcla formada por los ácidos trans-9-octadecenoico y cis-11-octadecenoico y el ácido cis-9,10-metiloctadecenoico existe una alta reproducibilidad, ya que en todos ellos se presentó un porcentaje superior al 90 % de cromatogramas dentro de los límites (Tabla 4). Para el caso de los ácidos dodecanoico y 3-hidroxitetradecanoico, su reproducibilidad es del 80 % y 76 % respectivamente y aunque se pueden considerar que son altos también se puede pensar que en algún paso de la técnica pudieron haber sido afectados. Para el caso de los ácidos heptadecanoico y octadecanoico no se construyó intervalo por presentar un coeficiente de variación superior al 100 % .

Aunque algunos autores como Goran (27) indican que los ácidos grasos son componentes básicos de los lípidos de todos los microorganismos y que el área de éstos depende de la cantidad de muestra inyectada, la variación en el área de los distintos ácidos grasos analizados en el presente estudio, no se adjudica a este factor, debido a que se mantuvo controlado y además esta variación no se presentó en todos los cromatogramas ni en todos los picos, sino solamente en cuatro ácidos grasos que varían de manera considerable. Por lo tanto, esta variación se atribuye principalmente a la heterogeneidad en la abundancia de los

ácidos grasos celulares de Enterobacter aerogenes como lo señalan Starr (50) y el Manual de Bergey's (36), también se puede deber a que son lípidos variables a nivel de ruta metabólica en esta bacteria, Moss y colaboradores en 1980 (47) señalan que existen ácidos grasos en los diferentes grupos bacterianos que tienden a presentar alteraciones en su abundancia como respuesta a la regulación genética en la construcción de lípidos celulares en microorganismos, la variación espacial y temporal en la abundancia de los lípidos celulares es un campo aún incierto y que requiere de una árdua investigación.

La presencia de cadenas lineales saturadas e insaturadas, así como metiladas e hidroxiladas encontradas en este trabajo, concuerdan con lo reportado por Eoe y Gjerde (7) y Cechini y O'Brien (14), quienes mencionan la ausencia de cadenas ramificadas, poliinsaturadas y oxigenadas para la familia Enterobacteriaceae.

Los cromatogramas obtenidos durante el presente trabajo, así como los resultados estadísticos completos, se encuentran depositados en el laboratorio de bacteriología ambiental, como parte del proyecto de Conservación y Mejoramiento del Ambiente, en la Unidad de Investigación de la ENEF Iztacala.

De acuerdo con los resultados obtenidos se concluye:

- I) El análisis de los ésteres metílicos de los ácidos grasos celulares de Enterobacter aerogenes por el método de cromatografía gas-líquido puede ser considerado como uno de los métodos más rápidos, altamente reproducibles e inalterables cuyos resultados son procesados tanto a nivel de identificación como clasificación, con la limitante de que falta profundizar aún más en la investigación sobre la regulación en síntesis de lípidos bacterianos, a nivel bioquímico y genético para determinar las variaciones en los diferentes ácidos grasos.
- II) El análisis de los lípidos bacterianos, en el presente estudio, no solo tiene su aplicación en el área quimiotaxonómica, sino que también pone de manifiesto la composición de los metil ésteres de los ácidos grasos celulares de Enterobacter aerogenes por primera vez (hasta donde sabemos con base en la revisión bibliográfica contribuyendo al conocimiento de esta célula bacteriana a nivel bioquímico.
- III) Los resultados de este estudio demuestran que la especie analizada contiene ácidos grasos del tipo de cadena lineal saturada y monoinsaturada (con sus dobles ligaduras en su mayoría con configuración geométrica cis y pocos en trans, además de la formación de anillos ciclopropanos). Esta composición química característica distingue invariablemente la familia de otras bacterias Gram negativas y puede ser usada como un medio totalmente exacto para la identificación de esta familia.

