



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
"IZTACALA"

"IMPLEMENTACION DE UNA TECNICA POR  
CROMATOGRAFIA DE GASES PARA LA  
IDENTIFICACION DE ENTEROBACTERIAS,  
UTILIZANDO COMO PERFIL CROMATOGRA-  
FICO EL CONTENIDO DE ACIDOS GRASOS"

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 MARCELO ZAVALA MARTINEZ

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



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.

Este es el crepúsculo de mi ayer,  
el amanecer de mi mañana  
el punto de partida de muchos gozos,  
el final de viejas penas.

Una página limpia en que escribir  
los sueños que mi corazón crea.....

Hoy es el regalo que El me da,  
esperando que lo tome gozosamente.

Mis pasados errores me son perdonados,  
El no necesita otra manera mejor,  
de decirme que puedo tratar de nuevo.....

El me está dando.....! el hoy ; .

Winifred brand.

Con el más venerable amor y respeto:

A tí Cristo mío por ser mí fortaleza y a tí Virgen Madre  
mía por ser mí guía espiritual.

A tí Papá, porque vivirás por siempre en mi pensamiento,  
recordando perennemente tu esfuerzo y esa entrega de un  
grandioso padre para conmigo.

A tí Mamá, por tu amor siempre presente en los momentos  
más difíciles.

A tí Martha Cecilia, por ser una maravillosa hermana.

A tí Karen Arely, por ser ese pequeño ser que ha llenado  
de alegría nuestro núcleo familiar.

A tí Luz María, por brindarme tu apoyo, ternura y compren  
sión. siempre oportunos e incondicionales.

Agradecido por siempre.

## SEÑOR PADRE

Señor padre eres tú padre mío y nuestro,  
padre salvador maestro, tú que tienes poder,  
tú que sabes todo, para ser como tu que debo hacer.

Padre mío y señor por las circunstancias,  
nunca fuimos a dar en el mismo blanco,  
sé muy poco de tí, te conozco apenas,  
mucho menos aún que tú de mí,  
lo poco que pasó, pasando esta,  
de lo que quedo tal vez mitad,  
con un minuto más de voluntad,  
podemos ser amigos sí, podemos más,  
pero estando unidos ves, que fuerza dá.

Señor padre de amor, padre de familia,  
cabecera de honor, mi mejor ejemplo,  
desde mi juventud, desde mi peldaño,  
con respeto mayor, mis gracias doy,  
ahora voy a tí, abrázame,  
no quiero perder un día más,  
hay tantas cosas, ya verás, que hablar,  
si somos tan idénticos, hay que luchar,  
poniendo todo en claro, me voy en paz.

Agradezco:

- A la Q.F.B. Esperanza Robles Valderrama por la dirección de la presente y sobre todo por su apoyo y gran amistad.
- A la Q.F.I. María Elena González Arreaga por la asesoría en el desarrollo de la cromatografía de gases.
- Al M. en C. Victor Rivera Aguilar por su colaboración en aspectos bacteriológicos y metabolismo bacteriano.
- Al M. en C. Pedro Ramírez García por su apoyo y sugerencias en el desarrollo de este trabajo.
- Al honorable jurado por su participación.
- A todos aquellos que de alguna manera contribuyeron en la realización de esta tesis.

Un agradecimiento muy especial:

- Al Dr. Jiri Häusler del Vyzkumny Ustav Vodohospodarsky de Praha, Czechoslovakia por todos sus consejos y observaciones hechos durante el desarrollo de la presente.
- A la I.Q. Santiago Capella y Francisco Rojo por las facilidades prestadas en el laboratorio de Cromatografía de Gases de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química de la U.N.A.M.

Mil Gracias.

## INDICE

1	Resumen.....	1
2	Introducción.....	2
	2.1.1. Características de la familia Enterobacteriaceae.....	2
	2.1.2. <u>Escherichia coli</u> .....	2
	2.1.3. <u>Enterobacter aerogenes</u> , <u>Enterobacter agglomerans</u> , <u>Enterobacter cloacae</u> .....	3
	2.1.4. <u>Citrobacter amalonaticus</u> , <u>Citrobacter freundii</u> .....	3
	2.1.5. <u>Klebsiella oxytoca</u> , <u>Klebsiella ozaenae</u> , <u>Klebsiella pneumoniae</u> , <u>Klebsiella rhinoscleromatis</u> .....	3
	2.2. Cromatografía de gases.....	4
	2.2.1. Fundamentos de la cromatografía de gases..	4
	2.2.2. Identificación cromatográfica.....	8
	2.3. Ácidos grasos constituyentes de la célula bacteriana.....	10
	2.4. Biosíntesis de ácidos grasos bacterianos.....	15
	2.5. Esterificación de ácidos grasos.....	17
3	Otras técnicas utilizadas para el análisis de ácidos grasos.....	19
	3.1. Destilación.....	19
	3.2. Cristalización.....	19
	3.3. Distribución a contra corriente.....	19
	3.4. Cromatografía.....	20
	3.4.1. Cromatografía de adsorción.....	20
	3.4.2. Cromatografía de partición.....	20

