

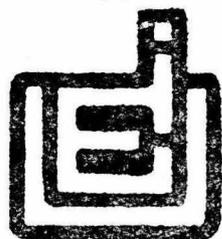


**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
IZTACALA**

**ANÁLISIS CROMATOGRAFICO GAS-LIQUIDO DE LOS  
METILESTERES DE LOS ACIDOS GRASOS CELULARES  
DE klebsiella rhinoscleromatis**

**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  
**EMELIA CAMPOY OTERO**



**LOS REYES IZTACALA**

**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.

**ANALISIS CROMATOGRAFICO GAS-LIQUIDO DE LOS**

**METILESTERES DE LOS ACIDOS GRASOS CELULARES**

**DE Klebsiella rhinoscleromatis**

JURADO:

M. en C. Jesús Medina Soto  
M. en C. Pedro Ramírez García  
I.B.Q. Ma. Eugenia Garín Aguilar  
Dr. Victor Rivera Aguilar  
M. en C. Angel Durán Díaz

DIRECTOR DE TESIS:

M. en C. Pedro Ramírez García

ASESOR DE TESIS:

Q.F.B. Esperanza Robles Valderrama  
Dr. Victor Rivera Aguilar  
M. en C. Angel Durán Díaz

Este trabajo se realizó en los laboratorios de Bacteriología Ambiental y Cromatografía, dentro del proyecto Conservación y Mejoramiento del Ambiente ( CyMA ), en la Unidad de Investigación Interdisciplinaria de las Ciencias de la Salud y la Educación ( U.I.I.C.S.E. ). ENEP Iztacala. U.N.A.M.

A Dios:

Por darme la vida y existir en mi.

Con amor, respeto y admiración

A mis padres:

Gerardo Campoy

y

Alicia Otero

A quienes les debo todo lo que soy. Gracias por mi formación, su apoyo y comprensión que me han brindado desinteresadamente a lo largo de mi vida.

Especialmente ...

Con amor:

A Juan C. por formar parte de mi vida, por su apoyo, comprensión y amor que me brinda día a día.

Por compartir conmigo cada momento vivido en la realización de éste trabajo, con el cual se inicia una vida profesional y que mejor que juntos.

Gracias

Te Amo.

Con cariño a:

Mis hermanos Ismael, Noé, Olga, Elodia, Javier, Rocío.

Por los gratos momentos, y por las desavenencias que pasamos juntos.

Evelio y Margarita:

Por el apoyo que me brindaron cuando más los necesite.

Gracias.

Mis Tíos:

Arturo y Manuel Otero

Gracias por todo su apoyo desinteresado a lo largo de mi vida.

Los Papás de Juan C:

Juan Estrada y Celia Mora.

Por el apoyo y cariño que siempre me han brindado.

A Mis Amigos:

José Ayala, Felipe Aguilar, Julio Trejo, Reynaldo Patiño, Jorge Hernández, Gerardo Bautista, Blanca Martínez, Adriana Cerero, Diana Zayas, Guadalupe Sainz, Gabriela Oliver, Isaura Yañez, Juliana Escalona.

Mi agradecimiento sincero al Dr. Pedro Ramírez G. responsable del laboratorio de Bacteriología Ambiental en el proyecto de Conservación y Mejoramiento del Ambiente en la Unidad de Investigación Interdisciplinaria de las Ciencias de la Salud y la Educación por su dirección y apoyo en la realización de éste trabajo, las oportunidades brindadas y amistad.

Con un reconocimiento especial a mis maestros:

M. en C. Ma. Eugenia Garin

M. en C. Gabriel Camarena

M. en C. Jesús Medina

Que durante mi desarrollo académico, no solo me brindaron sus enseñanzas, sino también su apoyo y amistad.

Agradezco las aportaciones profesionales de:

Dr. Victor Rivera A.

Q.F.B. Esperanza Robles V.

M. en C. Angel Durán D.

A quienes doy las más sinceras gracias por su asesoría y apoyo.

Así como a todas aquellas personas que directa o indirectamente contribuyeron a la elaboración de ésta tesis.

A Todos ellos Gracias.

## INDICE

RESUMEN .....	1
INTRODUCCION .....	2
ANTECEDENTES .....	5
FUNDAMENTOS TEORICOS	
Cromatografía .....	9
Lípidos .....	10
Importancia química de los ácidos grasos .....	10
Esterificación de los ácidos grasos .....	11
Importancia de la familia Enterobacteriaceae .....	12
Características del género <u>Klebsiella</u> .....	13
JUSTIFICACION .....	15
OBJETIVOS .....	16
MATERIALES Y METODO	
Microorganismo y Cultivo .....	17
Preparación de la Biomasa Bacteriana .....	17
Cosecha Bacteriana .....	17
Centrifugación .....	18
Liofilización .....	18
Esterificación .....	19
Evaporación .....	19
Análisis Cromatográfico .....	20
Análisis Estadístico .....	20

RESULTADOS .....	23
DISCUSION .....	34
CONCLUSIONES .....	39
BIBLIOGRAFIA .....	41
ANEXO .....	50

## R E S U M E N

En la década de los sesentas surgió un particular interés por el análisis químico de los ácidos grasos celulares para la identificación de bacterias mediante la cromatografía gas líquido ( CGL ), a partir de ésta propuesta hecha por Abel y colaboradores surgieron una serie de trabajos como los reportados por el Dr. Häusler en 1985, del Instituto de Investigaciones del agua en Praga. La técnica desarrollada por ellos consiste en identificar enterobacterias por CGL a través de la composición de sus ácidos grasos. Para ello es necesario en primer término elaborar un banco de datos partiendo de cepas puras de las principales especies de la familia Enterobacteriaceae con base en sus perfiles lipídicos. Con la información de éste banco de datos se procederá a identificar en un futuro especies de dicha familia aisladas de muestras de agua y aguas de desecho.

La especie estudiada fué Klebsiella rhinoscleromatis (ATCC 13884) cepa tipo proveniente de la American Type Culture Collection.

La metodología a seguir consistió en la obtención de la biomasa, centrifugación, liofilización, esterificación, análisis cromatográfico y análisis estadístico, obteniéndose como ácidos grasos característicos de la especie: del C:12 (dodecanoico) al C:19 (cis-9-10-metilenoctadecanoico). La presencia de los ácidos laúrico, mirístico, palmítico y esteárico en ésta especie permiten ubicarla dentro de la familia Enterobacteriaceae.

De acuerdo con los resultados obtenidos y con base en el análisis estadístico que confirma la reproducibilidad de la técnica, su rapidez y precisión, puede proponerse ésta como una técnica alternativa para la identificación de bacterias aislada de muestras ambientales.

Este trabajo es parte de la línea de investigación "Identificación de Enterobacterias por Cromatografía de Gases" que se realiza en el laboratorio de Bacteriología ambiental dentro del proyecto Conservación y Mejoramiento del Ambiente (CyMA) en la Unidad de Investigación Interdisciplinaria de las Ciencias de la Salud y la Educación ( U.I.I.C.S.E. ) en la Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala ( E.N.E.P.I. ), U.N.A.M.

## I N T R O D U C C I O N

Durante años, se han venido desarrollando métodos de identificación bacteriana que son utilizados de manera rutinaria para el diagnóstico en hospitales, laboratorios de salud pública, industria alimentaria, y laboratorios de microbiología. La aplicación de estas técnicas físicas y químicas han elucidado la composición química de las células bacterianas y han generado información de gran valor en la clasificación e identificación bacteriana (2) (10) (13).

Los métodos convencionales de identificación, se basan en técnicas morfológicas, bioquímicas y se complementan por tipificación serológica; a pesar de los resultados satisfactorios que proporcionan, el microbiólogo se enfrenta a los problemas de manejar en un momento dado, tablas de datos con tanta información que en ocasiones por razones técnicas y de tiempo no se analiza totalmente (2). Este problema se ha visto reducido en parte, con la aplicación de la taxonomía numérica desarrollada a finales de los años cincuentas como parte de un análisis multivariado y en forma paralela con el desarrollo de las computadoras, como una alternativa para la identificación y clasificación de los microorganismos, minimizando de esta manera la posibilidad de error en la ubicación taxonómica de un microorganismo (2) (10) (30).

Con ésta orientación se proyectaron un conjunto de métodos, creados por la necesidad de simplificar los procesos de

identificación bacteriana, entre los que se puede citar por ejemplo el sistema comercial API (2) (42).

El uso de estos sistemas comerciales, basados en micropruebas, de alguna manera simplifican la identificación bacteriana sobre todo en enterobacterias, procurando estandarizar a los laboratorios que los utilizan. Sin embargo con esta ventaja no se soluciona totalmente el problema de la identificación, pues se basa en el mismo principio de las pruebas bioquímicas de los microorganismos (2). Todas éstas deficiencias han motivado a los bacteriólogos a desarrollar métodos que se basen no sólo en la utilización de sustratos por vías metabólicas sino también en sus características estructurales y sobre todo en su composición química, tales como la espectrometría de masas, espectrometría ultravioleta y cromatografía de gas líquido (6) (22) (31).

Surge entonces la posibilidad de utilizar el método de análisis cromatográfico gas-líquido (CGL) como una opción para la identificación y clasificación bacteriana a nivel químico visualizándose como uno de los métodos más prometedores en el área microbiológica (10) (39).

Esta técnica de Cromatografía de Gases, fué introducida por James y Martin, y en la actualidad se ha adaptado para la identificación bacteriana, indicando que es posible diferenciar organismos de distintos géneros y especies partiendo de un cromatograma característico empleándolo como una huella digital

específica para su identificación, reconocible a partir de bacterias tipo (38) (42).