IV) Es importante tomar en cuenta que para mantener una alta reproducibilidad en los resultados, es preciso mantener constantes las condiciones durante el desarrollo de la técnica y del análisis cromatográfico, sin dejar de considerar factores como el tiempo de vida media de la columna, ya que a pesar de que la separación en las columnas cromatográficas, como la de sílice fundido utilizada en el presente trabajo, es muy alta, la eficiencia se ve afectada por el uso intensivo de la misma, provocando así variaciones en los resultados.

V) La composición de los ácidos grasos de Enterobacter aerogenes es altamente específica, por lo que los análisis cualitativos y cuantitativos pueden ser adaptados en laboratorios, que posean el instrumental adecuado, constituyendo un criterio adicional muy valioso para la diferenciación de especies y servir como un método rápido y altamente reproducible para rutinas de identificación a en diversos sectores como : el clínico, el sanitario, el alimenticio y el biotecnológico, así como en trabajos de investigación.

- 1.-Abel, K., Schmertzing, H. y Peterson, J. H. 1963. Clasificación of microorganisms by analysis of chemical composition. I. Feasibility of utilizing gas chromatography. J. Bacteriol. 85: 1039-1044.
- 2.-Ahmad, S., Weisburg, W. G. y Jensen. Z. A. 1990. Evolution of aromatic amino acids biosynthesis and application to the fine-tuned phylogenetic positioning of enteric bacteria. J. Bacteriol. 172: 1051-1061.
- 3.-Alexander, A. D., Lessel, E. F., Evans, L. B., Frank, E. y Green, S. 1972. Preservation by liquid nitrogen refrigeration. Syst. Bacteriol. 22: 165-169.
- 4.- American Type Culture Collection (ATCC). 1982. Catalogue of strains.
- 5.-Amstein, F. A. y Hartman, P. A. 1973. Differentiation of some Enterococci by gas chromatography. J. Bacteriol. 113: 38-41.
- 6.-Athayle, M., Noble, W. C. y Miniking, D. E. 1985. Analysis of cellular fatty acids by gas chromatography as a tool in identification of medical important coryneform bacteria. J. Appl. Bacteriol. 58: 507-512.
- 7.-Boe, B. y Gjerde, J. 1980. Fatty acids patterns in the clasificación of some representative of the families Enterobacteriaceae and Vibrionaceae. J. Gen. Microbiol. 116: 4149.

- 8.-Bousfield, J. D., Smith, G. L., Dando, T. R. y Hobby, G. 1983. Numerical analysis of total fatty acids profiles in the identification of coryneform, nocardioform, and some other bacteria. J. Gen. Microbiol. 129: 375-394.
- 9.-Brian, B. L. y Gardner, E. W. 1967. Preparation of bacterial fatty acids methyl esteres for rapid characterization by gas liquid chromatography. Appl. Microbiol. 15:1499-1500
- 10.-Bronz I., Olsen I. y Sjöstrom M. 1989. Gas chromatography assesment of alcoholized fatty acids from yeast : a new chemotaxonomic method. J. Clin. Microbiol. 27: 2815-2819.
- 11.-Brooks. J. B., Moss, C. W. y Dowell, B. R. 1969. Diferentiation between Clostridium sordelli and Clostridium biffermentans by gas chromatography. J. Bacteriol. 100: 528-530.
- 12.-Brooks. J. B., Kellogs, D. S., Thacker L. y Turner. E. M. 1971. Analysis by gas chromatography of fatty acids found in whole cultural extracts of Neisseria species. J. Microbiol. 17:531-542.
- 13.-Bryan, A. 1976. Bacteriologia: principios y prácticas. CECSA. México.
- 14.-Cecchini, G. L. y O'Brien, R. T. 1968. Detection of Escherichia coli by gas chromatography. J. Bacteriol. 95: 1205-1206.
- 15.-Cookson, B., Talsania. H., Chinn, S. y Phillips, I. 1989. A qualitative and quantitative study of the cellular fatty acids of Streptococcus milleri with capillary gas-chromatography. J. Gen. Microbiol. 135: 831-838.
- 16.-Cronan, J. E., Jr. 1975. Thermal regulation of the membrane lipid composition of Escherichia coli. J. Biol. Chem. 250: 7074-7077.

