



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

---

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS  
PROFESIONALES IZTACALA**

**ANALISIS CROMATOGRAFICO GAS-LIQUIDO DE LOS  
ACIDOS GRASOS CELULARES DE  
Klebsiella oxytoca**

**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**  
**JUAN CARLOS ESTRADA MORA**



**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 ACIDOS GRASOS CELULARES DE

Klebsiella oxytoca

JURADO:

Dr. Victor Rivera Aguilar.  
I.B.Q. Ma. Eugenia Garín Aguilar  
M. en C. Angel Durán Díaz  
M. en C. Pedro Ramírez García  
Q.F.B. Esperanza Robles Valderrama

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Victor Rivera Aguilar

ASESOR DE TESIS:

Q.F.B. Esperanza Robles Valderrama  
M. en C. Pedro Ramírez García  
M. en C. Angel Durán Díaz

Este trabajo se realizó en los laboratorios de Bacteriología Ambiental y Cromatografía 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. ). E.N.E.P. Iztacala, U.N.A.M.

A Dios:

Por darme la vida

En la educación, la vida de la mente avanza gradualmente del experimento científico a la teoría intelectual, al sentimiento espiritual, y luego a Dios.

Khalil Gibran.

A mis padres:

Juan Estrada García y Celia Mora de Estrada,  
fruto y dedicación de lo que han sembrado.

A mis hermanos:

Irma C. y Gabriel,  
por compartir la unión familiar.

Con cariño...

A Emelia, por compartir conmigo todo tu ser,  
jugando el papel más importante de mi vida...

Gracias

Te Amo.

A la Familia Campoy Otero:

Por poner toda su confianza y cariño en mí.

A mis amigos:

Jorge Hernández, Juliana Escalona, Gerardo  
Bautista, José Ayala, Felipe Aguilar, Blanca  
Martínez, Guadalupe Sainz, Diana Zayas, Reynaldo  
Patiño,

Con especial reconocimiento a la Profa. Jovita Martínez  
Cruz, responsable de la Colección de Cultivos Microbianos del  
CINVESTAV-IPN y a la Q.B.P. Lidia Gómez Silva, Auxiliar de  
Investgación.

Por formar parte fundamental de mi vida profesional, no solo  
brindando sus enseñanzas, sino también su apoyo, dedicación y  
amistad.

A los profesores:

Dr. Victor Rivera A.

M. en C. Ma. Eugenia Garin

Q.F.B. Esperanza Robles V.

M. en C. Pedro Rámirez G.

M. en C. Angel Durán D.

Con mi más sincero agradecimiento, por su asesoría y apoyo.

Así como a todas aquellas personas que de manera directa e indirecta contribuyeron en la realización de esta tesis.

A todos ellos...

Gracias.

## INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION	
Identificación de Bacterias.....	2
Lípidos.....	3
Acidos Grasos Celulares.....	3
Análisis de Lípidos por Cromatografía de Gas-Líquido.....	4
Importancia de la Familia Enterobacteriaceae.....	6
Características del género <u>Klebsiella</u> .....	7
ANTECEDENTES.....	8
JUSTIFICACION.....	11
OBJETIVOS.....	13
MATERIALES Y METODO	
Microorganismo y Cultivo.....	14
Preparación de Biomasa Bacteriana.....	14
Cosecha.....	14
Centrifugación.....	15
Liofilización.....	15
Esterificación.....	16
Evaporación.....	16
Análisis Cromatográfico.....	17
Análisis Estadístico.....	17
RESULTADOS.....	20
DISCUSION.....	30

<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>34</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>35</b>

## R E S U M E N

En 1963 se sugirió que el análisis químico de microorganismos podría ser usado para su clasificación. Subsecuentemente, el análisis cromatográfico gas-líquido (CGL) de la composición de los ácidos grasos de bacterias se propone como una prueba complementaria en la identificación y clasificación de una gran variedad de bacterias (1) (28).

La especie bacteriana utilizada en el presente trabajo fué Klebsiella oxytoca cepa tipo ATCC 13182.

Para el análisis fué necesario la obtención de la biomasa, su centrifugación, liofilización y esterificación, posteriormente un análisis cromatográfico seguido de un análisis estadístico. Con ésto se determinó el perfil lipídico con base a las diferencias cualitativas y cuantitativas de la composición de los ácidos grasos celulares por cromatografía de gas-líquido.

El perfil lipídico mostró que los ácidos grasos característicos son el dodecanoico, tetradecanoico, 3-hidroxitetradecanoico, hexadecanoico, cis-9-10-metilenhexadecanoico, heptadecanoico, trans-9-octadecanoico, octadecanoico y cis-9-10-metilenoctadecanoico.

Los resultados obtenidos por CGL de los ácidos grasos son una muestra de que el método puede ser adaptado en laboratorios clínicos para proveer un criterio adicional para la identificación de bacterias, gracias a la reproducibilidad y sensibilidad del método.

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

En el área biológica, los microorganismos han jugado un papel importante en el desarrollo de la investigación, la docencia y la tecnología. Desde tiempos remotos existía ya el interés en los microorganismos y su efecto en la salud pública.

Uno de los objetivos principales del análisis bacteriológico es la identificación de los microorganismos aislados. Lo anterior tiene el propósito de ubicarlos en un taxón y el de compararlos con nuevas especies aisladas (37).

### IDENTIFICACION DE BACTERIAS

Los métodos tradicionales empleados en la identificación de microorganismos, se basan fundamentalmente en el estudio y descripción de las características morfológicas y fisiológicas de cada grupo de microorganismos, sin embargo, el valor taxonómico de dichos caracteres dependera de que estos se mantengan estables y de la capacidad del investigador para interpretarlos y diferenciarlos (4) (11) (29) (37).

Apartir de la década de los 50's surge la posibilidad de clasificar e identificar a los microorganismos con base a la biología molecular, a través de sus componentes celulares tanto estructurales como funcionales, entre los que encontramos ciertas enzimas, el ADN, la composición química de membranas, lipopolisacáridos, carbohidratos, proteínas y ácidos grasos entre los más usados (3) (22) (46).

## **LIPIDOS**

Los lípidos son los constituyentes de los seres vivos; insolubles en agua, se extraen con solventes orgánicos, como son el éter, cloroformo, alcohol, éter de petróleo, etc. Aunque los lípidos son material energético y actúan como amortiguadores físicos y aisladores de temperatura, su función más importante es la de participar, asociados con proteínas y carbohidratos en la composición de las membranas celulares (39).

Los lípidos están presentes en casi todas las bacterias, ya que son componentes de la pared y parte fundamental en la estructura de la membrana celular. Para fines de quimiotaxonomía son analizados de acuerdo a su constitución: compuestos de cadena larga, isoprenoides y lípidos polares (15) (39) (46).

Los compuestos de cadena larga pueden ser divididos en dos grupos: los ácidos grasos, cuyo número varía entre 12 y 20 átomos de carbono y el grupo de los ácidos micolíticos, los que poseen de 20 a 90 átomos de carbono.

## **ACIDOS GRASOS CELULARES**

Los ácidos grasos están presentes en grandes cantidades como componentes de la estructura de los lípidos, muy raramente se presentan en forma libre (no esterificada) en las células. Son ácidos monocarboxílicos cuyo radical alquílico representa una estructura de hidrocarburo que puede ser lineal o ramificada. De acuerdo a la ausencia o presencia de dobles ligaduras en su

estructura se dividen en ácidos grasos saturados e insaturados.