3.5.	Espectroscopía.....	21
3.5.1.	Espectroscopía de adsorción infrarroja....	21
3.5.2.	Espectroscopía de absorción de luz ultravioleta.....	21
3.6.	Espectrometría.....	21
3.6.1.	Espectrometría de masas.....	21
3.6.2.	Espectrometría de resonancia magnética nuclear.....	22
4	Antecedentes.....	23
5	Justificación.....	27
6	Objetivo.....	28
7	Metodología.....	29
8	Resultados.....	38
9	Análisis de resultados.....	131
10	Conclusiones.....	142
11	Alternativas para el empleo de esta metodología..	144
12	Bibliografía.....	145



## 1 RESUMEN.

El objetivo principal de esta investigación es la implementación de una técnica rápida y precisa para la identificación de microorganismos, usando para este fin el método analítico de la Cromatografía de gases líquida y como caracter taxonómico el contenido de ácidos grasos.

El principio de este método se basa en la retención, relación y concentración de los ácidos grasos contenidos en la célula bacteriana (O'Leary, 1962). Estos ácidos son determinados por cromatografía de gases en forma de ésteres metílicos y comparados contra un patrón o estándar constituido por una mezcla de ésteres metílicos de los ácidos grasos bacterianos, bajo condiciones idénticas de operación, tomando como base la comparación entre los tiempos de retención de los ácidos grasos de cada bacteria con los obtenidos en el estándar (González, 1987); ejecutando previamente la liofilización y esterificación del cultivo (Kabat, 1968; Brown, 1978; Holum, 1978; Christie, 1982).

El análisis cromatográfico da como resultado un cromatograma característico para cada cepa bacteriana estudiada, observándose en este paso la disímil composición química de los diferentes grupos bacterianos (Abel et al, 1963; Boe y Gjerde, 1980; Häusler y Richter, 1983).

Se analizaron un total de 10 cepas bacterianas correspondiendo a las siguientes:

<u>Citrobacter amalonaticus</u>	<u>Escherichia coli</u>
<u>Citrobacter freundii</u>	<u>Klebsiella oxytoca</u>
<u>Enterobacter aerogenes</u>	<u>Klebsiella ozaenae</u>
<u>Enterobacter agglomerans</u>	<u>Klebsiella pneumoniae</u>
<u>Enterobacter cloacae</u>	<u>Klebsiella rhinoscleromatis</u>

Encontrándose que sí existe una diferencia en la concentración y la ausencia y/o presencia de uno o varios ácidos grasos en la composición química de cada cepa bacteriana, lo cual permite diferenciarlas de una manera clara y precisa.

## 2 INTRODUCCION.

Una de las necesidades que tiene la bacteriología es el contar con técnicas de identificación adecuadas, por lo que en este trabajo se pretende implementar una técnica utilizando la cromatografía de gases para el análisis de ácidos grasos bacterianos.

Para comprender el fundamento de esta tesis es necesario contemplar los los siguientes temas:

### 2.1.1 Características de la familia Enterobacteriaceae.

Las bacterias de la familia Enterobacteriaceae constituyen un grupo amplio y heterogéneo que engloba varios géneros estrechamente relacionados de bacterias cortas, no esporuladas, gram negativas, anaerobias facultativas, aerobias, capsuladas y no capsuladas crecen en medios simples y en medios con sales biliares, quimioorganotróficas, metabolismo respiratorio y fermentativo, móviles con flagelos peritricos y no móviles, que habitan el intestino del hombre y otros animales homeotermos como comensales de potencialidad patógena. Hoy en día se sabe que miembros de esta familia bacteriana son notables como agentes causales de infecciones urinarias y pueden aislarse de múltiples focos infecciosos distintos del tracto digestivo. Las enterobacterias son probablemente causa de más padecimientos humanos que cualquier otro grupo (Burrows, 1974; Lapage et al, 1979; Lorraine, 1980).

### 2.1.2 Escherichia coli.

Coliforme relacionado con contaminación fecal; varios serotipos producen frecuentemente gastroenteritis caracterizada por una diarrea profusa con moco, náuseas, etc. Este microorganismo es localizado en un gran número de habitats, siendo quizá entre los más importantes el agua potable, piscinas públicas en donde es posible si no se tienen las medidas adecuadas el llegar a adquirir una infección (Geldreich, 1972; Tobin y Ward, 1984; Favero, 1985).