Las ventajas del método cromatográfico, se basan en la determinación de los ácidos grasos celulares en bacterias, expresando los resultados en tiempos y áreas, se establece además la posibilidad de automatizar el proceso que es rápido y de fácil aplicación, reduciendo el tiempo a un mínimo y proporcionando al microbiólogo un buen apoyo en la identificación de los cultivos (7) (14) (37) (47).

Los resultados que se han obtenido hasta la fecha confirman las ventajas del método de identificación por cromatografía gas líquido el cual no solamente facilita la detección de cantidades traza de ácidos grasos, sino también hace posible la separación de los ácidos grasos insaturados de los saturados, se requiere de una pequeña cantidad de muestra, es además un método rápido y facilita el análisis cualitativo y cuantitativo de manera simultánea (36) (40) (42).

A pesar de las ventajas del método, no puede omitirse que se requiere de instrumentos especiales y de una inversión económica inicial fuerte, pero por otro lado es menor el trabajo en cuanto a la preparación del material de vidrio y medios de cultivo necesarios en comparación con los métodos convencionales de identificación (1) (18) (26).

## A N T E C E D E N T E S

En la década de los 60's se sugirió el análisis químico como una alternativa en la clasificación e identificación de microorganismos (55) (58), a partir de ésta propuesta surge entonces la posibilidad de emplear el análisis por cromatografía de gas líquido como un método estándar en la identificación y clasificación de bacterias (2) (48).

El término cromatografía se aplica para la técnica de separación de químicos, contando al menos con dos porciones de soluto entre una fase móvil y una estacionaria o absorción selectiva de un sólido (10) (12).

Entre los primeros trabajos en el área de la cromatografía se encuentran los realizados por bioquímicos rusos como Tswett's (51), quien describió cómo la clorofila se separaba de otros pigmentos usando una columna de carbonato de calcio con éter de petróleo como la fase móvil. El método que Tswett's propuso se basó en la adsorción de un soluto a un sólido representando un ejemplo de cromatografía de absorción líquido-sólido.

James y Martin, en 1956 realizaron el primer análisis por Cromatografía de Gas Líquido (CGL) para determinar los ácidos grasos bacterianos, esterificando un extracto de éter de acetona soluble en un medio de cultivo de Pseudomonas aeruginosa con diazometano (27) (51).

Fué Oyama hasta 1963 (42) quien sugirió la aplicación del

método de cromatografía de gas líquido en el análisis de los componentes o productos celulares bacterianos, proponiendo la pirólisis de los compuestos presentes en los microorganismos para la diferenciación taxonómica.

Más tarde Abel y colaboradores, a quienes se les considera los fundadores de una nueva dirección en la bacteriología moderna, introducen ésta técnica para determinar especies de la familia Enterobacteriaceae, ilustran que el análisis cualitativo de ácidos grasos puede ser útil para la distinción entre bacterias entéricas (1) (11) (42).

Machtiger y O'Leary, distinguieron los géneros de Arizona, Citrobacter y Providencia de acuerdo al contenido de ácidos grasos celulares. Así mismo Vasjurenko y colaboradores encontraron diferencias mínimas en las especies pertenecientes a los géneros Escherichia, Salmonella y Shigella de lo que concluyeron que éstos organismos están estrechamente relacionados (4) (46).

Abel, Yamakawa y Ueta así como Steinhauer reportan la extracción y transesterificación de material lipídico de varias especies de la familia Enterobacteriaceae obteniendo el patrón de los ácidos grasos por cromatografía gas líquido (42) (49).

Empleando una técnica similar Farsh, Moss y Brooks identificaron y compararon arreglos de los ácidos grasos de diferentes especies de Clostridium así como el patrón en la fermentación anaeróbica (20) (38).

Drucker, Amstein y Hartman a través del análisis por CG lograron diferenciar 37 especies entéricas, comparando la composición relativa de sus ácidos grasos (21) (42).

Mitruka y Jonas reportaron diferencias entre varias especies de Mycobacterium, Streptococcus y Pneumococcus utilizando el análisis por CG y compararon su composición de carbohidratos (42).

Porter ha revisado los trabajos en éste campo desde 1946 complementando la información de los ácidos grasos tal como el ácido arachídico en Pseudomonas aeruginosa, y el ácido behénico en Corynebacterium (1) (42).

James y Martin encontraron evidencias de ácidos grasos saturados de cadena lineal C<sub>15</sub> y C<sub>17</sub> y reportan en Pseudomonas aeruginosa cierto número de ácidos grasos del C<sub>8</sub> al C<sub>19</sub>. Goldfine y Bloch (15) encuentran el mismo ácido de cadena lineal C<sub>15</sub> pero en Clostridium butyricum (31).

Masuo y Nakagawa encontraron el ácido β-hidroxidecanoico en Escherichia coli e Ikawa y colaboradores encuentran el ácido β-hidroxiimírico en la misma especie (23).

Para 1952, Maclowry, y Selepak encontraron el ácido octadecanoico en Lactobacillus arabinosus conocido en la actualidad como (cis-11-octadecanoico) (1).

Moss y Nunez determinaron ácidos grasos de cadena corta

por cromatografía gas líquido en Clostridium difficile, los ácidos grasos determinados fueron acético, propiónico, isobutírico, butírico, isovalérico, e isocaproico y en cantidades pequeñas el indolacético, concluyendo que uno o más de estos compuestos pueden ser también producidos por otros Clostridium y otras bacterias anaerobias (39).

Veys y colaboradores identificaron especies de bacterias Gram negativas no fermentativas aplicando la CGL; tras el análisis de cinco repeticiones por especie determinaron 23 ácidos grasos de los cuales sólo 12 los reconocieron como marcas importantes del grupo (58).

Hidetoshi y Shoji determinaron ácidos grasos transinsaturados en Vibrio sp. por CGL, del total de metilésteres de los ácidos grasos celulares. Demostraron que el mayor ácido graso de los glicerolípidos y fosfolípidos fué el C<sub>16</sub>, C<sub>16:1</sub> y el C<sub>18:1</sub>, concluyendo que la presencia de éstos ácidos grasos transinsaturados son estrictamente de 3 géneros: Vibrio, Pseudomonas y Eubacterium (24).

Actualmente los últimos estudios que se desarrollan en ésta área tienen como objetivo el de estandarizar los parámetros de crecimiento para cada uno de los grupos bacterianos, así como la variación en la presencia y concentración de los ácidos grasos propios de cada grupo bacteriano (48) (41) (50) (52).

## FUNDAMENTOS TEORICOS

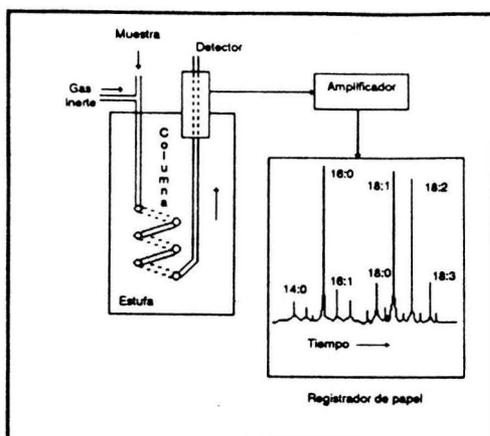
### CROMATOGRAFIA

De acuerdo con Mitruka 1979 la cromatografía gas líquido es un método de separación de los componentes de una mezcla volátil por partición entre dos fases, una fase estacionaria y una fase móvil. Cuando la fase estacionaria es un líquido se habla de cromatografía gas líquido y cuando la fase estacionaria es un sólido como carbón o silica gel se le llama cromatografía gas sólido (42).

En este procedimiento los ácidos grasos son convertidos, en primer lugar, en una forma más volátil generalmente sus ésteres metílicos, empleando un transportador inerte gaseoso como el nitrógeno, como fase móvil (35).

Las partes integrantes de un cromatógrafo de gases son:

- 1) gas acarreador
- 2) inyector
- 3) horno
- 4) columna
- 5) detector
- 6) registrador



## LIPIDOS

Los lípidos son moléculas orgánicas insolubles en agua. Desempeñan diversas funciones biológicas importantes, en las que actúan como: 1) componentes estructurales de las membranas, 2) formas de transporte y almacenamiento del combustible catabólico, 3) cubierta protectora sobre la superficie de muchos microorganismos y 4) componentes de la superficie celular relacionados con el reconocimiento de las células (35) (44).

## IMPORTANCIA QUIMICA DE LOS ACIDOS GRASOS

Los ácidos grasos son ácidos carboxílicos obtenidos de la hidrólisis de ésteres. Presentan las siguientes propiedades: 1) son principalmente ácidos monocarboxílicos que contienen un grupo carboxílico ionizable y una cadena hidrocarbonada apolar ácida y no ramificada. 2) Generalmente poseen un número par de átomos de carbono, aunque se han encontrado con número impar, 3) pueden ser

saturados o no saturados con una o más dobles ligaduras (25) (32) (57).

Las investigaciones actuales demuestran que una determinación de los ácidos grasos de células intactas es muy importante para la sistemática bacteriana. Los grupos más importantes de las bacterias Gram negativas generalmente son examinados en relación a su composición de ácidos grasos, se conocen más de 50 tipos de ácidos grasos bacterianos y generalmente algún ácido de cierta categoría predomina dentro de un cierto taxón (43) (58). En bacterias Gram negativas la identificación puede lograrse a nivel de género a través del perfil de ácidos grasos (9) (11) (22).

Las bacterias contienen menor abundancia y tipos más simples de ácidos grasos que los organismos eucariotes, poseen ácidos grasos saturados algunos de los cuáles poseen un grupo metilo ramificado, así como ácidos monoinsaturados. No se han encontrado ácidos grasos con más de una doble ligadura (35) (53).