Los grupos más importantes de bacterias Gram negativas, han sido examinados en relación a su composición de ácidos grasos. Son conocidos más de 50 tipos. Un organismo Gram negativo típico puede contener de 12 a 20 ácidos grasos en cantidades que van de un 60 a 70 % del peso total y poseen uno o más de los siguientes ácidos grasos: ácidos grasos de cadena normal, monoinsaturados sustituido con anillos ciclopropanos, hidroxilados en posición 2 o 3, metilaciones y ramificaciones iso y anteiso. En algunos casos los patrones de los ácidos grasos pueden ser característicos de un taxón particular a nivel de género y especie como es el caso de las enterobacterias (3) (25) (38).

En la actualidad el análisis de lípidos en la taxonomía bacteriana está bien establecido y ha provisto de características adecuadas para ser empleadas en la clasificación e identificación de diversos grupos, ya que son componentes de la célula bacteriana que se han logrado mantener genéticamente estables a través del tiempo.

#### **ANALISIS DE LIPIDOS POR CROMATOGRAFIA DE GAS-LIQUIDO**

El análisis de los lípidos por cromatografía de gas-líquido, como un método para identificar bacterias fue iniciado por James y Martin en 1956 (30) (42) . Actualmente son varios los autores que estudian los diferentes métodos cromatográficos para el análisis de lípidos, utilizando los ésteres metílicos de los

ácidos grasos; los cuales, son evaporados y removidos dentro de una columna columna capilar que útliza un flujo de gas nitrógeno o helio como gas acarreador. Los ésteres individuales emergen de la columna en relación al tiempo de retención obteniendose un cromatográma parecido a una huella digital. (13) (23) (25) (39) (50).

Se ha demostrado el valor que tiene ésta técnica para la identificación y clasificación rápida de una gran número de bacterias así como para la diagnóstico de microorganismos, presentando ventajas como la sensibilidad, especificidad, uniformidad, rapidez y reproducibilidad en la detección de componentes bacterianos en concentraciones nanográmicas, permitiendo un análisis cualitativo y cuantitativo de manera simultanea, aplicandose con éxito en sectores de importancia clínica, sanitaria, veterinaria y en la industria de la salud y la alimentación (1) (5) (24) (25) (43) (47) (58).

Hoy en día para lograr una identificación precisa son empleadas más de 50 pruebas bioquímicas, además de la aplicación de pruebas complementarias como son: la tipificación serológica, fagotipificación, y algunas otras pruebas como la determinación del contenido de bases en el ADN (G+C), hibridación, electroforesis de proteínas y diferencias entre los constituyentes típicos de la pared celular, la membrana celular y el citoplasma bacteriano (29) (44) (45).

Por esta razón, varios investigadores han tratado de eliminar la laboriosidad y desventajas de los procedimientos convencionales tratando de encontrar en la cromatografía de gas líquido un método simple que provea, al menos la misma información.

#### IMPORTANCIA DE LA FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE

La familia Enterobacteriaceae es uno de los grupos más importantes de bacterias encontradas en el tracto intestinal de animales de sangre caliente. Integrados a este grupo, encontramos a organismos característicos del género Shigella sp. y Salmonella sp., los cuales tienen características importantes, como las de ser patógenos al hombre. Otros géneros son el de Escherichia sp. y Enterobacter sp., cuyas características radican en ser organismos saprófitos, representantes de la flora intestinal normal del hombre, y que bajo circunstancias muy excepcionales, causan infección. Dentro del grupo encontramos organismos oportunistas que en ocasiones, pueden ser patógenos, tal es el ejemplo del género Proteus sp. y Klebsiella sp. (3) (9) (49).

En un principio, los organismos del género Klebsiella no se consideraban organismos patógenos, pero desde hace 25 años se han incrementado las infecciones causadas por este género, particularmente infecciones clínicas en pacientes hospitalizados.

## CARACTERISTICAS DEL GENERO KLEBSIELLA

Los organismos del género Klebsiella son bacterias oportunistas que pueden causar infecciones. Las más comunes se dan en el tracto urinario, de origen nosocomial, siendo el tracto intestinal el reservorio principal, y las manos el vector de transmisión (3) (9) (14) (51).

El género Klebsiella son bacilos Gram negativos de 0.3-1.0 x 0.6-6.0  $\mu\text{m}$ , de arreglos simples, pares o cadenas cortas, presentan cápsula, son no móviles, anaeróbios facultativos, con metabolismo respiratorio y fermentativo. Crecen en medio extracto de carne produciendo colonias en forma de domo, de color brillante en distinto grado, dependiendo de la composición del medio.

Presenta la siguiente ubicación taxonómica:

Familia I. Enterobacteriaceae.

Tribu IV. Klebsiella.

Género V. Klebsiella.

1.- K. oxytoca.

El habitat que presenta es el tracto respiratorio, encontrándose en el intestino de animales y del hombre, así como en el suelo, polvo, aire y agua. (3) (9) (33) (49).

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

La cromatografía de gases en la actualidad es utilizada como auxiliar en muchos campos de la investigación científica. De un tiempo a la fecha se han incrementado los estudios para dilucidar los constituyentes de la célula bacteriana, específicamente el contenido de los ácidos grasos, obteniendo con ésto un gran avance en aspectos taxonómicos (5) (52).

Los primeros trabajos de cromatografía aplicada en la investigación, fueron los realizados por Tswett, M. (10) (56), bioquímicos Rusos que en 1906, describieron como la clorofila podría ser separada de otros pigmentos presentes en las plantas, empleando para ello una columna de carbonato de calcio con éter de petróleo; hasta 1931 se publica la técnica (35) (50).

En 1956 los investigadores James y Martin fueron los primeros en trabajar con la cromatografía de gases aplicada a la microbiología, determinaron los ácidos grasos de un extracto de Pseudomonas aeruginosa utilizando para ésto diazometano y éter de acetona (1) (30).

Más tarde la clasificación de microorganismos a través del análisis químico de las células por cromatografía de gas fué sugerido por Abel y colaboradores en 1963, quien es considerado el fundador de una nueva dirección en la bacteriología moderna al sostener que los microorganismos pueden diferenciarse con base a la composición de sus ácidos grasos, introduciendo esta técnica para determinar especies de la familia Enterobacteriaceae (1) (58).

En los años 60's se utiliza la técnica para diferenciar grupos bacterianos como lo demuestran los trabajos de Kaneda en 1967 quien trabajó con especies del género Bacillus (34); Brook y colaboradores con ayuda de la técnica de cromatografía de gases logran la diferenciación de 2 especies del género Clostridium (6).

En la primera mitad de la década de los 70's Amstein y Hartman determinaron los ácidos grasos del género Enterococcus y obtuvieron el patrón lipídico (2).

Boe y Hausler en los 80's siguen desarrollando la técnica de cromatografía de gases con el fin de establecer el patrón de los ácidos grasos para emplearlos como una herramienta en la identificación y clasificación de ciertos representantes de la familia Enterobacteriaceae (4) (22). De igual modo Bousfield y colaboradores (5), Cookson (7), Guerrat y colaboradores (21), Hausler (22) (24), Janzen (32) y Lechevalier (38).