2.1.3 Enterobacter aerogenes,  
Enterobacter agglomerans,  
Enterobacter cloacae.

Grupo indicador de contaminación fecal asociado a infecciones intestinales además de ser cosmopolita encontrándose en aguas recreacionales, aguas municipales, agua potable; sobreviviendo a los detergentes al igual que otros grupos de la familia Enterobacteriaceae, también se llega a encontrar en chocolates y cacao en polvo (Clark et al, 1982; Kramer y Nickerson, 1984; Robertson, 1984; De-Simón Serra, 1986).

2.1.4 Citrobacter amalonaticus,  
Citrobacter freundii.

Grupo indicador de contaminación fecal, también asociado con infecciones gastrointestinales, además de infecciones del tracto digestivo también del tracto respiratorio, infecciones cutáneas, septicemias en fluidos intravenosos infectados y meningitis, contaminante de aguas municipales, agua potable y acuarios ornamentales siendo resistente a los detergentes (Clark et al, 1982; Kramer y Nickerson, 1984; Austen y Trust, 1981; Guarino et al, 1987).

2.1.5 Klebsiella oxytoca,  
Klebsiella ozaenae,  
Klebsiella pneumoniae,  
Klebsiella rhinoscleromatis.

Grupo indicador de contaminación fecal; las infecciones por Klebsiella usualmente resultan de K. pneumoniae. Pero reportes recientes han demostrado que también K. oxytoca, K. ozaenae y K. rhinoscleromatis están relacionadas a infecciones que afectan al hombre gravemente, por ejemplo rinitis crónica, sinucitis, atrofia nasal y neumonía, además de ser bacterias que también resisten a los detergentes y habitar, además del ser humano, las aguas municipales y potables (Clark et al, 1982; Domenico, 1985; Kramer y Nickerson, 1984; Bae et al, 1981; Murray et al, 1984).

## 2.2 CROMATOGRAFIA DE GASES.

La cromatografía de gases ha sido hasta la fecha un invaluable auxiliar en muchos campos de la investigación científica. Dentro del campo tan amplio de aplicación que tiene dicha técnica, se han incrementado de un tiempo a la fecha (aproximadamente a partir de 1962) las investigaciones sobre los constituyentes de las células bacterianas específicamente el contenido de ácidos grasos, obteniendo con esto un vertiginoso avance en aspectos taxonómicos, tomando en cuenta que cada día se requieren estudios más rápidos y precisos (O'Leary, 1962; Häusler y Richter, 1985).

La cromatografía de gases difiere en dos formas: la cromatografía gas líquido (GLC) y la cromatografía gas sólido (GSC) (Burchfield y Stoors, 1970).

### 2.2.1 FUNDAMENTOS DE LA CROMATOGRAFIA DE GASES.

Keulemans ha propuesto la siguiente definición: La cromatografía es un proceso físico de separación en el que los componentes a desplazar se distribuyen entre dos fases, una de las cuales constituye un lecho estacionario de gran desarrollo superficial y la otra es un fluido o gas que pasa a través o a lo largo del lecho estacionario (Storch De Gracia, 1975).

El principio de la cromatografía de gases se basa en la separación de los componentes volátiles de una mezcla, por medio de la elución de estos a través de una fase estacionaria adsorbida sobre un soporte y el paso de una fase móvil o gas acarreador (Dabrio, - 1973; Storch De Gracia, 1975).

En la cromatografía de gases la fase móvil esta integrada por la mezcla a resolver y por un gas inerte, que sirve para eluir la muestra (Storch De Gracia, 1975).

La fase estacionaria puede ser un sólido (GSC), en cuyo caso la retención selectiva de los componentes de la mezcla a resolver se debe a fenómenos consecutivos de adsorción y desadsorción.

La fase estacionaria puede ser un líquido depositado sobre un soporte sólido (GLC), en cuyo caso los fenómenos son de absorción y desabsorción. El soporte sólido puede ser el empaque de la columna o bien la pared interior del tubo que la forma (Burchfield y Stoops, 1970; Storch De Gracia, 1975).

La absorción es la retención de una especie química por parte de una masa, debido a la tendencia que tiene esta a formar mezcla con la primera, y el fenómeno de adsorción es la retención de una especie química por parte de los puntos activos de la superficie de un sólido, quedando delimitado el fenómeno a la superficie que separa las fases o superficie interfacial (Storch De Gracia, 1975).

La separación de los componentes de la mezcla a resolver se realiza emergiendo estos de la columna por separado. A la salida de la columna cromatográfica se encuentra un dispositivo de análisis (detector) y uno de recolección (colector), el detector cuyo objetivo es recibir la información procedente de la columna, posteriormente esta es convertida en una señal eléctrica para que pase al graficador donde es registrada finalmente como un cromatograma (González, 1987).

El cromatograma aparece representado por una serie de picos y cada pico corresponde a un componente; la resolución de cada pico en un cromatograma depende de dos factores: la eficiencia de la columna y la eficiencia del solvente.