#### **ESTERIFICACION DE LOS ACIDOS GRASOS**

De acuerdo con Fessenden (1983), la esterificación de los ácidos grasos es la reacción más destacable del grupo carboxílico, en la cual una molécula de ácido y de alcohol reaccionan reversiblemente para originar una molécula de éster y de agua (16).



Esta reacción de esterificación del ácido carboxílico transcurre a través de una serie de pasos de protonación. Se protona el oxígeno carbonílico, el alcohol nucleofílico ataca el carbono positivo y la eliminación de agua produce el éster.

#### IMPORTANCIA DE LA FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE

Uno de los aspectos importantes de esta familia radica en que algunos de sus géneros forman parte del grupo coliforme cuya presencia está relacionada con enfermedades gastrointestinales, dentro de éste se incluye el grupo de coliformes totales y coliformes fecales; desde el punto de vista sanitario, el más importante es el de coliformes fecales dada la asociación con excretas de animales de sangre caliente y una variedad de microorganismos patógenos entéricos (2).

Dentro de éste grupo entérico se encuentran varias bacterias patógenas como Shigella y Salmonella, otras habitan en el intestino como flora normal, y otras solo bajo circunstancias excepcionales causan infecciones como E.coli y Enterobacter. Así también las hay oportunistas patógenas como es el caso del género Proteus y Klebsiella (2) (41).

Los miembros de la familia Enterobacteriaceae se caracterizan por ser bacilos Gram negativos, facultativos, con o sin flagelos peritricos, no esporógenos, crecen con facilidad en medios sintéticos simples, tanto en condiciones aerobias como anaerobias. Utilizan la glucosa de manera fermentativa con la formación de ácidos y gases, reduciendo los nitratos a nitritos dando una reacción negativa frente a la oxidasa, en cuanto a la morfología de las colonias, éstas tienden a ser lisas, húmedas y brillantes, normalmente son de color gris, con frecuencia se ven colonias rugosas las cuales a menudo son viables.

#### **CARACTERISTICAS DEL GENERO KLEBSIELLA.**

El género Klebsiella (Trevisan 1885) de acuerdo a la definición de la familia Enterobacteriaceae presenta las siguientes características:

**Habitat:** Afectan el tracto respiratorio principalmente, encontrándose normalmente en el intestino de animales y del hombre, así como en el suelo, polvo, aire y agua.

**Reacciones Bioquímicas:** Dan positiva la prueba de Voges-Proskauer, no licúan la gelatina, producen lisina descarboxilasa, hidrolizan la arginina, no descarboxilan la ornitina, forman gas de inositol y glicerol, adonitol, producen ácido a partir de sorbitol, ramnosa, arabinosa y rafinosa; fermenta la glucosa, no descomponen la urea, son oxidasa negativos.

**Morfología:** En cuanto a su morfología presenta las mismas características de la familia, de ser bacilos Gram negativos,

facultativos, con o sin flagelo peritricos, producen colonias lisas, húmedas y brillantes, generalmente de color gris.

**Reacciones Serológicas:** Posee un antígeno protéico somático de grupo específico y un antígeno polisacárido capsular tipo específico (2) (14) (41).

Los organismos del género Klebsiella son considerados patógenos oportunistas que pueden crear un sinnúmero de infecciones, siendo las más comunes las del tracto urinario de origen nosocomial, aunque se les ha encontrado en heces, absesos, sangre, esputos y fluidos corporales de individuos infectados (2) (5) (14).

En casos recientes se han incrementado las infecciones por Klebsiella particularmente en hospitales, aunque se ha encontrado que provoca diarrea aguda en menores de edad. Su patogenicidad se ha relacionado con ciertas enfermedades inflamatorias crónicas de las vías respiratorias superiores, tal es el caso de K. rhinoscleromatis (2) (41).

K. rhinoscleromatis comparte las mismas características de su género, se ha aislado en casos de escleroma (infección granulomatosa crónica de las vías respiratorias superiores) ocurriendo frecuentemente en nariz y faringe (14) (41). El escleroma no se presenta frecuentemente, pero es endémico de ciertas áreas del Este, Centro de Europa y Sur de América Central (14) (41).

## J U S T I F I C A C I O N

Una de las necesidades que tiene la bacteriología es el de contar con técnicas de identificación adecuadas, enfocadas a la determinación de microorganismos patógenos como es el caso de las Enterobacterias. Algunas de éstas bacterias son utilizadas como indicadores bacteriológicos de contaminación fecal como es el grupo coliforme y otras que provocan enfermedades de tipo gastrointestinal que son causa de morbi-mortalidad infantil.

Dada la importancia que tienen éstos microorganismos por su presencia en el ambiente y en la salud pública, es necesario contar con métodos rápidos de identificación mediante la cromatografía de gases.

En la E.N.E.P. Iztacala se implementó la técnica de cromatografía de gases, misma que se pretende estandarizar como una técnica rutinaria para la identificación de bacterias, para lo cual es necesario contar con los perfiles cromatográficos de las principales especies de la familia Enterobacteriaceae.

El objetivo fué obtener el perfil cromatográfico de los ácidos grasos de Klebsiella rhinoscleromatis que formará parte de un banco de datos para la familia Enterobacteriaceae.

El desarrollo de ésta técnica en nuestro país promete mucho en el área de la investigación bacteriológica, pudiendo aplicarse en otras, tales como en alimentos, veterinaria, agricultura y clínica entre otras.

## O B J E T I V O S

### OBJETIVO GENERAL:

Obtención del perfil cromatográfico de los metilésteres de los ácidos grasos de Klebsiella rhinoscleromatis (ATCC 13884) por Cromatografía de Gases.

### OBJETIVOS PARTICULARES:

Manejo de la técnica cromatográfica para la determinación de los ácidos grasos constituyentes de K. rhinoscleromatis.

Obtención del perfil cromatográfico de K. rhinoscleromatis con base en la identificación de sus ácidos grasos celulares y que será utilizado como un criterio taxonómico para ésta bacteria.

## M A T E R I A L E S Y M E T O D O

### Microorganismo y Cultivo:

La especie bacteriana usada en el presente estudio fué Klebsiella rhinoscleromatis (13884) obtenida directamente del ATCC, cultivada y mantenida en Agar Nutritivo Difco Lote (787815). La cepa fué depositada para su conservación a largo plazo en la Colección de Cultivos Microbianos del CINVESTAV-IPN.

### Preparación de Biomasa Bacteriana

Para la preparación de la biomasa se partió de un cultivo proveniente de la cepa pura, se realizó un pase en agar inclinado incubándolo a 37 °C por 24 h. De éste cultivo se resembró en placa a 37 °C por 24 h para aislar una colonia que se utilizó para un sembrado masivo en placa (dos cajas por muestra). Cada caja de Petri de 10 cm de diámetro con 25 mL de medio nutritivo.

### Cosecha Bacteriana

Para la cosecha de bacterias se utilizó una solución de formaldehído al 0.5%, varillas de vidrio en forma de "L", embudos de vidrio, tubos de centrifuga, pipetas de 5 mL (Todo el material previamente esterilizado en autoclave a 15 lbs/15 min). Después de obtener un crecimiento abundante en las cajas de Petri se procedió a adicionar 5 mL de formaldehído a cada una de las cajas, lavando suavemente con ayuda de la varilla de vidrio, este proceso se realizó con la finalidad de fijar y cosechar la bacteria.

El contenido de 2 cajas de Petri (10 mL) fué vertido en tubos de centrifuga (previamente lavados con hexano ó acetona) mediante un embudo de vidrio para su posterior centrifugación.

### **Centrifugación**

Una vez preparados los tubos conteniendo la cosecha bacteriana se procedio a centrifugarlos a 15 000 rpm/10 min a una temperatura de 4 °C.

El sobrenadante del primer centrifugado fué desechado, agregando posteriormente 5 mL de solución fisiológica de cloruro de sodio 0.85% con la finalidad de realizar un lavado. Este proceso se repitió una vez más bajo las mismas condiciones.

Al término del proceso de centrifugación, el paquete celular obtenido fué transferido a frascos viales previamente lavados con hexano y secados en estufa. La transferencia del paquete celular se realizó con la ayuda de una cucharilla metálica, repartiéndose perfectamente la biomasa sobre las paredes de los frascos con la finalidad de obtener un secado más rápido y eficiente durante la liofilización.

### **Liofilización**

El paquete celular obtenido se liofilizó a -50 °C. Este proceso de liofilización se llevó a cabo en un lapso de 3 h con un vacío total. Para un secado más rápido la muestra se congeló previamente empleando hielo seco y acetona.

### **Esterificación**

El proceso de esterificación se realizó de acuerdo a Glass (17). Este proceso consistió en agregar a cada una de las muestras (20 mg de muestra liofilizada) 1 mL de solución de metóxido de sodio (solución A) agitando durante 5 min, posteriormente se les adicionaron de 0.6 mL a 0.7 mL de solución de metanol saturado con cloro gas (solución B) alcanzando las muestras un pH de 1-2. Se agitaron por un período de 30 min. Al término de éste tiempo se agregaron 2 mL de solución fisiológica de cloruro de sodio 0.85% (solución C) a cada muestra, agitándose posteriormente por 5 min.

La extracción de los ésteres metílicos se realizó adicionando 1 mL de hexano manteniendo las muestras en agitación durante 5 min. La capa de hexano, con los ésteres metílicos se extrajo con una pipeta Pasteur (capa superior transparente) y se transfirió a tubos de ensaye con sulfato de sodio anhídrido esto último para extraer el agua que aún estuviera presente. La extracción de los ésteres metílicos se repitió 3 veces más para cada una de las muestras.

### **Evaporación**

Para evaporar el hexano de las muestras se empleó un flujo de gas nitrógeno hasta obtener un volúmen final de 10  $\mu$ L. Con una microjeringa se tomó 1  $\mu$ L y se inyectó en el cromatógrafo gas-líquido.