A finales de los 80's con el desarrollo de los métodos de análisis de los lípidos por medio de la cromatografía de gases se logra advertir que la composición de los ácidos grasos se ve afectada de manera cualitativa y cuantitativa por parámetros experimentales bajo los cuales se desarrollan los microorganismos como son la naturaleza del medio y las condiciones del cultivo (edad del cultivo, sustrato utilizado, temperatura de incubación, pH e inóculo) (1) (10) (12) (16) (17) (48) (57).

En la década de los 90's los estudios que se desarrollan en esta área tienen como objetivo el estandarizar los parámetros de crecimiento para cada uno de los grupos bacterianos, así como la variación de la presencia y concentración de los ácidos grasos de cada grupo bacteriano (13) (53) (54) (55).

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

Los métodos desarrollados para la identificación de microorganismos se basan en el análisis de sus características fisicoquímicas.

El análisis cromatográfico gas-líquido (CGL) de los ácidos grasos es propuesto apartir de los 50's como una una alternativa en la identificación y clasificación de bacterias (28).

La familia Enterobacteriaceae está formada por un grupo de microorganismos causantes de un gran número de infecciones al hombre, algunas veces producen la muerte. Dada la importancia que representa este grupo en la salud, la implementación de métodos para la determinación rápida y precisa de estos microorganismos será un gran avance en el control y prevención de enfermedades de este origen.

El presente estudio se realizó en la Unidad de Investigación Interdisciplinaria de Ciencias de la Salud y Educación (U.I.I.C.S.E.) dentro de los objetivos del proyecto de Conservación y Mejoramiento del Ambiente (CyMA) en la Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala (E.N.E.P.I.), U.N.A.M. La estandarización del método por cromatografía de gases, permitirá utilizarla como una técnica rutinaria para la determinación de bacterias; para ello es necesario contar con los perfiles cromatográficos de las principales especies de la familia Enterobacteriaceae. El objetivo principal fue la obtención del perfil lipídico de Klebsiella oxytoca para ser

evaluado como un método rápido y que en un futuro pueda ser empleado de manera rutinaria en la determinación de bacterias aisladas de fuentes que hayan tenido contacto con materia fecal de animales de sangre caliente.

## O B J E T I V O S .

### OBJETIVO GENERAL:

Aplicación del método por Cromatografía gas-líquido para la identificación de los ácidos grasos celulares totales de Klebsiella oxytoca.

### OBJETIVO PARTICULAR:

Obtención del perfil cromatográfico de los ácidos grasos celulares totales de Klebsiella oxytoca.

## 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 fue Klebsiella oxytoca (13182) obtenida directamente del American Type Culture Collection (ATCC), cultivada y mantenida en Agar Nutritivo. La cepa fue 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 este 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) fue 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 con la cosecha bacteriana se procedió a centrifugarlos a 15 000 rpm/10 min a una temperatura de 4 °C.

El sobrenadante del primer centrifugado fue 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 fue 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 (26).

### **Esterificación**

El proceso de esterificación se realizó de acuerdo a Glass (18). 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 este 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 fue 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. (figura No.1)

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 fue de un promedio de 35 min, los ácidos grasos eluidos fueron de 12 a 20 carbonos de longitud.

### **Análisis estadístico**

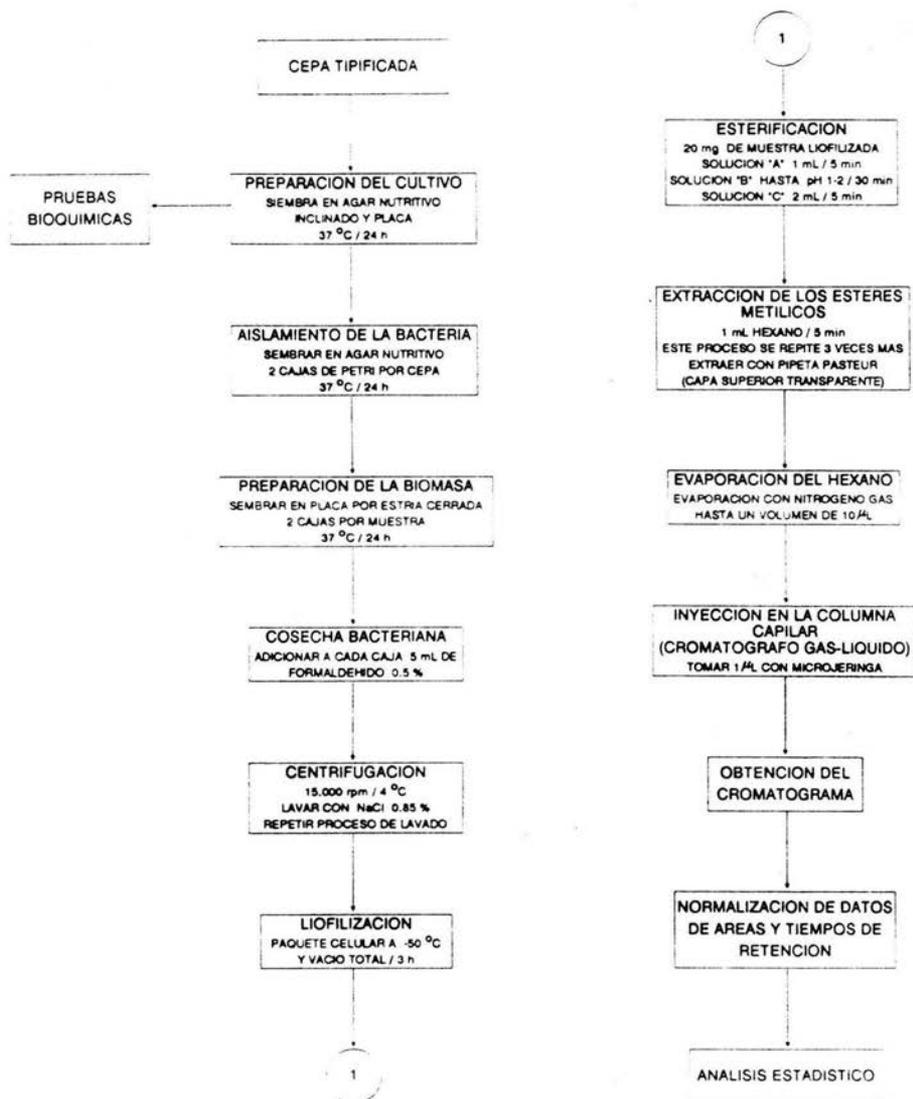
Una vez determinados los picos de importancia en el cromatograma se procedió al procesamiento de la información.

Este proceso se inició con la normalización de los datos obtenidos, transformando los valores numéricos de áreas y tiempos en 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. Una vez obtenidos los datos normalizados se procedió a ordenarlos y a graficarlos para las 38 repeticiones realizadas.