Al inicio del proceso de separación existe una banda compacta inicial formada por los compuestos que integran la muestra; esta banda es arrastrada a través de la columna por el gas acarreador y sus componentes van siendo eluidos de la columna según nuevos factores como son polaridad, punto de ebullición, peso molecular, temperatura de operación, etc, (Gas Chromatography, ; González, - 1987).

Cada componente de la muestra suministra tres unidades de información: posición, altura y área de los picos en el cromatograma.

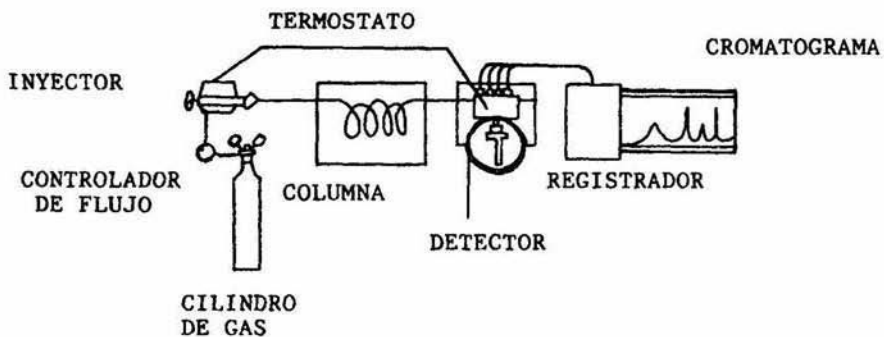
La posición es representada o expresada como un parámetro de retención, suministra la información cualitativa y las otras dos unidades representan información cuantitativa (Dabrio, 1973).

El tiempo de retención absoluto (ATR) se mide del punto de inyección a la punta del pico, en cm, pulgadas o minutos y como se mencionó anteriormente este constituye un indicio cualitativo de cada componente bajo las mismas condiciones de análisis (González, 1987).

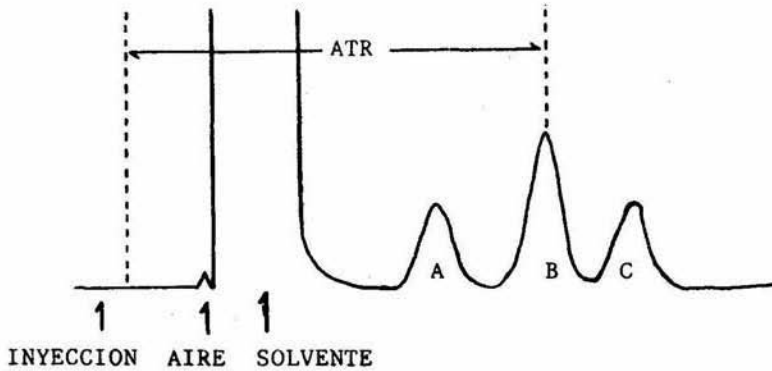
Los elementos esenciales de un cromatógrafo de gases analítico son:

Cilindro de alta presión de gas acarreador (He, N, H), reguladores de presión y válvulas de flujo, inyector, columna cromatográfica, detector, colector, sistema de programación, sistema de amplificación, registrador gráfico e integrador.

DIAGRAMA DE UN SISTEMA DE CROMATOGRAFIA DE GASES



## CROMATOGRAMA



Se pueden hacer varias observaciones sobre este cromatograma:

- 1.- Esta formado por tres compuestos además del aire y del solvente.
- 2.- El pico que tiene el tiempo de retención más corto, probablemente tiene menor peso molecular.
- 3.- El compuesto "B" tiene una concentración mayor, y los compuestos "A" y "C" tienen una concentración similar y menor que "B".