### **Análisis Cromatográfico**

1  $\mu$ L de la muestra de metilésteres obtenidos de la extracción se analizó en un cromatógrafo HP 5890 A (Hewlett Packard) equipado con un detector de ionización de flama y una columna capilar (FS-150 DODIDED FSOT) de Polidimetilsiloxano de 30 m x 0.25 mm de diámetro interior.

La temperatura inicial de la columna fué de 120 °C a 250 °C incrementándose 4 °C/min. La temperatura de inyector y del detector se mantuvo a 270 °C. Utilizando nitrógeno como gas acarreador con un flujo de 30 mL/min.

Los metilésteres de los ácidos grasos se identificaron por la comparación de sus tiempos de retención con un estándar comercial para enterobacterias. Estos tiempos de retención y áreas se registraron en un integrador HP (Hewlett Packard).

El tiempo del análisis cromatográfico fué de un promedio de 35 min, los ácidos grasos eluidos fueron de 12 a 20 carbonos de longitud.

### **Análisis estadístico**

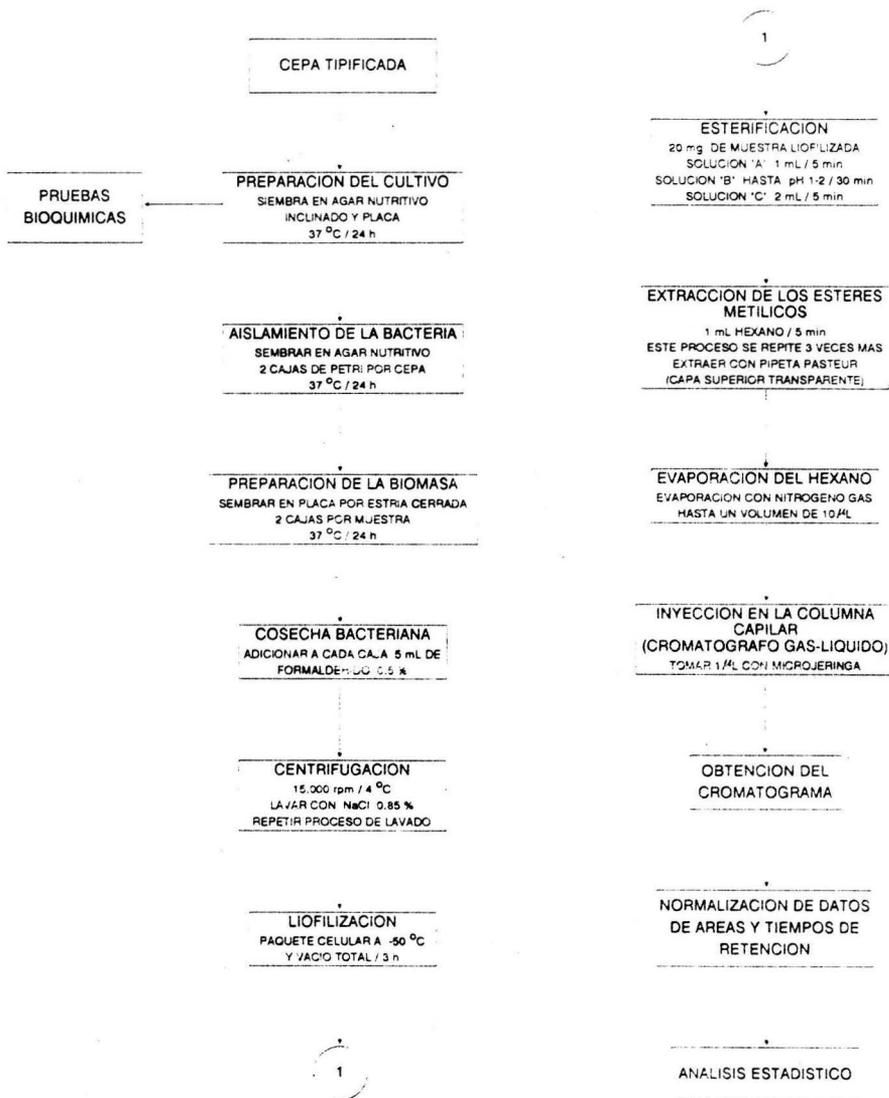
Una vez determinados los picos de importancia en el cromatograma se procedió al procesamiento de la información.

Este proceso se inició con la normalización de los datos obtenidos, transformando los valores numéricos de áreas y tiempos

porcentajes en relación a un dato base de área y tiempo, tomando como referencia el 100% para aquel ácido graso con el área más alta, asociándose así mismo el tiempo de retención. Una vez obtenidos los datos normalizados se procedió a ordenarlos y a graficarlos para las 50 repeticiones realizadas.

Posteriormente se calcularon las siguientes medidas descriptivas: media aritmética, desviación estándar y coeficiente de variación para cada una de las áreas y tiempos de retención de los picos de los ácidos grasos, y se construyeron gráficas de barras con base en los valores obtenidos de cada ácido graso.

**FIG. 1. DIAGRAMA DEL METODO CROMATOGRAFICO PARA LA DETERMINACION DE LOS ACIDOS GRASOS CELULARES DE BACTERIAS.**



SOLUCION "A". METOXIDO DE SODIO  
 SOLUCION "B". METANOL SATURADO CON CLORO GAS  
 SOLUCION "C". SOLUCION FISIOLÓGICA DE CLORURO DE SODIO 0.85%

## R E S U L T A D O S

La figura No. 2 muestra un cromatograma de la solución utilizada como estándar consistente en una mezcla de metilésteres de los ácidos grasos SUPELCO LA-26755 de la familia Enterobacteriaceae. Este estándar establece la presencia e identidad de 26 ácidos grasos, el cuál sirvió de referencia para la identificación de los ácidos grasos extraídos de Klebsiella rhinoscleromatis por comparación de sus tiempos de retención, analizando los resultados obtenidos de los ácidos grasos de manera cualitativa y cuantitativa.

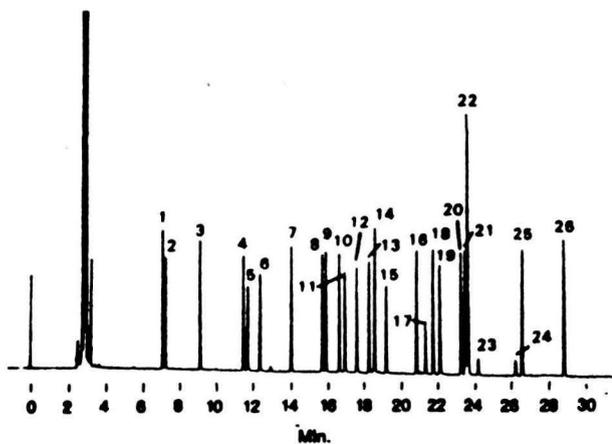
El cuadro No. 1 resume la composición de los principales ácidos grasos aislados de K. rhinoscleromatis, en términos de presencia y ausencia e identificados como picos característicos en el cromatograma los cuales fueron: el ácido dodecanoico, tetradecanoico, pentadecanoico, 3-hidroxitetradecanoico, cis-9-hexadecenoico, hexadecanoico, cis-9-10-metilenehexadecenoico, heptadecanoico, cis-9-12-octadecenoico, trans-9-octadecenoico, octadecanoico y cis-9-10-metileneoctadecenoico; citados de acuerdo al orden de elución a través de la columna capilar.

Los cuadros 2 y 3 muestran las medidas descriptivas media, desviación estándar, coeficiente de variación, valor máximo y valor mínimo para áreas y tiempos de retención respectivamente de cada ácido graso identificados en K. rhinoscleromatis.

## FIGURA 2.

### MEZCLA DE LOS METILESTERES DE LOS ACIDOS GRASOS BACTERIANOS.

ESTA MEZCLA CONTIENE UN TOTAL DE 10 mg/mL DE METILESTERES EN METIL CAPROATO.



1.	11:0	Me. undecanoato
2.	2-OH 10:0	Me. 2-hidroxicanoato
3.	12:0	Me. dodecanoato
4.	13:0	Me. tridecanoato
5.	2-OH 12:0	Me. 2-hidroxicododecanoato
6.	3-OH 12:0	Me. 3-hidroxicododecanoato
7.	14:0	Me. tetradecanoato
8.	1-15:0	Me. 15-metiltetradecanoato
9.	a-15:0	Me. 12-metiltetradecanoato
10.	16:0	Me. pentadecanoato
11.	2-OH 14:0	Me. 2-hidroxitetradecanoato
12.	3-OH 14:0	Me. 3-hidroxitetradecanoato
13.	1-16:0	Me. 14-metilpentadecanoato
14.	16:1 <sup>o</sup>	Me. cis-9-hexadecanoato
15.	16:0	Me. hexadecanoato
16.	1-17:0	Me. 15-metilhexadecanoato
17.	17:0	Me. cis-9,10-metilenehexadecanoato
18.	17:0	Me. heptadecanoato
19.	2-OH 16:0	Me. 2-hidroxiheptadecanoato
20.	18:2 <sup>o,12</sup>	Me. cis-9,12-octadecadienoato
21.	18:1 <sup>o</sup>	Me. cis-9-octadecenoato
22.	18:1 <sup>o</sup>	Me. trans-9-octadecenoato
	18:1 <sup>1</sup>	Me. cis-11-octadecenoato
23.	18:0	Me. octadecanoato
24.	19:0	Me. cis-9,10-metileneoctadecanoato
25.	19:0	Me. nonadecanoato
26.	20:0	Me. eicosenoato

**CUADRO 1. PRINCIPALES ACIDOS GRASOS AISLADOS EN  
*Klebsiella rhinoscleromatis*.**

ACIDO GRASO	NOMBRE SISTEMATICO	NOMBRE COMUN
C 12:0	Dodecanoico	Láurico
C 14:0	Tetradecanoico	Mirístico
C 15:0	Pentadecanoico	—
C 14:0 3-OH	3-Hidroxitetradecanoico	$\beta$ -Hidroxi mirístico
C 16:1 <sup>o</sup>	Cis-9-hexadecenoico	Palmitoléico
C 16:0	Hexadecanoico	Palmitico
C 17:0 $\Delta$	Cis-9-10-metilenehexadecanoico	—
C 17:0	Heptadecanoico	Margárico
C 18:2 <sup>o,12</sup>	Cis-9-12-octadecenoico	Linoléico
C 18:1 <sup>o</sup>	Trans-9-octadecenoico	Elaidico
C 18:0	Octadecanoico	Estearico
C 19:0 $\Delta$	Cis-9-10-metileneoctadecanoico	—

Acidos grasos citados según el orden de elución  
a través de la columna de cromatografía gas-líquido.