Posteriormente se calcularon las siguientes medidas descriptivas: media aritmética, desviación estándar y coeficiente de variación, valores máximos y mínimos e intervalos de confianza para cada una de las áreas y tiempos de retención de los picos de los ácidos grasos; 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 FISIOLOGICA DE CLORURO DE SODIO 0.85%

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

La figura No. 2 muestra un cromatograma de una mezcla estandar de metilésteres de los ácidos grasos para la familia Enterobacteriaceae, SUPELCO Cat. No. 4-7080 Lote LA 26756 10 mg/ml. El análisis del estandar y de las 38 muestras de cultivo de Klebsiella oxytoca fueron procesadas por una columna capilar de sílice fundido.

Para valorar el análisis cromatográfico de los ácidos grasos como una técnica en la identificación de bacterias, los resultados fueron analizados de manera cualitativa y cuantitativa.

El cuadro No. 1 resume la composición de los ácidos grasos para Klebsiella oxytoca los cuales fueron identificados con base a la comparación de cada uno de los cromatogramas con el estándar de los metilésteres de los ácidos grasos; estableciéndose la presencia de 11 ácidos: (12:0) dodecanoico, (14:0) tetradecanoico, (15:0) pentadecanoico, (3-OH 14:0) 3 Hidroxitetradecanoico, (16:1<sup>9</sup>) cis-9-hexadecanoico, (16:0) hexadecanoico, (17:0) cis-9-10-metilenehexadecanoico, (17:0) heptadecanoico, (18:1<sup>9</sup>) trans-9-octadecanoico, (18:0) octadecanoico, (19:0) cis-9-10-metileneoctadecanoico.

El análisis estadístico de media aritmética, desviación estandar (D.S.) y coeficiente de variación (C.V.) y valores máximos/mínimos (MAX) (MIN) para las áreas y tiempos de retención normalizados de cada uno de los ácidos grasos presentes

en K. oxytoca se muestran en los cuadros No. 2 y 3 respectivamente. Los valores fueron obtenidos con base a 38 determinaciones.

La figura No. 3 muestra los promedios de los tiempos de retención para cada uno de los ácidos grasos identificados en K. oxytoca, expresados en porcentaje, asociándole la desviación estandar. El primer ácido en eluir fue el **dodecanoico** con un tiempo de retención (T.R.) de 42.82 %, una desviación estandar (D.S.) de 0.23 % y un coeficiente de variación (C.V.) de 0.54 %, le siguió el **tetradecanoico** con un T.R. de 69.74 %, una D.S. de 3.27 % y un C.V. de 4.69 %, después el **pentadecanoico**, con un T.R. de 84.15 %, una D.S. de 0.33 % y un C.V. de 0.39 %, el **3-Hidroxitetradecanoico** con un T.R. de 89.60 %, una D.S. de 0.36 % y un C.V. de 0.40 %; le siguió el **cis-9-hexadecenoico** con un T.R. de 95.53 %, una D.S. de 0.40 % y un C.V. de 0.42 %; el **cis-9-10-metilenehexadecanoico** con un T.R. de 111.92 %, una D.S. de 0.12 % y un C.V. de 0.11 %; el **heptadecanoico** con un T.R. de 114.26 %, una D.S. de 0.34 % y un C.V. de 0.30%; le siguió el **cis-9-octadecenoico** con un T.R. de 125.44 %, una D.S. de 0.28 % y un C.V. de 0.22 %; el **octadecanoico** con un T.R. de 128.90 %, una D.S. de 0.46 % y un C.V. de 0.36 %; y el último en eluir el **cis-9-10-metileneoctadecanoico** con un T.R. de 140.79 %, una D.S. de 0.36 % y un C.V. de 0.25 %.

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-hidroxidodecanoato
6. 3-OH 12:0	Me. 3-hidroxidodecanoato
7. 14:0	Me. tetradecanoato
8. i-15:0	Me. 13-metiltetradecanoato
9. a-15:0	Me. 12-metiltetradecanoato
10. 15:0	Me. pentadecanoato
11. 2-OH 14:0	Me. 2-hidroxitetradecanoato
12. 3-OH 14:0	Me. 3-hidroxitetradecanoato
13. i-16:0	Me. 14-metilpentadecanoato
14. 16:1 <sup>9</sup>	Me. cis-9-hexadecenoato
15. 16:0	Me. hexadecanoato
16. i-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>9,12</sup>	Me. cis-9,12-octadecadienoato
21. 18:1 <sup>9</sup>	Me. cis-9-octadecenoato
22. 18:1 <sup>9</sup>	Me. trans-9-octadecenoato
18:1 <sup>11</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. eicosanoato

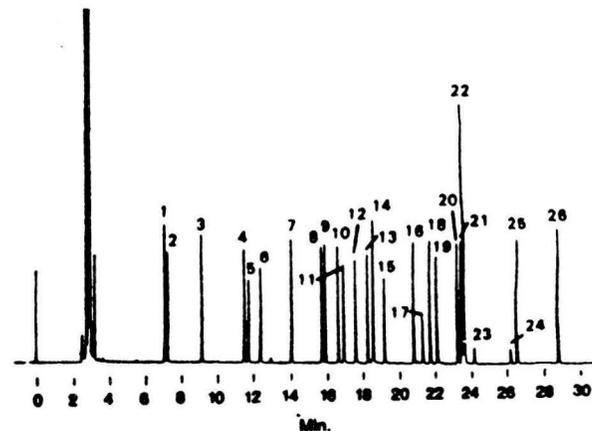


FIGURA 2. MEZCLA DE LOS METILESTERES DE LOS ACIDOS GRASOS BACTERIANOS.  
ESTA MEZCLA CONTIENE UN TOTAL DE 10 mg/mL DE METILESTERES EN METIL CAPROATO.

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	Palmítico
C 17:0 $\blacktriangle$	Cis-9-10-metilenehexadecanoico	
C 17:0	Heptadecanoico	Margárico
C 18:1 <sup>o</sup>	Trans-9-octadecenoico	Elaidico
C 18:0	Octadecanoico	Esteárico
C 19:0 $\blacktriangle$	Cis-9-10-metileneoctadecanoico	

CUADRO 1. PRINCIPALES ACIDOS GRASOS AISLADOS EN *Klebsiella oxytoca* SEGUN EL ORDEN DE ELUCION A TRAVES DE LA COLUMNA DE CROMATOGRAFIA GAS-LIQUIDO.

ACIDO GRASO	N	MEDIA %	D.STD. %	C.V. %	MIN.	MAX.
12:0	38	42.82	0.23	0.54	42.23	43.22
14:0	38	69.74	3.27	4.69	64.60	88.75
15:0	38	84.15	0.33	0.39	83.15	84.61
14:0 3-OH	38	89.60	0.36	0.40	88.50	90.10
16:1 <sup>9</sup>	38	95.53	0.40	0.42	94.59	97.36
16:0	38	100.00	0	0	100.00	100.00
17:0 <sup>▲</sup>	38	111.92	0.12	0.11	111.67	112.14
17:0	38	114.26	0.34	0.30	113.30	114.84
18:1 <sup>9</sup>	38	125.44	0.28	0.22	124.61	125.90
18:0	38	128.90	0.46	0.36	127.54	129.62
19:0 <sup>▲</sup>	38	140.79	0.36	0.25	139.97	141.48

CUADRO 2. MEDIDAS DESCRIPTIVAS DE LOS TIEMPOS DE RETENCION DE CADA ACIDO GRASO EN *Klebsiella oxytoca*.