## 2.2.2 IDENTIFICACION CROMATOGRAFICA.

### DATOS DE RETENCION.

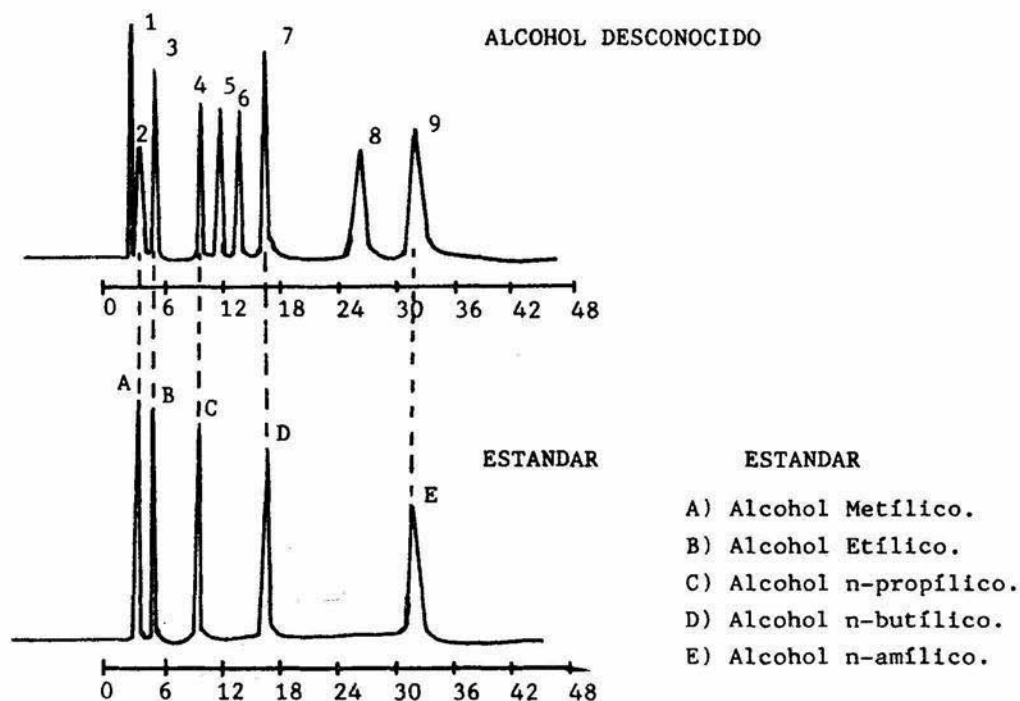
El parámetro usado para determinar la elución de un compuesto es el tiempo de retención absoluto (ATR), bajo condiciones constantes de presión, flujo y temperatura, tomando en cuenta que el rango de flujo es lineal con respecto al tiempo. Este tiempo de retención es característico de la muestra y la fase estacionaria, además es usado para identificar la muestra problema. La identificación se basa en una comparación de los tiempos de retención de el componente desconocido con los datos obtenidos de un compuesto conocido, analizado bajo las mismas condiciones (Mc Nair y Bonelli, 1968).

### REPRODUCIBILIDAD DEL TIEMPO DE RETENCION

Tiempo de Retención (segundos)					
Compuesto	Corrida 1	Corrida 2	Corrida 3	Corrida 4	Promedio
C <sub>7</sub>	231	231	232	230	231
C <sub>8</sub>	302	301	305	300	302
C <sub>9</sub>	389	389	395	387	390
C <sub>10</sub>	521	522	528	519	523
C <sub>12</sub>	863	864	868	865	865
C <sub>14</sub>	1191	1190	1195	1193	1192



## IDENTIFICACION POR MEDIO DE ESTANDARES



Cromatograma que muestra la mezcla de un alcohol desconocido y una solución de alcohol estándar analizados bajo las mismas condiciones. Por comparación de cromatogramas es posible identificar los siguientes picos 2,3,4,7 y 9 como metílico, etílico, n-propílico, n-butílico y n-amílico.

### 2.3 ACIDOS GRASOS CONSTITUYENTES DE LA CELULA BACTERIANA.

El contenido total de ácidos grasos de la mayoría de las especies de bacterias se encuentran distribuidos en la pared celular, membrana plasmática e inclusiones citoplasmáticas (O'Leary, 1962).

Incluyendo todos los lípidos, estos son mucho más abundantes en la pared de las células gram negativas que en la de los gram positivos. Los diagramas de difracción de rayos "X" indican que en la pared de Escherichia coli hay lípidos cristalinos formando capas de unos 200 Å, en la que las cadenas carbonadas no polares están ordenadas en dirección perpendicular a la superficie (Sénez, 1976).

#### ACIDOS GRASOS BACTERIANOS

Nombre Común	Nombre Sistemático	Fórmula
Acido Láurico	Dodecanoico	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{10}-\text{COOH}$
Acido Mirístico	Tetradecanoico	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{12}-\text{COOH}$
Acido Palmítico	Hexadecanoico	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{14}-\text{COOH}$
Acido Esteárico	Octadecanoico	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{16}-\text{COOH}$
Acido Araquídico	Eicosanoico	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{18}-\text{COOH}$
Acido Behénico	Docosanoico	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{20}-\text{COOH}$
Acido Lignocérico	Tetracosanoico	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{22}-\text{COOH}$
Acido Montánico	Octacosanoico	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{26}-\text{COOH}$