CUADRO 2.

MEDIDAS DESCRIPTIVAS DE LOS TIEMPOS DE RETENCION  
DE CADA ACIDO GRASO IDENTIFICADO EN  
*Klebsiella rhinoscleromatis.*

ACIDO GRASO	N	MEDIA %	D.STD.	C.V. %	MIN.	MAX.
12:0	50	42.32	0.19	0.44	41.86	42.75
14:0	50	68.82	0.22	0.33	68.29	69.35
15:0	50	83.41	0.36	0.44	82.49	84.17
14:0 3-OH	50	89.09	0.36	0.41	82.20	89.62
16:1 <sup>9</sup>	50	95.38	0.19	0.20	94.95	95.76
16:0	50	100.00	0	0	100.00	100.00
17:0 $\Delta$	50	111.39	0.23	0.20	110.81	111.80
17:0	50	113.82	1.84	1.61	112.63	126.25
18:2 <sup>9,12</sup>	50	122.09	0.71	0.58	120.67	124.52
18:1 <sup>9</sup>	50	125.50	0.22	0.18	125.06	125.84
18:0	50	128.17	0.50	0.39	127.08	129.06
19:0 $\Delta$	50	139.73	0.66	0.47	138.24	140.82

N = Número de cromatogramas realizados.

D.STD.= Desviación estándar.

C.V.= Coeficiente de variación.

MIN.=Valor mínimo.

MAX.= Valor máximo.

CUADRO 3.

MEDIDAS DESCRIPTIVAS DE LAS AREAS  
DE CADA ACIDO GRASO IDENTIFICADO  
EN *Klebsiella rhinoscleromatis*.

ACIDO GRASO	N	MEDIA %	D.STD.	C.V. %	MIN.	MAX.
12:0	50	3.20	1.57	48.79	0.98	8.23
14:0	50	10.40	2.40	23.22	7.02	18.74
15:0	50	2.50	0.36	14.51	1.85	3.82
14:0 3-OH	50	4.20	2.12	49.95	1.86	12.50
16:1 <sup>9</sup>	50	42.80	6.97	16.29	33.14	75.60
16:0	50	100.00	0	0	100.00	100.00
17:0 <sub>Δ</sub>	50	33.50	4.02	12.00	22.16	48.74
17:0	50	3.50	0.49	14.07	2.71	5.57
18:2 <sup>9,12</sup>	50	0.20	0.03	17.69	0.13	0.30
18:1 <sup>9</sup>	50	58.90	9.35	15.87	15.80	71.18
18:0	50	2.30	0.29	12.99	1.82	3.63
19:0 <sub>Δ</sub>	50	1.90	0.26	14.03	1.30	2.48

N = Número de cromatogramas realizados.

D.STD.= Desviación estándar.

C.V.= Coeficiente de variación.

MIN.= Valor mínimo.

MAX.=Valor máximo.

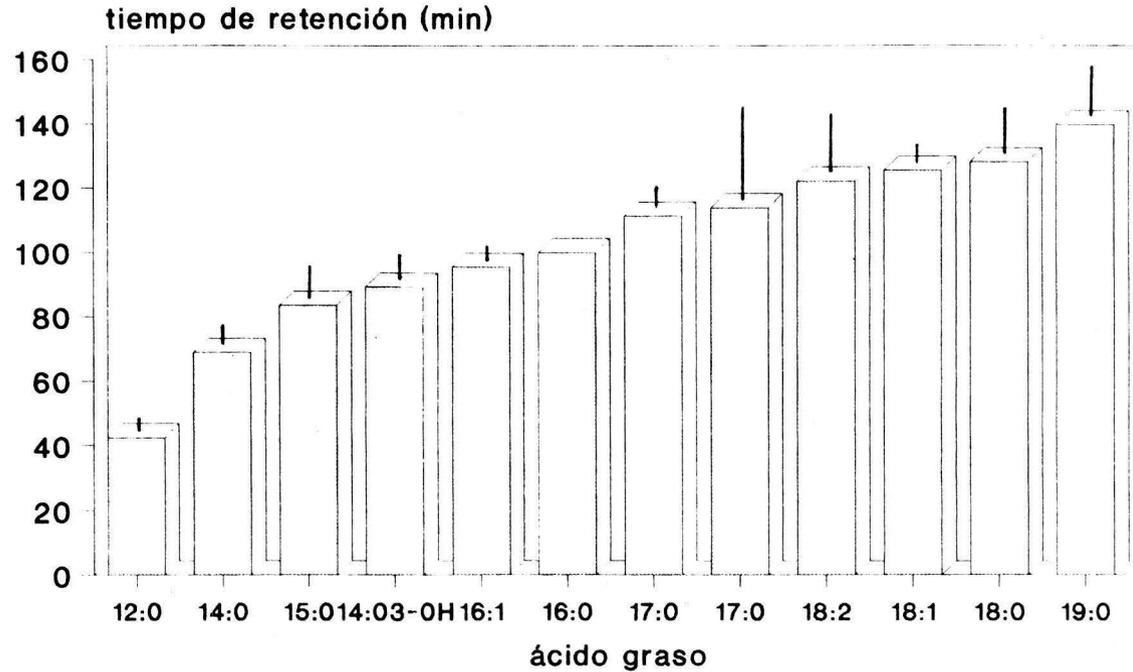
La figura No. 3 muestra los ácidos grasos identificados para K. rhinoscleromatis con base a la media de los tiempos de retención para cada uno de ellos expresado en porcentaje, en cada barra se encuentra la desviación estándar asociada. Obsérvese que a medida que pasa el tiempo del análisis, aumenta también el tiempo de retención para cada ácido graso de tal manera que el orden de elución de los ácidos grasos va relacionado con el número de átomos de carbono de cada componente de la muestra. Siendo el ácido graso **dodecanoico** el primero en eluir con un tiempo de retención (T.R.) de 42.32%, una desviación estándar (D.S.) de 0.19 y un coeficiente de variación (C.V.) de 0.44%; el **tetradecanoico** con un T.R. de 68.82%, una D.S. de 0.22 y un C.V. de 0.33%; **pentadecanoico** con un T.R. de 43.41%, una D.S. de 0.36 y un C.V. de 0.44%; el **3-hidroxitetradecanoico** con un T.R. de 89.09%, una D.S. de 0.36 y un C.V. de 0.41%; el **cis-9-12-hexadecenoico** con un T.R. de 95.38%, una D.S. de 0.19 y un C.V. de 0.20%; el **cis-9-10-metilenehexadecanoico** con un T.R. de 111.39%, una D.S. de 0.23 y un C.V. de 0.20%; el **heptadecanoico** con un T.R. de 113.825, D.S. de 1.84 y un C.V. de 1.61%; el **cis-9-12-octadecenoico** con un T.R. de 122.09%, una D.S. de 0.71 y un C.V. de 0.58%; el **trans-9-octadecenoico** con un T.R. de 125.50%, una D.S. de 0.22 y un C.V. de 0.18%; el **octadecanoico** con un T.R. de 128.17%, una D.S. de 0.50 y un C.V. de 0.39%; y por último el **cis-9-10 metileneoctadecanoico** con un T.R. de 139.73%, una D.S. de 0.66 y un C.V. de 0.47%.

La figura No. 4 muestra los ácidos grasos de K. rhinoscleromatis con base a la media de las áreas de cada uno de los ácidos grasos identificados expresado en porcentaje. En cada barra se asocia la desviación estándar. En orden de abundancia se observa que los que registraron mayor área fueron el **trans-9-octadecenoico** (linoléico) con un área de 58.90%, una D.S. de 9.35 y un C.V. de 15.87%; el **cis-9-hexadecenoico** (palmitoléico) con un área de 42.80%, una D.S. de 6.97 y un C.V. de 16.29%; y el **cis-9-10-metilenehexadecanoico** con un área de 33.50%, una D.S. de 4.02 y un C.V. de 12.00%.

En cantidad moderada se detectó el ácido **tetradecanoico** (mirístico) con un área de 10.40%, una D.S. de 2.40 y un C.V. de 23.22%. En pequeñas cantidades se detectaron los ácidos **3-hidroxitetradecanoico** (  $\beta$ -hidroximirístico ) con un área de 4.20%, una D.S. de 2.12 y un C.V. de 49.95%; el **heptadecanoico** (margárico) con un área de 3.50%, una D.S. de 0.49 y un C.V. de 14.07%; el **dodecanoico** (láurico) con un área de 3.20%, una D.S. de 1.57 y un C.V. de 48.79%; el **pentadecanoico** con un área de 2.50%, una D.S. de 0.36 y un C.V. de 14.51%; y el **octadecanoico** (esteárico) con un área de 2.30%, una D.S. de 0.29 y un C.V. de 12.99%. Y en mínimas cantidades se detectaron los ácidos **cis-9-10-metileneoctadecanoico** con un área de 1.90%, una D.S. de 0.26 y un C.V. de 14.03%; y el **cis-9-12-octadecenoico** (linoléico) con un área de 0.20%, una D.S. de 0.03 y un C.V. de 17.69%.