- 17.-Dees, S. B., y Moss C. W. 1978. Identification of Achromobacter species by cellular fatty acids and by production of keto acids. J. Clin. Microbiol. 18: 1073-1078.
- 18.-Davis, J. R., Storer, C. E., Wende, R. D. y Hussain, S. M. 1981. Clinical laboratory evaluation of the automicrobic system Enterobacteriaceae biochemical card. J. Clin. Microbiol. 14:370-375.
- 19.-Drucker, D. B. 1974. Chemotaxonomy fatty acids fingerprint of some streptococci with subsequent statistical analysis. Can. J. Microbiol. 20: 1723-1728.
- 20.-Drucker, D. B. 1981. Analysis of structural components of microorganisms by gas chromatography, p. 166-291. In : D. B. Drucker (ed.), Microbiological applications of gas chromatography, Cambridge University Press, Cambridge.
- 21.-Dulbeco, R. y David, B.D. 1985. Tratado de microbiología. Salvat. México.
- 22.-Erola, E. y Lehtone, O. P. 1988. Optimal data processing procedure for automatic bacterial identification by gas-liquid chromatography of cellular fatty acids. J. Clin. Microbiol. 26:1745-1753.
- 23.-Freeman, B. A. 1989. Microbiología de Burrows. Interamericana. México.
- 24.-Gehrek, C. W. y Goerlitz, D. F. 1963. Quantitative preparation of methyl esters of fatty acids for gas chromatography. Analyt. Chem. 35: 76-80.
- 25.-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.

- 26.-Goodfellow, W. y Minniking, D. E. 1985. Introduction of chemosystematics. In chemical methods in bacterial systematics. p. 1-15. Goodfellow, M. y Minniking, D. E. (eds). London y New York : Academic Press.
- 27.Goran, O., Lennart, L. y Anders, M. 1984. Gas Chromatography, Mass Spectrometry Applications in Microbiology. Plenum Press. New York p. 57- 103.
- 28.-Guerrant, G. O., Lambert, M. A., Moss C. W. 1982. Analysis of short-chain acids from anaerobic bacteria by high performance liquid chromatography. J. Clin. Microbiol. 16: 355-360.
- 29.-Häusler, J. y Richter, V. 1983. Identification of bacteria. 12th International Symposium on Microbiol. Association and interaction in food. Publishing House of the Hungarian Academic of Science. Budapest.
- 30.-Hennis, Y., Gould, J. R. y Alexander, M. 1966. Detection and identification of bacterial by gas chromatography. Appl. Microbiol. 14: 513-524.
- 31.-Holmes, B., Willcox, W. R. y Lapage, S. D. 1978. Identification of Enterobacteriaceae by the API 20E system. J. Clin. Pathol. 31:22-30
- 32.-James, A. T. y Martin, J. P. 1958a. Gas-liquid chromatography: the gas density metera new apparatus for the detection of vapours in flowing gas streams. Biochem. 63: 138-14.
- 33.-James, A. T. y Martin, J.P. 1958b. Gas-liquid chromatography: the separation and identification of the methyl esters of saturated and unsaturated acids from formic acid to n-octadecanoico acid. Biochem. 63: 144- 152.