Nombre Común	Nombre Sistemático	Fórmula
Acido -Hidroxi <b>but</b> írico	3-Hidroxi <b>but</b> írico	$\text{CH}_3\text{-CH(OH)-CH}_2\text{-COOH}$
Acido Mevalónico	3,5-Dihidroxi-3-metil pentanoico	$\text{HO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}\overset{\text{OH}}{\underset{\text{CH}_3}{\text{C}}}\text{-CH}_2\text{-COOH}$
Acido -Hidroxi <b>oct</b> anoico	3-Hidroxi <b>oct</b> anoico	$\text{CH}_3\text{-(CH}_2)_4\text{-CH(OH)-CH}_2\text{-COOH}$
Acido -Hidroxi <b>dec</b> anoico	3-Hidroxi <b>dec</b> anoico	$\text{CH}_3\text{-(CH}_2)_6\text{-CH(OH)-CH}_2\text{-COOH}$
Acido -Hidroxi <b>dodec</b> anoico	3-Hidroxi <b>dodec</b> anoico	$\text{CH}_3\text{-(CH}_2)_8\text{-CH(OH)-CH}_2\text{-COOH}$
Acido -Hidroxi <b>miríst</b> ico	3-Hidroxi <b>tetradec</b> anoico	$\text{CH}_3\text{-(CH}_2)_{10}\text{-CH(OH)-CH}_2\text{-COOH}$
Acido Di-Hidroxi <b>estear</b> ico	Di-Hidroxi <b>octadec</b> anoico	$\text{C}_{17} \text{H}_{33}(\text{OH})_2 \text{COOH}$
Acido Corinomicólico		$\text{CH}_3\text{-(CH}_2)_{14}\text{-CH(OH)-}\underset{\text{C}_{14}\text{H}_{29}}{\text{CH}}\text{-COOH}$
Acido Corinomicolénico		$\text{CH}_3\text{-(CH}_2)_5\text{-CH=CH-(CH}_2\text{)-}\underset{\text{C}_{14}\text{H}_{29}}{\text{CH(OH)-CH}}\text{-COOH}$

Cont. Acidos grasos bacterianos.

Nombre Común	Nombre Sistemático	Fórmula
Acido Corinólico		$\text{CH}_3\text{-CH(OH)-}(\text{CH}_2)_7\text{-CH-CH(OH)-CH-CH-CH}_3$ $\begin{array}{c}   \qquad \qquad \qquad   \qquad \qquad \qquad   \\ \text{CH}_3 \qquad \qquad \qquad \text{CH}_3 \qquad \qquad \qquad \text{C-COOH} \\   \\ \text{H} \end{array}$ $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{14}\text{-CH-}(\text{CH}_2\text{)}_{17}\text{-C-COOH}$ $\begin{array}{c}   \\ \text{CH}_3 \end{array}$
Acido Isooctanoico	Metilhepatanoico	$\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_x\text{-CH-}(\text{CH}_2\text{)}_y\text{-COOH} \quad (x + y = 4)$ $\begin{array}{c}   \\ \text{CH}_3 \end{array}$
	6-Metiloctanoico	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH-}(\text{CH}_2\text{)}_4\text{-COOH}$ $\begin{array}{c}   \\ \text{CH}_3 \end{array}$
	13-Metiltetradecanoico	$\text{CH}_3\text{-CH-}(\text{CH}_2\text{)}_{11}\text{-COOH}$ $\begin{array}{c}   \\ \text{CH}_3 \end{array}$
	15-Metilhexadecanoico	$\text{CH}_3\text{-CH-}(\text{CH}_2\text{)}_{13}\text{-COOH}$ $\begin{array}{c}   \\ \text{CH}_3 \end{array}$

Cont. Acidos grasos bacterianos.

Nombre Común	Nombre Sistemático	Fórmula
	Metileno-Hexadecanoico	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_x \begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \\ \diagdown \quad / \\ \text{C} \\ / \quad \diagdown \\ \text{C} \quad \text{C} \\ \vdots \quad \vdots \\ \text{H} \quad \text{H} \end{array} (\text{CH}_2)_y-\text{COOH} \quad (x+y=12)$
Acido Lactobacílico	cis-11,12-Metileno Octadecanoico	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_5 \begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \\ \diagdown \quad / \\ \text{C} \\ / \quad \diagdown \\ \text{C} \quad \text{C} \\ \vdots \quad \vdots \\ \text{H} \quad \text{H} \end{array} (\text{CH}_2)_9-\text{COOH}$
	Tetradecenoico	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_x-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_y-\text{COOH} \quad (x+y=10)$
	Hexadecenoico	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_x-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_y-\text{COOH} \quad (x+y=12)$
Acido Palmitoleico	cis-9-Hexadecenoico	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_5-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$
Acido Palmitvaccénico	cis-11-Hexadecenoico	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_9-\text{COOH}$
	Octadecenoico	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_x-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_y-\text{COOH} \quad (x+y=14)$
Acido Oleico	cis-9-Octadecenoico	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$
Acido cis-Vaccénico	cis-11-Octadecenoico	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_5-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_9-\text{COOH}$

Cont. Acidos grasos bacterianos

Nombre Común	Nombre Sistemático	Fórmula
	Eicosanoico	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_x-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_y-\text{COOH}$ ( $x+y=16$ )
	Eneicosanoico	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_x-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_y-\text{COOH}$ ( $x+y=17$ )
	Docosenoico	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_x-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_y-\text{COOH}$ ( $x+y=18$ )
	Tetracosenoico	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_x-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_y-\text{COOH}$ ( $x+y=20$ )
	Octacosenoico	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_x-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_y-\text{COOH}$ ( $x+y=24$ )

Cont. Acidos grasos bacterianos

## 2.4 BIOSÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS BACTERIANOS.

Las bacterias no acumulan lípidos como material de reserva, sin embargo contienen cantidades considerables de ellos como constituyentes de sus sistemas membranosos (Gottschalck, 1979).