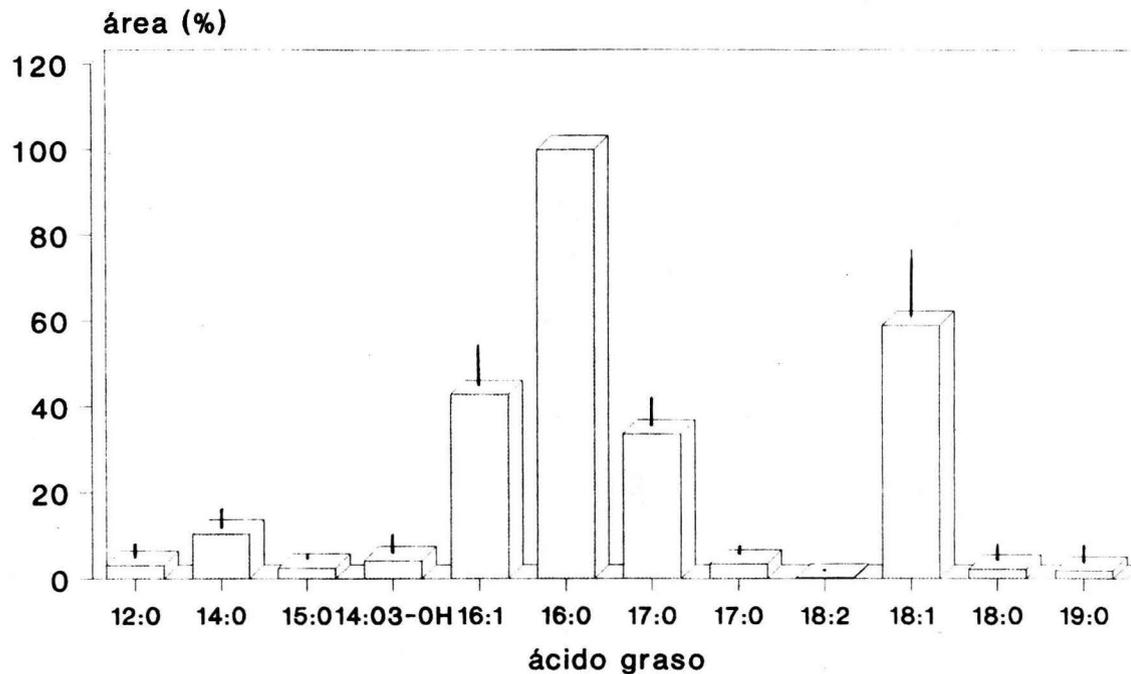
La figura No. 5 conjunta los ácidos grasos aislados para K. rhinoscleromatis con base a sus tiempos de retención y áreas, resultando así el perfil cromatográfico de K. rhinoscleromatis cuya huella o perfil es único para ésta especie obtenido bajo las condiciones citadas en la metodología.

**FIGURA 3. COMPOSICION DE LOS ACIDOS GRASOS DE *Klebsiella rhinoscleromatis* CON BASE A SUS TIEMPOS DE RETENCION**



El tiempo de cada ácido graso fué obtenido como la media de 50 cromatogramas.

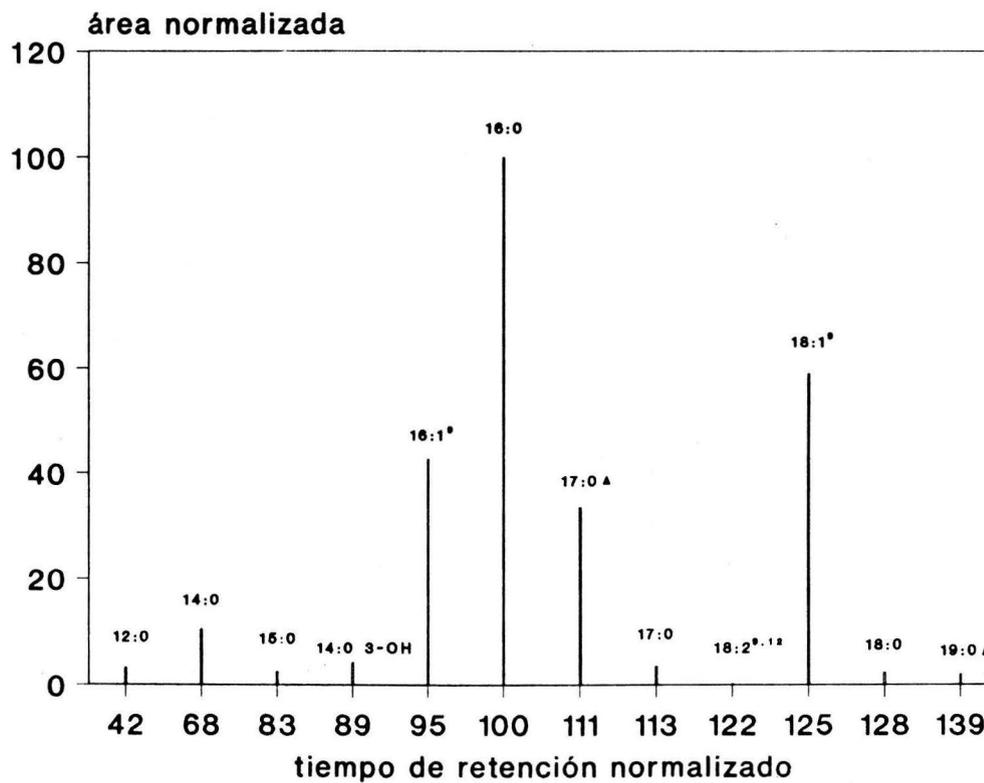
FIGURA 4. COMPOSICION DE LOS ACIDOS GRASOS DE *Klebsiella rhinoscleromatis* CON BASE A SUS AREAS



El área de cada ácido graso fué obtenido como la media de 50 cromatogramas.

FIGURA 5.

PERFIL CROMATOGRAFICO DE  
*Klebsiella rhinoscleromatis*.



## D I S C U S I O N .

La evaluación del análisis de los ácidos grasos celulares de K. rhinoscleromatis por cromatografía gas líquido como un procedimiento rutinario de identificación se realizó de una manera cualitativa y cuantitativa, utilizando una columna capilar de sílice fundido.

Cabe mencionar que de los 26 ácidos grasos que proporciona el estándar (figura No.2), 12 fueron identificados como ácidos grasos característicos de K. rhinoscleromatis citados de acuerdo al orden de elución (cuadro No. 1). Se observó que los ácidos grasos presentes en esta especie son del tipo de cadena lineal saturada como es el dodecanoico, tetradecanoico, pentadecanoico, hexadecanoico y heptadecanoico. Se presentaron también ácidos grasos insaturados con doble ligadura como el ácido cis-hexadecenoico, el cis-9-12-octadecenoico y el trans-9-octadecenoico. En bacterias existen menos ácidos grasos saturados que en los organismos superiores, siendo a su vez de composición más simple (35). De igual manera la columna capilar permitió la resolución de los ciclopropanos cis-9-10-metilenehexadecanoico y el cis-9-10-metileneoctadecanoico. La importancia de éstos ácidos radica en que su presencia en la membrana le confiere un alto grado de flexibilidad además de estar implicados en la estructura y estabilidad de éstas, e incluso la posibilidad de formar mesosomas intracelulares (10) (33) (53) (54).

Fué también posible la identificación del ácido 3-hidroxi-tetradecanoico que se caracteriza por presentar en su estructura un grupo hidroxilo (OH) en posición 3. La presencia de éste ácido graso en K. rhinoscleromatis juega un papel importante, formando parte de lipopolisacáridos como constituyentes del lípido A, los cuales son componentes estructurales de la membrana externa teniendo un alto valor diagnóstico para la identificación de enterobacterias (19) (28) (34).

De acuerdo con los tiempos de retención (cuadro No.2) se observó que los ácidos grasos con una cadena carbonada corta registraron tiempos de retención menores, contrario a los ácidos grasos de cadena carbonada larga que registraron un tiempo de retención mayor, de tal forma que el ácido dodecanoico (láurico) con una cadena lineal saturada de 12 átomos de carbono fué el primero en registrarse con un tiempo de retención (T.R.) de 42.32%, le siguió el tetradecanoico con 14 átomos de carbono con un T.R. de 68.82%, y así sucesivamente dependiendo de la longitud de la cadena carbonada hasta el cis-9-10-metilenoctadecanoico con 18 átomos de carbono registrando un T.R. de 139.73%. De tal modo que el tiempo de retención viene determinado por las características físicas y químicas de los componentes de la muestra. Por lo tanto, los ácidos grasos con bajo peso molecular son menos afines a la fase estacionaria de la columna por lo que eluyen más rápidamente; de manera contraria, los ácidos de mayor peso molecular muestran mayor afinidad registrando un tiempo de retención mayor (21) (43).

De acuerdo con las áreas obtenidas para cada uno de los ácidos grasos identificados (cuadro No. 3) se encontro que los ácidos grasos con mayor área fueron el **eláidico** con una media de 58.90%, el **palmitoléico** con una media de 42.80%, y el **margárico** con una media de 33.50%. Se registraron también en bajas proporciones los ácidos **mirístico** con una media de 10.40%, el **láurico** con una media de 3.20%, y el **esteárico** con una media de 2.30%.