N = Número de cromatogramas realizados,  
D.STD.= Desviación estándar,  
C.V.= Coeficiente de variación,

MIN.=Valor mínimo,  
MAX.= Valor máximo.

ACIDO GRASO	N	MEDIA %	D.STD. %	C.V. %	MIN.	MAX.
12:0	38	1.52	0.95	62.85	0.56	4.07
14:0	38	7.96	2.76	34.73	2.99	14.23
15:0	38	3.82	1.0	26.17	2.66	6.35
14:0 3-OH	38	2.57	2.40	93.45	0.45	9.11
16:1 <sup>9</sup>	38	19.49	6.92	35.52	0.14	45.08
16:0	38	100.00	0	0	100.00	100.00
17:0 <sup>▲</sup>	38	55.88	12.76	22.84	38.02	90.73
17:0	38	2.80	1.27	45.21	1.38	8.51
18:1 <sup>9</sup>	38	28.25	9.92	35.11	11.02	68.68
18:0	38	1.97	0.61	30.80	1.05	4.67
19:0 <sup>▲</sup>	38	16.53	9.07	54.88	5.66	44.11

CUADRO 3. MEDIDAS DESCRIPTIVAS DE LAS AREAS DE CADA ACIDO GRASO EN *Klebsiella oxytoca*.

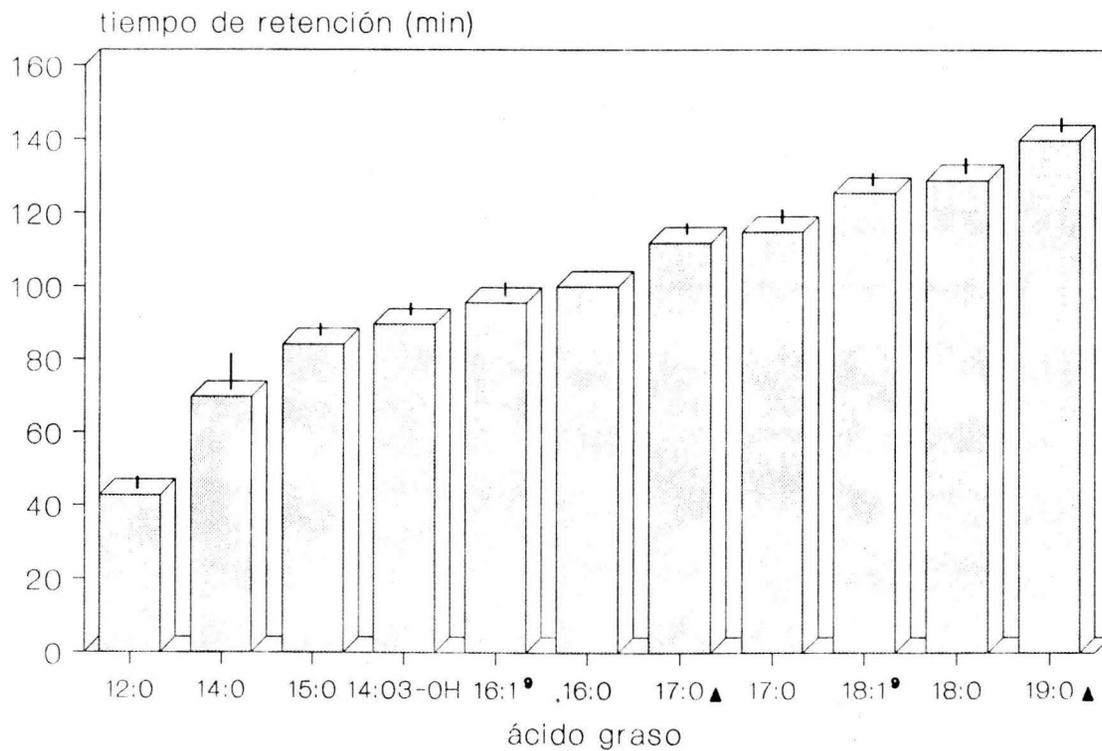
N = Número de cromatogramas realizados.

D.STD.= Desviación estándar.

C.V.= Coeficiente de variación.

MIN.= Valor mínimo.

MAX.=Valor máximo.

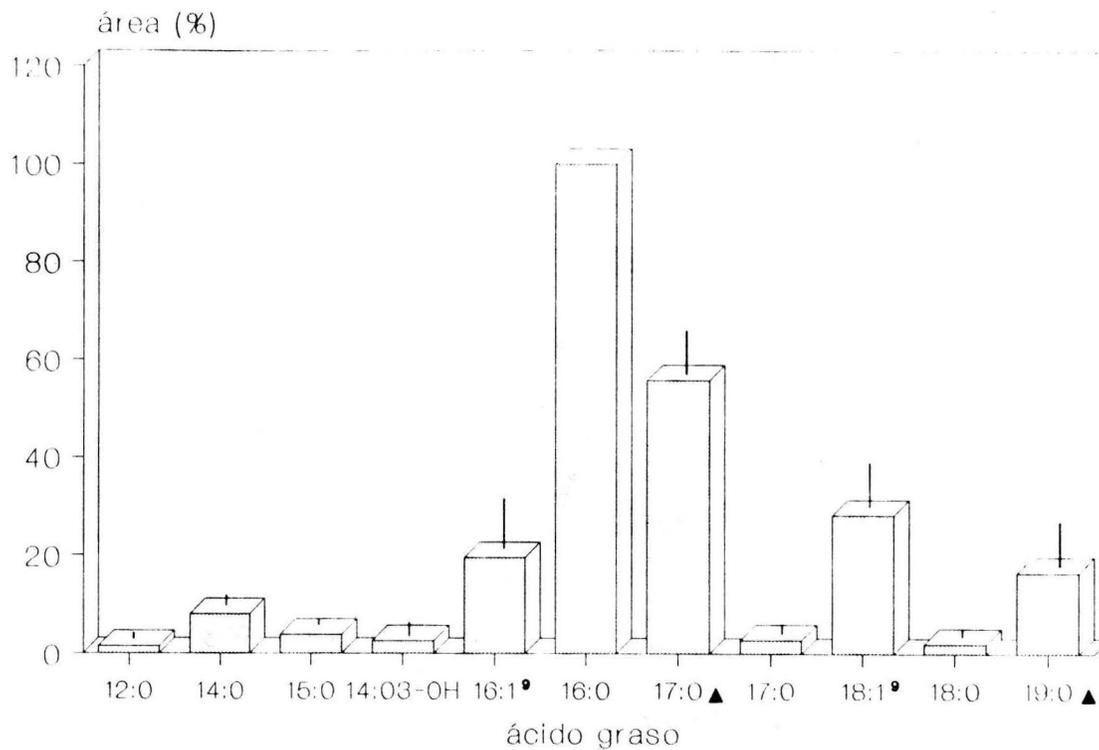


**FIGURA 3. COMPOSICION DE LOS ACIDOS GRASOS DE *Klebsiella oxytoca* CON BASE A SUS TIEMPOS DE RETENCION.**

• El tiempo de cada ácido graso fué obtenido como la media de 38 cromatogramas.