Los ácidos grasos de las bacterias pueden ser saturados o no saturados, o tener uno o más dobles enlaces, y el precursor de dichos ácidos grasos es el Acetil Coenzima A (Acetil CoA) (Gottschalck, 1979).

La biosíntesis es llevada a cabo por un proceso que difiere significativamente del proceso opuesto de la oxidación de ácidos grasos y tal vez la diferencia más inesperada estriba en que el dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) es esencial para la síntesis de ácidos grasos en los extractos celulares (Lehninger, 1979).

El Acetil CoA procedente de glúcidos y aminoácidos, es el precursor primordial de todos los átomos de carbono de la cadena de ácido graso. Sin embargo de las ocho unidades de acetilo requeridas para la biosíntesis del ácido palmítico solamente una es aportada por el Acetil CoA, mientras que las otras siete llegan en forma de Malonil Coenzima A (Malonil CoA) formado a partir de Acetil CoA y bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ), mediante una reacción de carboxilación (O'Leary, 1962; Lehninger, 1979).

La única molécula de Acetil CoA requerida para el proceso sirve como iniciador o cebador; los dos átomos de carbono de su grupo acetilo se convierten en los átomos de carbono terminales (15 y 16) del ácido palmítico formado. Así, el crecimiento de la cadena durante la síntesis del ácido graso comienza en el grupo carboxilo del Acetil CoA y continúa por la adición sucesiva de restos acetilo al extremo carboxilo de la cadena en crecimiento. Una característica distintiva del mecanismo de biosíntesis del ácido graso consiste en que los productos intermedios del proceso de alargamiento de la cadena son tioésteres, pero no del CoA, como en la oxidación del ácido graso sino de una proteína conjugada de bajo peso mole -

cular, denominada Proteína Portadora de Acilos (ACP). Esta proteína puede formar un complejo, o complejos, con las otras seis proteínas enzimáticas requeridas para la síntesis completa del ácido palmítico (Rose, 1976; Gottschalck, 1979; Lehninger, 1979).

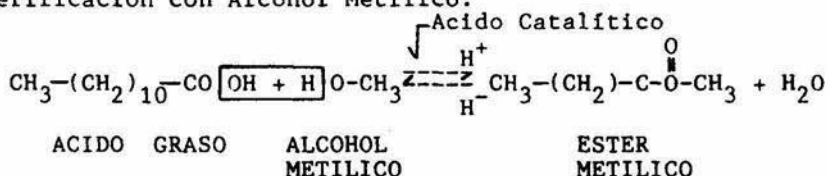
Una vez formado el Malonil CoA a partir del Acetil CoA y el  $\text{HCO}_3^-$  ( $\text{HCO}_3^-$  que es la especie activa en vez del  $\text{CO}_2$ ) por la reacción compleja de la Acetil CoA-Carboxilasa, las reacciones siguientes de la síntesis del ácido graso se realizan en seis etapas sucesivas, catalizadas por las seis enzimas del sistema de la ácido-graso-sintetasa. La séptima proteína no posee actividad catalítica alguna, es la ACP a la cual esta unida covalentemente la cadena del ácido graso en crecimiento (Gottschalck, 1979; Lehninger, 1979).



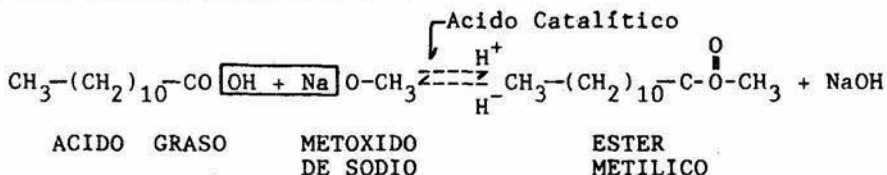
## 2.5 ESTERIFICACION DE ACIDOS GRASOS.

La reacción para efectuar la esterificación es el ejemplo más importante de sustitución nucleofílica, en donde los ácidos grasos reaccionan con el alcohol metílico ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) o con una molécula semejante a este y que realice la misma función, como es el caso del metóxido de sodio ( $\text{CH}_3\text{ONa}$ ); necesarios para la metilación del ácido graso o ácidos grasos.