Varios autores reportan que los ácidos grasos **láurico**, **mirístico** y **esteárico** junto al **palmítico** son característicos de la familia **Enterobacteriaceae** (3) (29) (53). De tal forma que la presencia de éstos en **K. rhinoscleromatis** permiten incluirla dentro de dicha familia.

Con respecto a los coeficientes de variación que registraron cada uno de los ácidos grasos tanto para áreas y tiempos de retención (cuadros No. 2 y 3), se observó que en lo que se refiere a los tiempos, no hubo variaciones significativas para ningun ácido detectado, ubicándose los valores por debajo del 20%.

Sin embargo, para el caso de las áreas, los ácidos **láurico** y  **$\beta$ -hidroximirístico** registraron variaciones significativas con valores del 48.79% y 49.95% respectivamente.

Se construyeron intervalos de confianza ( $X \pm 2(S)$ ) con los cuales fué posible establecer que de 50 cromatogramas realizados del 92 al 100% caen dentro de los límites establecidos para los

tiempos de retención (ver anexo cuadro No. 4); y para las áreas del 94 a 98% (anexo cuadro No. 5). Esto nos permite establecer que para la mayoría de los ácidos grasos la técnica es reproducible.

La variación que presentaron los ácidos láurico y  $\beta$ -hidroximirístico sugiere dos puntos importantes; uno de ellos puede atribuírsele a sus propiedades químicas, tal es el caso del grupo OH que presenta el  $\beta$ -hidroximirístico lo cual le confiere cierta inestabilidad química. Pues en el proceso de hidrólisis éste tipo de ácidos son los más afectados, aunado al uso intensivo de columnas capilares (8) (28) (34) (39).

Por otro lado éstas variaciones precisan la importancia de afinar detalles de la técnica y lo necesario de su estandarización para obtener resultados confiables y de ésta manera lograr una comparación entre laboratorios dedicados a éste tipo de análisis.

Con base en la identificación de los ácidos grasos de K. rhinoscleromatis fué posible la construcción del perfil lipídico que será utilizado como una huella química para la determinación de ésta bacteria en muestras ambientales (figura No. 5). Este se obtuvo bajo las condiciones citadas en la metodología, tomando en cuenta que su reproducibilidad depende en gran medida de las condiciones de operación del equipo y de la técnica del análisis de la muestra.

El arreglo de los ácidos grasos está influido por factores de crecimiento, edad del cultivo, temperatura de incubación y concentración del inóculo. Sin embargo controlando éstos y estandarizando las condiciones de trabajo es posible contar con una técnica precisa y eficiente (1) (45) (56).

A la fecha se han registrado trabajos a nivel de familia donde se reportan perfiles de ácidos grasos de especies de **Enterobacterias** tal como Abel y colaboradores en 1962 quienes trabajando con 6 especies de la familia, entre ellas E. coli, Enterobacter freundii, E. aerogenes, E. cloacae, Proteus vulgaris, Serratia marcescens y K. pneumoniae, muestran la similitud entre éstas, indicando sus diferencias en las proporciones relativas de sus ácidos grasos representativos particularmente el C<sub>16</sub>, C<sub>17</sub>, C<sub>18</sub> y C<sub>19</sub>, obteniendo también como ácido graso de mayor área el C<sub>16</sub> (palmítico). Así también Boe y Gjerde en 1980 trabajando igualmente con especies de la familia **Enterobacteriaceae** entre ellas el género Klebsiella detecta los ácidos C<sub>12</sub>, el C<sub>16</sub> y C<sub>18</sub> señalándolos como característicos de ésta.

## C O N C L U S I O N E S

1. Los datos obtenidos demuestran la eficiente resolución y buena separación en la columna capilar de los ácidos grasos, de cadena corta y ciclopropanos mostrando que K. rhinoscleromatis puede ser definida por el perfil cromatográfico, de sus ácidos grasos celulares.
2. La presencia de los ácidos grasos palmítico, esteárico, laúrico y mirístico identificados en K. rhinoscleromatis, característicos de la familia Enterobacteriaceae representan un alto valor taxonómico permitiendo así la ubicación de ésta especie dentro de dicha familia.
3. Los resultados obtenidos muestran la versatilidad del método y establece sus ventajas de ser rápido y preciso, permitiendo un análisis cualitativo y cuantitativo simultáneo, por lo que puede proponerse como un método alternativo de identificación y emplearse en un futuro como una herramienta para determinar Enterobacterias en muestras desconocidas.
4. Este método es utilizado rutinariamente en el Instituto de Investigaciones del Agua en Praga Checoslovaquia y se considera importante establecerlo en nuestro país para utilizarlo además de en muestras ambientales, en control de calidad sanitario, clínico, veterinario e industrial.

5. El perfil cromatográfico de los ácidos grasos obtenido para Klebsiella rhinoscleromatis puede utilizarse como una huella química característica para su determinación a partir de bacterias tipo.

## B I B L O G R A F I A

1. † Abel, K.S y J.I. Peterson (1963). Classification of organisms by analysis of chemical composition Feasibility of utilizing gas chromatography J. Bacteriol. 85: 1039-1044.
2. Bergey, H.D. ( 1982 ) Manual of Systematic Bacteriology. 8a. ed. Williams Wilkins. Baltimore pp. 461-465.
3. † Boe, B. y J. Gjerde. (1980). Fatty acid patterns in the classification of some representatives of the families Enterobacteriaceae and Vibrionaceae. J. Gen. Microbiol. 116:41-49.
4. † Bousfield, I. J., L. G. Smith., R. T. Dando. y G. Hobbs. (1983). Numerical analysis of total fatty acid profiles in the identification. J. Gen. Microbiol. 129: 375- 394.
5. Benedí, J. V., Blanca, C. y Juan M.T. (1989). Isolation and characterization of Klebsiella pneumoniae unencapsulated mutans. J. Clin. Microbiol. 27: 82-87.
6. Beaulieu, M. (1964) A method for compiling bacterial findings in a medium sized hospital. J. Can. Med. Assoc. 90:1108-1111.
7. Brian B.L. y Gardner E.W. (1967). Preparation of bacterial fatty acid methyl esters for rapid characterization by gas liquid chromatography. Appl. Microbiol. 15:1499-1500.

8. Brondz, I., O. Ingar., y S. Michael. (1989). Gas Chromatographic assesment of alcoholized fatty acids from yeast a new chemotaxonomic method. J. Clin. Microbiol. 27:2815-2819.
9. Cookson, B., S. Chinn. I. Phillips. (1989). A qualitative and quantitative study of the cellular fatty acids of Streptococcus milleri. J. Gen. Microbiol. 135:831-838.
10. Chao, K.Y. y M. R. Salton. (1965). Fatty acid composition of bacterial membrane and wall lipids. Biochim. Biophys Acta. 116:73-79.
11. Dees, S. B., R. E. Moss. y D. Hollis. (1979). Cellular fatty acid composition of Pseudomona paucimobilis and groups. J. Clin. Microbiol. 10:206-209.
12. Drucker, B. D. (1981). Microbiological aplications of gas chromatography. Cambridge University Press. New York.
13. Dominique, G. L., F. Dean. y J. R. Miller. (1969). A diagnostic scheme for identifiyng Enterobacteriaceae and miscellaneous Gram negative bacilli. J. Clin. Pathol. 1:51-62.
14. Davis, B. D. y R. Dulbeco. (1985). Tratado de Microbiología. Edit. Salvat. México. pp. 529-551, 1097.

15. Erola, E. y L. O. Lehtonen. (1988). Optimal data processing by gas-liquid chromatography of cellular fatty acids. J. Clin. Microbiol. 26:1745-1753.
16. Fessenden, R. J. (1983). Química orgánica. 2a. ed. Iberoamerica. México. pp. 101, 596-599.
17. Glass, R. L. (1971). Alkholisis, saponification of fatty acids methylesteres. Lipids 6:919.
18. González, A. M. (1978). Manual de fundamentos teóricos y principios de la cromatografía en fase de vapor. Proyecto de Conservación y Mejoramiento del Ambiente (CyMA) ENEP-Iztacala. UNAM. México.
19. Goran, O., T. Anders y P. Marden. (1986). Combined determination of poly- $\beta$ -hydroxyalkanoic and cellular fatty acids in starved marine bacteria and sewage sludge by gas-chromatography with flame ionization or mass spectrometry detection. Appl. Microbiol. 52:905-910.
20. Gabrieli, E. R., V. Pessin y R. Palmer. (1967). Initial experience with and potential of data processing and computer techniques in a hospital clinical laboratory. J. Clin. Pathol. 1:47-60.
21. Goran, O., L. Lennart. y M. Anders.(1984). Gas chromatography, Mass spectrometry applications in microbiology. Plenum Press. New York. pp. 57-103.

22. Häusler, J., V. Richter. (1983). Identification of bacteria of the family Enterobacteriaceae using gas chromatography. 12th-International symposium on microbiol. Association and interaction in food. Publishing House of the Hungarian. Acad. Science. Budapest.
23. Häusler, J. (1987). Identification of indicators of fecal pollution by Enterobacteriaceae using chromatography. V Curso-Simposio Internacional sobre biología de la contaminación. UNAM. SEDUE. UPN. México.
24. Hidetoshi, O., S. Shoji y M. Norio. (1990). A trans-unsaturated fatty acid in a, Vibrio sp. strain. J. Bacteriol. 172:3515-3518.
25. Herrera, E. (1986). Bioquímica. Edit. Interamericana. Madrid. pp. 477-492.
26. Janzen, E. (1984). Analysis of cellular components in bacterial classification and diagnosis. In. Gen. Microbiol. pp. 257-302.
27. James, A.T. y J. P. Martin. (1956). Gas liquid chromatography the separation and identification of the methylesters of saturated and insaturated acids from formic acid to n-octadecanoic acid. Res. Medic. 63:144-152.