En la figura No. 4 se muestra la composición de los ácidos grasos identificados de K. oxytoca con base a las áreas. Los valores son expresados en porcentaje asociando la desviación estandar para cada ácido graso. En orden de abundancia se observó el ácido **cis-9-10-metilenehexadecanoico** con una área (A) del 55.88 % y un coeficiente de variación (C.V.) de 22.84 %, le sigue el **trans-9-octadecanoico** con una A de 28.25 % y un C.V. de 35.11 %, el siguiente es el **cis-9-hexadecenoico** con una A de 19.49 % y un C.V. de 35.52 % fueron los más abundantes. En proporción intermedia se encontró el ácido **tetradecanoico** con una A de 7.96 % y un C.V. de 34.73 %, posteriormente el **pentadecanoico** con una A de 3.82 % y un C.V. de 26.17 %, le sigue el **heptadecanoico** con una A de 2.80 % y un C.V. de 45.21 %, el **3-Hidroxitetradecanoico** con una A de 2.57 % y un C.V. de 93.45 % y por último el **dodecanoico** con una A de 1.52 % y un C.V. 62.85 %.

La figura No. 5 muestra el perfil cromatográfico de K. oxytoca, con base a la identificación de los ácidos grasos determinados en esta especie, donde se relacionan el área de cada ácido graso y su tiempo de retención. Es importante aclarar que este perfil se obtuvo bajo las condiciones citadas en el método.



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

• El área de cada ácido graso fué obtenida como la media de 38 cromatogramas.

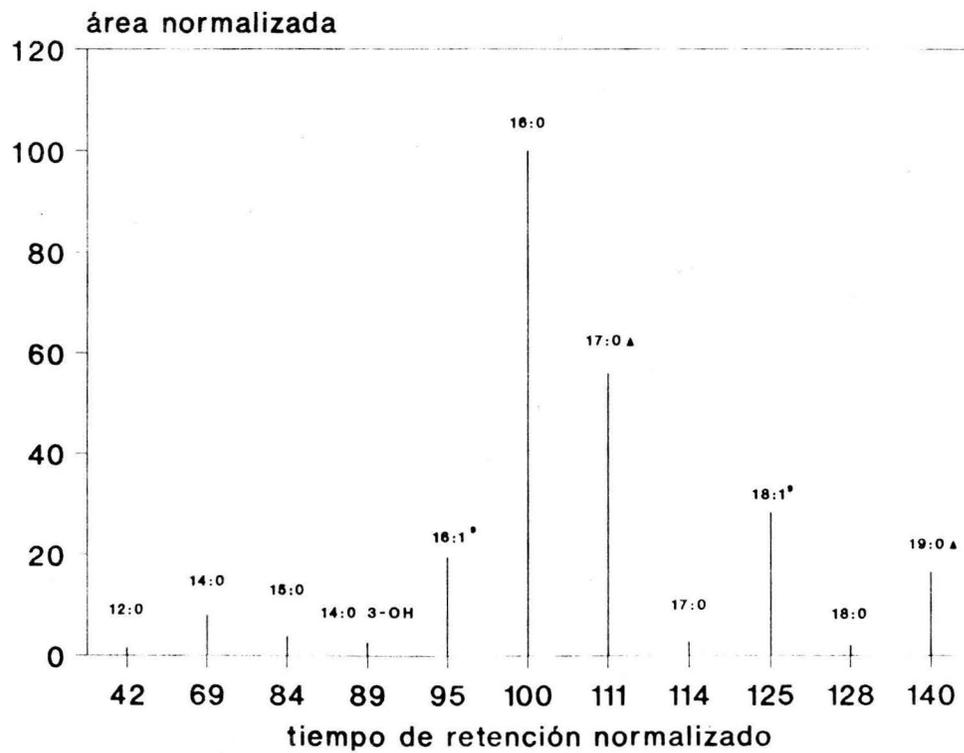


FIGURA 5. PERFIL CROMATOGRAFICO DE *Klebsiella oxytoca*.

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

En Klebsiella oxytoca se estableció la presencia de 11 ácidos grasos celulares (cuadro No. 1), la secuencia de aparición de cada uno de estos ácidos grasos corresponde al orden en que eluyeron a través de la columna capilar.

Para la Familia Enterobacteriaceae los ácidos grasos láurico (dodecanoico), mirístico (tetradecanoico), palmítico (hexadecanoico) y esteárico (trans-9-octadecenoico) se han identificado como característicos; de tal manera la presencia de estos ácidos grasos en Klebsiella oxytoca, permitieron ubicarla dentro de dicha familia (1) (4) (55).

El tiempo de retención para cada uno de los ácidos grasos está determinado por sus características (19) (27), los ácidos grasos de bajo peso molecular son los que eluyen más rápido dada la menor afinidad que tienen con la fase estacionaria de la columna, contrario a los que presentan mayor peso molecular, los cuales son más afines y por lo tanto se retienen más tiempo (20) (41).

Para los ácidos grasos identificados en K. oxytoca los que presentan una cadena lineal corta mostraron bajos tiempos de retención, mientras que los ácidos grasos de cadena larga presentaron un mayor tiempo (figura No. 2) eluyendo de la siguiente manera: el dodecanoico con 12 átomos de carbono, le siguió el ácido tetradecanoico formado por 14 átomos de carbono en cadena lineal y así sucesivamente hasta el cis9-10-metilenoctadecanoico que fue el último en eluir.

Con respecto a las áreas (figura No. 3) los ácidos grasos que registraron una mayor proporción fueron: el **cis-9-10-metilenehexadecanoico** y el ácido **elaídico**. En cantidades intermedias se registraron el palmitoleico y el **cis-9-10-metileneoctadecanoico**. En pequeñas cantidades se registraron el ácido **mirístico**, el **esteárico** y el ácido **láurico**.

El ácido graso con mayor área fue el **palmitico** (hexadecanoico) y se tomó como dato referente para la normalización para el resto de los ácidos identificados asignándole el 100 % de área. Este ácido graso ha sido identificado por varios investigadores entre ellos Bøe y Gjarde (4) y Hausler (23) quienes lo reportan como un elemento característico de la familia Enterobacteriaceae y el más abundante en bacterias.

En los coeficientes de variación obtenidos para los **tiempos de retención** (cuadro No. 2) se observó que los valores registrados son muy constantes y no muestran variaciones significativas, ubicándose por debajo del 1 %, excepto el **tetradecanoico** que registro un valor de 4.69 % el cual no es considerado como un valor significativo.

Sin embargo para los valores de las **áreas** (cuadro No. 3) los ácidos grasos que registraron variaciones significativas fueron el ácido  **$\beta$ -hidroximirístico** con un C.V. de 93.45%, el **láurico** con un C.V. de 62.85% y el **cis-9-10-metileneoctadecanoico** con un C.V. de 54.88%.

Estas variaciones puede ser atribuida en parte a la estructura química de cada ácido, tal es el caso del 3-hidroxitetradecanoico que cuenta con un radical OH, confiriendole una inestabilidad química, pues en el proceso de hidrólisis son los más afectados, aunado al uso continuo de la columna capilar (10) (12) (31) (40); por otro lado es importante mencionar que el análisis cromatográfico para esta especie fue uno de los primeros en realizarse dentro del proyecto Conservación y Mejoramiento del Ambiente en el laboratorio de bacteriología, en el cual no se controlaron los flujos de los gases del cromatografo y no se estandarizó el peso de la biomasa bacteriana a esterificar, de alguna manera, estos factores pudieron influir en los resultados obtenidos, de ahí la importancia en controlar y estandarizar cada uno de las variables en el método cromatográfico.