- 34.-Johnson, L. L., Mac Farland, L. V., Dearing, P., Raisys, V. y Sehaenknecht, F.D. 1989. Identification of Clostridium difficile in stool specimens by culture enhanced gas-liquid chromatography. J. Clin. Microbiol. 27 :2218-2221.
- 35.-Kaneda, T. 1967. Fatty acids in the genus Bacillus. I. Iso and anteiso fatty acids ascharacteristics constituents of lipid in 10 species. J. Bacteriol. 93: 894-903.
36. Krieg, N. R. (editor). 1984. Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology. 9th ed. Vol. 15. Williams and Willkins.
- 37.-Lambert, M. A. y Moss, C. W. 1983. Comparison of the effects of acids and base hydrolyses on hydroxi and cyclopropane fatty acids in bacteria. J. Clin. Microbiol. 16:1370-1377.
- 38.-Lapage, S. P. y Shelton, J. P. 1970. Culture Collection and the preservation of bacteria. In: methods in Micobiology. Norris, J. E. y Robbons, W. (eds). Academic Press.
- 39.-Larson, L., Jimenez, J., Sonesson , Anders y Portaels Francoise. 1989. Two dimensional Gas- Chromatography with electron capture detection for the sensitive determination of specific mycobacterial lipid constituent. J. Clin. Microbiol. 27 :2230-2233.
- 40.-Lennette, E. H., Balows, A., Hausler, W y Shadomy, J. 1987. Manual de microbiología clínica. Panamericana. Argentina.
- 41.-Matsuyama, T., Kaneda, K., Ishisuka, I., Toida, T. y Yano, I. 1990. Surface active novel glycolipid and linked 3- hydroxy fatty acids produced by Serratia rubidea J. Bacteriol. 172:3015-3022.

- 42.-Monteoliva-Sánchez, M., Ferrer, M. R., Ramos-Carmenza, A., Quesada, E. y Monteoliva, M. 1989. Cellular fatty acids composition of Deleya halophyla : efect of growth temperature and salt concentration. J. Gen. Microbiol. 134: 199-203.
- 43.-Moss, C. W., Kellogs, D.S., Farshy, D. C., Lambert, M. A. y Thayer, J. D. 1970. Cellular fatty acids of patogenic Neisseria. J. Bacteriol. 104 : 63-68.
- 44.-Moss, C. W. y Nuñez-Montiel, L. 1982. Analysis of short chain acids from bacteria by gas-liquid cromatography with a fused-silica capillary column. J. Clin. Microbiol. 15 : 308-311.
- 45.-Moss, C. W. y Dees, S. B. 1975. Identification of microorganism by gas chromatography-mass espectrometric analysis of cellular fatty acids. J. Chromatog. 112 : 595-604.
- 46.-Moss, C. W., Shinoda, T. y Samuels, J. W. 1982. Determination of cellular fatty acids composition of various yeast by gas liquid chromatography. J. Clin. Microbiol. 15 : 1073-1079.
- 47.-Moss, C. W., Dees, S. B. y Guerrant, G. A. 1980. Gas-liquid chromatography of bacteria fatty acids with a fused-silica capillary column. J. Clin. Microbiol. 12 : 127-130.
- 48.-Okuyama, H., Sasaki, S., Higashi, S. y Murata, N. 1990. A trans-unsaturated fatty acids in a psychrophylic bacterium Vibrio sp.strain ABE-1 . J. Bacteriol. 172 : 3515-3518.
- 49.-Scheleifer, K. H. y Stackenbrand. 1983. Molecular systematics of prokaryotes. Ann. Rev. Microbiol. 37: 143-171.

- 50.-Starr, M. P., Stolp, H., Triiper, H. G. Balows, A. y Schlegel, G. H. (editors) 1981. The prokaryotes : A Handbook of habitats, isolation and identification of bacteria. Spring Verlang. USA.
- 51.-Tomabene, T G. 1983. Lipid analysis and the relationship to chemotaxonomy. Meth. Microbiol. 7: 1538-1542.
- 52.Veys, A., Clallenaerte, W., Waelkens, E. y Abbeele. K. V. 1989. Application of gas liquid chromatohgraphy to the routine identification of nonfermentative gram negative bacteria in clinical specimens. J. Clin. Microbiol. 7:1538 15421.