28. Jeffrey H. P., A. Glen y D. C. White. (1982). Sensitive assay based on hydroxy fatty acids from lipopolysaccharide lipid A for Gram-negative bacteria in sediments. Appl. Environ. Microbiol. 44:1170-1177.
29. Larson, L. y P.A. Mardh. (1984). Gas chromatography mass spectrometry applications in microbiology. Plen. Publ. Corp. 259:5-15.
30. Larson, L. y P. A. Mardhs. (1977). Application of gas chromatography to diagnosis of microorganisms and infectious diseases. Ann. Int. Med. 19:233-249.
31. Lechevalier, M. P. y A. C. Horan. (1971). Lipid composition in the classification of nocardiae and mycobacteria. J. Bacteriol. 105:313-318.
32. Laguna, J. y G. E. Piña. (1979). Bioquímica. 3a. ed. La Prensa Médica Mexicana. México. pp. 325-355.
33. Lindy, T. M. (1982). Single derivatization method for routine analysis of bacterial whole-cell. Fatty acid methylesters including hydroxy acids. J. Clin. Microbiol. 16:584-586.
34. Lambert, M. A. y C. W. Moss. (1983). Comparison of the effects of acid and base hydrolyses on hydroxy and cyclopropane fatty acids in bacteria. J. Clin. Microbiol. 18:1370-1377.

35. Lehninger, A. L. (1979). Bioquímica. Edit. Omega. Barcelona. pp. 285-300.
36. Mac Gee, J. (1968). Characterization of mammalian tissues and microorganisms by gas liquid chromatography. J. Gas. Chromatograph. 6:48-52.
37. Moss, C. W., S. B. Samuels y R. E. Weaver. (1972). Cellular fatty acid composition of selected Pseudomonas sp. Appl. Microbiol. 24:596-598.
38. Moss, C. W., M. A. Lambert y W. H. Merwin. (1974). Comparison of rapid methods for analysis of bacterial fatty acids. Appl. Microbiol. 28:80-85.
39. Moss, C. W. y O. L. Nunez-Montiel. (1982). Analysis of short-chain acids from bacterial by gas-liquid chromatography with a fused-silica capillary column. J. Clin. Microbiol. 15:308-311.
40. Moss, C. W., T. Shinoda y J. W. Samuels. (1982). Determination of cellular fatty acid compositions of various yeast by gas-liquid chromatography. J. Clin. Microbiol. 16:1073-1079.
41. Mortimer, P. S., S. Heinze y B. Albert (1981). The prokaryotes. Springer-Verlag. New York. USA. 1160-1165.

42. Mitruka, M. S. y J. B. Mary. (1979). Methods of detection and identification of bacteria. 3th. CRC Press. USA.
43. Martin, W. D., A. P. Mayes y W. V. Rodwell. (1986). Bioquímica de Harper. El Manual Moderno. México. pp. 197-211.
44. Maraculla, M. J. (1985). Bioquímica. 2a. ed. Reverté. Barcelona. pp. 187-373.
45. Minnikin, D. E. y M. Goodfellow. (1981). Lipids in the classification of Bacillus and related taxa. Acad. Press. 23:59-90.
46. O' Leary, W. W. (1962). The fatty acids of bacterial. J. Bacteriol 26:421-447.
47. Prefontaine, G. y F. L. Jackson. (1972). Cellular fatty acid profiles as an aid to the classification of "corridinf bacilli" and certain other bacteria. J. Syst. Bacteriol. 22:210-217.
48. Smit, E. J., J. L. Kock y T. J. Britz. (1988). Taxonomic relationships of Cryptococcus and Tremella based an fatty acid composition and other phenotypic characters. J. Gen. Microbiol. 134:2849-2855.
49. Schnierson, S. S. y D. Ansterdam. (1967). A manual punch system for recording filing and analyzing antibiotic sensitivity test results. J. Clin. Microbiol. 21:256-260.

50. Suhail, A. G. W. William y R. A. Jensen. (1990). Evolution of aromatic aminoacids biosynthesis and application to the fine-tuned phylogenetic positioning of enteric bacteria. J. Bacteriol. 172:1051-1061.
51. Tswett's, M. (1990). Adsorptions analyse and chromatographische methode. Anwendung auf die chemie des chlorophylls Deutscher Botanische Gesellschaft. 24:384-393.
52. Thoey, M., y K. Kaneda. (1990). Surface-active novel glycolipid and linked 3-hydroxy fatty acids produced by Serratia rubidaea. J. Bacteriol. 172:3015-3022.
53. Thoshi, K. (1967). Fatty acids in the genus Bacillus. J. Bacteriol. 93:894-903.
54. Toshi, K. (1967). Fatty acids in the genus Bacillus. Iso and anteiso acids as characteristic constituents of lipids in 10 species. J. Bacteriol. 93:894-903.
55. Thoshi, K. (1972). Positional preference of fatty acids in phospholipids of Bacillus cereus and its relation to growth temperature. Acta. Biochim. Biophys. 280:297-305.
56. White, D. A., D.P. Handler. y L. E. Smith. (1983). Fundamentos de Bioquímica. 2a. ed. La Colina. Madrid. pp. 39-70.

57. Veys, A., W. Callewaert. y W. Etienne. (1989). Application of gas-liquid chromatography to the routine identification of nonfermenting Gram-negative bacteria in clinical specimens. J. Clin. Microbiol. 27:1538-1542.
58. Yamada, K. y K. Komagata. (1970). Taxonomic studies on coryneform bacteria principal aminoacids in the cell wall and their taxonomic significance. J. Clin. Microbiol. 16:103-105.

## A N E X O

### SOLUCIONES

#### Solución de formaldehído al 0.5%

Fórmula:

formaldehído	0.5 mL
agua destilada	100 mL

Preparación:

Medir con pipeta 0.5 mL de formaldehído y mezclarlos en 100 mL de agua destilada para tener una concentración del 0.5%.  
conservar en refrigeración.

#### Solución fisiológica de NaCl al 0.85%

Fórmula:

cloruro de sodio	0.85 g
agua destilada	100 mL

Preparación:

Pesar 0.85 gr de NaCl y disolverlos en 100 mL de agua destilada, esterilizar a 15 lb / 15 min. Se conserva en refrigeración.

#### Solución de metóxido de sodio ( Solución A )

Fórmula:

metanol	37 mL
metóxido de sodio	23 mL
benceno	

Preparación:

Medir con pipeta 37 mL de metanol y vertirlos a un matraz volumétrico de 100 mL, posteriormente se agregan 23 mL de metóxido de sodio y se afora a 100 mL con benceno. Se conserva en refrigeración.

### **Solución de metanol saturado con cloro gas ( Solución B )**

Fórmula:

ácido clorhídrico conc.	30 mL
ácido sulfúrico conc.	30 mL
metanol	20-25 mL

Preparación:

En un matraz de bola se colocan 30 mL de ácido clorhídrico concentrado, en un embudo de separación se colocan 30 mL de ácido sulfúrico concentrado y en un tubo colector se colocan de 20 a 25 mL de metanol.

Se hace reaccionar el ácido clorhídrico con el ácido sulfúrico, recuperándose los vapores del cloro en el tubo colector que contiene el metanol hasta un pH ácido.

### **MEDIO DE CULTIVO**

#### **Agar nutritivo DIFCO**

Fórmula:

Bacto extracto de Carne	3.0 g
Bacto peptona	5.0 g
Bacto agar	15.0 g

**Preparación:**

Pesar 23 g de agar nutritivo y disolverlos en 1000 mL de agua destilada, se calienta hasta completa disolución y se esteriliza a 15 lb / 15 min.

CUADRO 4.

INTERVALOS DE CONFIANZA ESTABLECIDOS PARA  
LOS TIEMPOS DE RETENCION DE CADA ACIDO GRASO  
IDENTIFICADO EN *Klebsiella rhinoscleromatis*.

ACIDO GRASO	LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR	INTERVALO DE CONFIANZA (%)
12:0	41.95	42.70	92 %
14:0	68.37	69.27	94 %
15:0	82.68	84.14	94 %
14:0 3-OH	88.35	89.82	94 %
16:1 <sup>9</sup>	95.00	95.76	98 %
16:0	100.00	100.00	100 %
17:0 <sub>Δ</sub>	110.94	111.84	94 %
17:0	110.14	117.49	100 %
18:2 <sup>9,12</sup>	120.66	123.50	98 %
18:1 <sup>9</sup>	125.06	125.94	100 %
18:0	127.17	129.17	98 %
19:0 <sub>Δ</sub>	138.40	141.05	96 %

\* Los limites fueron establecidos como  $\bar{X} \pm Z(S)$

CUADRO 5.

INTERVALOS DE CONFIANZA ESTABLECIDOS  
 PARA LAS AREAS DE CADA ACIDO GRASO  
 IDENTIFICADO EN *Klebsiella rhinoscleromatis*.

ACIDO GRASO	LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR	INTERVALO DE CONFIANZA (%)
12:0	0.08	6.30	94 %
14:0	5.55	15.18	94 %
15:0	1.77	3.22	96 %
14:0 3-OH	0.004	8.49	94 %
16:1 <sup>9</sup>	28.86	56.76	94 %
16:0	100.00	100.00	100 %
17:0 $\Delta$	25.49	41.59	98 %
17:0	2.51	4.48	96 %
18:2 <sup>9,12</sup>	0.11	0.23	96 %
18:1 <sup>9</sup>	40.21	77.61	98 %
18:0	1.67	2.40	96 %
19:0 $\Delta$	1.35	2.41	94 %

\* Los limites fueron establecidos como  $\bar{X} \pm Z(S)$