Se establecieron intervalos de confianza  $\bar{X} \pm 2(S)$  y se observó que de 38 cromatogramas realizados para K. oxytoca respecto a los tiempos de retención el 97 % caen dentro de los límites establecidos. Mientras que para las áreas del 92 % al 97% caen en los límites. Para los ácidos grasos láurico, 3-hidroxitetradecanoico y cis-9-10-metilenoctadecanoico, no fue posible la construcción de los intervalos, ya que mostraron una alta variabilidad durante el análisis (ver anexo).

El perfil cromatográfico obtenido (figura No. 4) para K. oxytoca representa los ácidos grasos característicos de esta especie. Se observa la presencia de ácidos grasos de cadena lineal saturada, tales como el láurico, mirístico,

pentadecanoico, palmitoléico, margárico y octadecanoico. Se detectaron ácidos grasos insaturados con doble ligadura como el trans-9-octadecenoico, y ácidos ciclopropanos como el cis 9-10-metilenehexadecanoico y el cis-9-10-metileneoctadecanoico, así como la obtención de un hidroxiaácido, el 3-hidroxitetradecanoico. Estos ácidos grasos en K. oxytoca le confieren flexibilidad, estructura y estabilidad a las membranas (8) (55). Los hidroxiaácidos son característicos de los lipopolisacáridos constituyentes del lipido A y componentes estructurales de la membrana externa (36) (55).

Los resultados obtenidos nos permiten sugerir que la técnica cromatográfica ofrece una buena sensibilidad para el análisis de los ácidos grasos y su reproducibilidad depende del tipo de ácido que se analice.

A la fecha son pocos los trabajos reportados utilizando el análisis de lípidos en K. oxytoca; se pueden citar los realizados por Hausler (23), algunos otros solo hacen inferencia a la familia Enterobacteriaceae de manera muy general, como los que reporta Abel y colaboradores (1); ellos demostraron la presencia de los ácidos grasos C<sub>11</sub>, C<sub>12</sub>, C<sub>14</sub>, C<sub>15</sub>, C<sub>16</sub>, C<sub>17</sub>, C<sub>18</sub>, C<sub>19</sub>, C<sub>20</sub>, para Escherichia coli, Serratia marcescens, Proteus vulgaris, Enterobacter freundii, Arthrobacter cloacae y Klebsiella aerogenes (K. pneumoniae); las diferencias que se presentan radican solamente en las cantidades relativas de los ácidos C<sub>16</sub>, C<sub>17</sub>, C<sub>18</sub> y C<sub>19</sub>.

## CONCLUSIONES

1. El análisis por cromatografía gas-líquido de constituyentes químicos, tiene un alto potencial, como un método rápido y altamente reproducible en la determinación de estos microorganismos.
2. El análisis de los ácidos grasos por cromatografía de gas-líquido, es un método que puede ser adoptado por laboratorios clínicos, sanitarios y biotecnológicos como una alternativa en la diferenciación de grupos bacterianos.
3. El uso de la cromatografía gas líquido combinado con un método rápido de extracción de los ácidos grasos, ofrece ventajas de velocidad y simplicidad en la determinación de bacterias.
4. Klebsiella oxytoca puede ser determinada a través del perfil lipídico de sus ácidos grasos celulares totales, por el método de cromatografía de gas-líquido.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Abel, K., H. de Scmertzing, y J. I. Peterson. 1963. Classification of organisms by analysis of chemical composition. I. Feasibility of utilizing gas chromatography. J. Bacteriol. 85:1039-1044.
- 2.- Amstein, F.A. y P.A. Hartman. 1973. Differentiation of some Enterococci by gas chromatography. J. Bacteriol. 113: 38-44.
- 3.- Bergey, H.D. 1982. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 5 Ed. Williams & Wilkins; Baltimore. pp. 461-465.
- 4.- Bøe, 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.
- 5.- 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.
- 6.- Brooks, J.B., C.W. Moss. y V.R. Dowell. 1969. Differentiation between Clostridium sordelli and C. bifermentans by gas chromatography. J. Bacteriol. 100:528-530.
- 7.- Cookson, B., H. Talsania, S. Chinn y I. Phillips. 1989. A Qualitative and Quantitative study of the cellular fatty acids of Streptococcus milleri. J. Gen. Microbiol. 135:831-838.

- 8.- Chao, K. Y. y M. R. Salton. 1965. Fatty acid composition of bacterial membrane and wall lipids. Biochim. Biophys. Acta. 116:73-79.
- 9.- Davis, B. D. y R. Dulbecco. 1985. Tratado de Microbiología. Edit. Salvat. México. pp. 529-551, 1097.
- 10.- Drucker, B.D. 1981. Microbiological application of gas chromatography. Cambridge University Press, New York. p. 475
- 11.- Edwards, R.P. y H.W. Ewing. 1972. Identification of Enterobacteriaceae. 3a. ed. Edit. Burgess Publishing, Mineapolis. p. 362
- 12.- Elhaney, R. N. 1976. The Biological significance of alterations in the fatty acid composition of microbial membrane lipids in response to changes in enviromental temperature. I extreme enviroments: Mechanisms of Microbial Adaptation. p. 255-281. Academic Press. New York.
- 13.- Eerola, E. y Lehtonen, Olli-Pekka. 1988. Optimal Data Processing by Gas-Liquid Chromatography of cellular fatty acids. J. Clin. Microbiol. 26:1745-1753.
- 14.- Filand, M. 1967. K. pneumoniae. In Beeson, P.B., Mc Dermontt. Edit. Cecil Text book of Medicine. Philadelphia and London. M.B. Sandrs.
- 15.- Folch, J. y M. Loes. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipidis from animal tissues. J. Biol. Chem. 226:497-509.

- 16.- Garrity, J. T. y J. B. Armstrong. 1981. The effect of temperature and other growth conditions on the fatty acid composition of Escherichia coli. Can. J. Microbiol. 27:835-840.
- 17.- Giono Cerezo, S. 1970. Conservación y mantenimiento de Microorganismos, Bioquímica II. 379-382.
- 18.- Glass, R. L. 1971. Alkholisis, saponification of fatty acids Methylesters. Lipids 6:919.
- 19.- 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, U.N.A.M., México.
- 20.- 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.
- 21.- Guerrat, G. D., M. A. Lamert y C. W. Moss. 1982. Analysis of short-chain acids from anaerobic bacteria by high preformance liquid chromatography. J. Clin. Microbiol. 16:355-360.
- 22.- Hausler, J. y V. Richter. 1983. A process of identification microorganism using chromatography. U.K. Patent aplicaciones G.B. 2:121-434 A.

- 23.- Hausler, J. y V. Richter. 1983. Identification of bacteria of the family Enterobacteriaceae using gas chromatography. 12th. International Symposium on Microbiology. Association and interaction in food. Publishing House of the Hungarian Academy of Sciences, Budapest.
- 24.- Hausler, J. 1987. Identification of indicators of fecal pollution by Enterobacteriaceae using gas chromatography. V Curso-Simposio Internacional sobre Biología de la Contaminación. U.N.A.M. SEDUE. UPN, México.
- 25.- Hausler, J. 1987. Determination of organic acids content by gas chromatography as a rapid and accurate identification method for bacteria. V Curso-Simposio Internacional sobre Biología de la Contaminación. U.N.A.M. SEDUE. UPN, México.
- 26.- Heckly, R.V. 1971. Preservation of bacteria by lyophilization. Advances in Applied Microbiology 3. Edit. by W. Umbreit. Acad. Press, New York. pp. 1-76.
- 27.- Herrera, E. 1986. Bioquímica. Edit. Interamericana. Madrid. pp. 477-492.
- 28.- Hidetoshi, O., S. Shoji y M. Norio. 1990. A trans-unsaturated fatty acids in a Vibrio sp. strain. J. Bacteriol. 172:3515-3518.
- 29.- Holmes, B., W.R. Willcox. y S.D. Lapage. 1978. Identification of Enterobacteriaceae by the API 20E system. J. Clin. Pathol. 31:22-30.

- 30.- James, A.T. y A.J. Martin. 1956. Gas-liquid chromatography: The separation and identification of the methyl esteres of saturated and unsaturated acids from formic acid to n-octadecanoic acid. J. Biochem. 63:144-152.
- 31.- 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. Envirom. Microbiol. 44:1170-1177.
- 32.- Janzen, E. 1984. Analysis of cellular components in bacterial classification and diagnosis. pp. 257-302. In G. Odhan, L. y P.A. Mardh (ed.), Gas chromatography mass spectrometry applications in microbiology. Plenum Publishing Corp., New York.
- 33.- Julianelle, L. A. 1941. The pneumonia of Friedlander's bacillus. Ann. Int. Med. 15:190-206.
- 34.- Kaneda, T. 1967. Fatty acids in the genus Bacillus. I. Iso and anteiso fatty acids as characteristic constituents of lipids in 10 species. J. Bacteriol. 93:894-903.
- 35.- Khun, R., A. Winterstein y E. Lederer. 1931. Zur Kenntnis der Xanthophylle. Hoppe-Seylers Zeitschrift fur Physiologische. Chemie. 197:141-160.
- 36.- Laguna, J. y G. E. Piña. 1979. Bioquímica. 3a ed. La Prensa Medica Mexicana. México. pp. 325-355.

- 37.- Lapage, S. P. y J. E. Shelton. 1970. Culture Collections and preservation of bacteria. In *Methods in microbiology* 3. Edit. by Norris, J. R. y W. Ribbons. Acad. Press London. pp. 135-228.
- 38.- Lechevalier, M. P. 1982. Lipids in bacterial taxonomy, pp. 460-509. In Laskin y H. A. Lechevalier (ed.), CRC Press Inc. Boca Roton, Florida.
- 39.- Lehninger, A. L. 1979. Bioquímica. Edit. Omega. Barcelona. pp. 285-300.
- 40.- 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.
- 41.- Maraculla, M. J. 1985. Bioquímica. 2a ed. Edit. Reverté. Barcelona. pp. 187-373.
- 42.- Martin, J. P. y A. T. James. 1956. Gas-liquid cromatography: The gas density meter a new apparatus for detection of vapours in flowing gas treams.
- 43.- Martin, W. D., A. P. Mayes y W. V. Rodwell. 1986. Bioquímica de Harper. Edit. El Manual Moderno. México. pp. 197-211.
- 44.- Mitruka, B. M. y M. Alexander. 1968. Rapid and sensitive detection of bacteria by gas chromatography. Appl. Microbiol. 16:639-640.

- 45.- Mitruka, B. M. 1975. Gas chromatography applications in Microbiology and Medicine. John Wiley, New York.
- 46.- Mitruka, B. M. 1979. Methods of detection and identification of bacteria. 3 th CRC Press. USA.
- 47.- Moos, 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.
- 48.- Monteoliva-Sánchez, M. Ferrer, M. R. Ramos-Carmenza, A., Quesada, E. y M. Monteoliva. 1989. Cellular fatty acid composition of Deleya halophila: Efect. of growth temperature and salt concentration. J. Gen. Microbiol. 134:199-203.
- 49.- Mortimer, P. S., S. Heinze y B. Albert. 1981. The Prokaryotes. Springer-Verlag. New York, USA. 1160-1165.
- 50.- Pecsok, R. L. y L. D. Shields. 1987. Métodos Modernos de Análisis Químico. 4a ed. Edit. Limusa. México. pp. 61-97.
- 51.- Szulga, T. 1971. Numerical methods in the taxonomy of Klebsiella. Arch. Inmun. Ther. Exp. 18:67-122.
- 52.- Sneath, P. H. y R. R. Sokal. 1973. Numerical taxonomy. Freeman Co., San Francisco.
- 53.- Sokal, R. R. y C. D. Michener. 1985. A Statical method for Evaluating Systematic relationships. University of Kansas. Scien. Bull. 38:1409-1438.

- 54.-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.
- 55.- Thosi, 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.
- 56.- Tswett, M. 1906. Adsorptions analyse und chromatographische methode. Anwen dung auf die Chemie des chlorophylls. Deutscher Botanische Gesellschaft 24:384-393.
- 57.- Wolochow, H. 1959. Detections of airborne microorganisms through their unique compounds. Armed Services Technical Information Agency Rept. No. 211170. pp. 2-18.
- 58.- White, D. A., D. P. Handler y L. E. Smith. 1983. Fundamentos de Bioquímica. 2a ed. Edit. La Colina. Madrid. pp. 39-70.

## 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 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 sulfurico concentrado y en un tubo colector se colocan de 20 a 25 ml de metanol.

Se hace reaccionar el ácido clorhídrico con el ácido sulfurico, 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.

ACIDO GRASO	LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR	INTERVALO DE CONFIANZA (%)
14:0	63.20	76.28	97 %
15:0	83.49	84.81	97 %
16:1 <sup>9</sup>	94.73	96.33	94 %
16:0	100.00	100.00	100 %
17:0 <sup>▲</sup>	111.68	112.16	97 %
17:0	113.58	114.94	97 %
18:1 <sup>9</sup>	124.88	126.00	97 %
18:0	127.98	129.82	97 %

CUADRO 4. INTERVALOS DE CONFIANZA ESTABLECIDOS PARA LOS TIEMPOS DE RETENCION DE CADA ACIDO GRASO EN *Klebsiella oxytoca*.

• Los limites fueron establecidos como  $\bar{X} \pm 2(S)$

ACIDO GRASO	LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR	INTERVALO DE CONFIANZA (%)
14:0	2.44	13.48	92 %
15:0	1.82	5.82	97 %
16:1 <sup>9</sup>	5.65	33.33	94 %
16:0	100.00	100.00	100 %
17:0 <sup>▲</sup>	30.36	81.41	94 %
17:0	0.26	5.34	97 %
18:1 <sup>9</sup>	8.41	48.09	94 %
18:0	0.75	3.19	97 %

CUADRO 5. INTERVALOS DE CONFIANZA ESTABLECIDOS PARA LAS AREAS DE CADA ACIDO GRASO EN *Klebsiella oxytoca*.

\* Los limites fueron establecidos como  $\bar{X} \pm 2(S)$