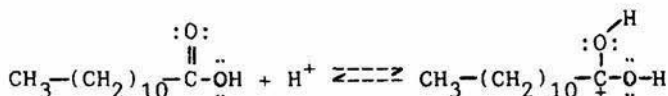
Esterificación con Alcohol Metílico.



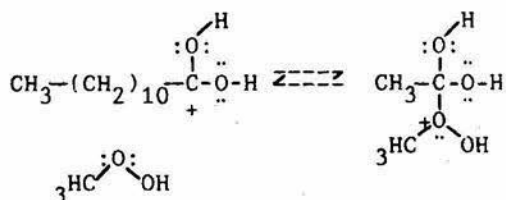
Esterificación con Metóxido de Sodio.



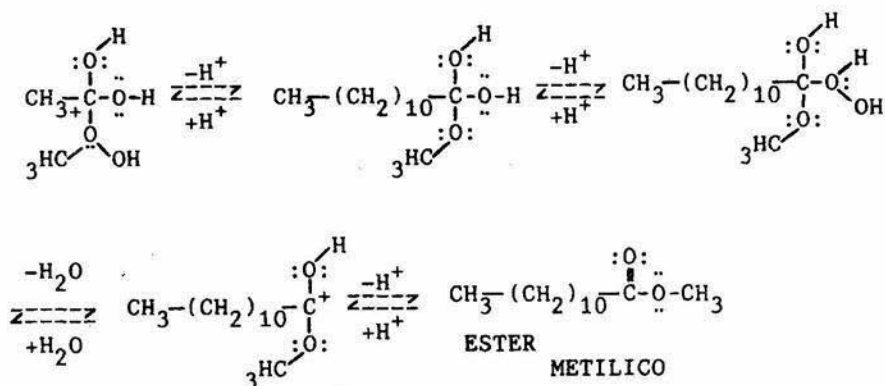
La reacción de esterificación requiere la presencia de un ácido catalizador. El primer paso de la reacción, es la protonación del grupo carboxilo hacia el doble enlace de oxígeno del ácido graso.



El grupo carboxilo protonado es rápidamente atacado nucleofílicamente.



El producto formado por este ataque bajo una transferencia del ión hidronio y una eliminación, dan el producto final (Glass, 1971; Monson y Shelton, 1974).



### 3 OTRAS TECNICAS UTILIZADAS PARA EL ANALISIS DE ACIDOS GRASOS.

#### 3.1 Destilación.

La destilación fraccional es usada para separar ácidos grasos en base a la longitud de sus cadenas. Los ácidos grasos son transformados a ésteres metílicos por calentamiento y llevar a cabo la destilación al alto vacío y usando bajas temperaturas. La temperatura a la que cada componente es obtenido, indica el número de átomos de carbono presentes en las moléculas destiladas, sin embargo, no se puede distinguir la diferencia entre compuestos saturados e insaturados que tienen la misma longitud; para ello es necesario utilizar otras técnicas las cuales ayuden a elucidar el tipo de compuesto que se está tratando (O'Leary, 1962).

#### 3.2 Cristalización.

Durante mucho tiempo se ha usado la cristalización diferencial como un método de separación de ácidos saturados e insaturados, tomando en cuenta la formación de sales. Esta cristalización fraccional de los ácidos grasos libres se realiza a bajas temperaturas. Con este procedimiento es posible realizar completamente la separación de los ácidos saturados y de los insaturados. Los procesos de cristalización a bajas temperaturas se realizan de - 20 a - 70 °C y solventes apropiados (O'Leary, 1962).

#### 3.3 Distribución a contracorriente.

En esencia este método consiste en el tratamiento de una muestra a lo largo de un número de extracciones líquido - líquido sucesivas en un aparato de tubos múltiples, en donde se permite el paso de un solvente al próximo tubo de la serie, independientemente del otro solvente usado. Los componentes de la muestra son distribuidos de acuerdo a su relativa solubilidad en cada solvente.

La separación de los ácidos grasos por contracorriente se ve

afectada por la longitud de la cadena y el grado de insaturación de los componentes de la muestra (O'Leary, 1962).

### 3.4 Cromatografía.

Existen algunos métodos planeados para el análisis de ácidos grasos. Estas técnicas varían en aplicación y en efectividad, para el presente propósito pueden ser divididos en tres grupos: Cromatografía de adsorción, Cromatografía de partición y Cromatografía de gases.

#### 3.4.1 Cromatografía de adsorción.

Las técnicas de adsorción usan carbón, ácido silícico o alúmina. Sin embargo este método se ha probado y no ha dado el resultado esperado en el análisis de ácidos grasos. Una variación de la cromatografía de adsorción y que ha sido próspera para el análisis de ácidos grasos, es la técnica empleada por Holman y otros, quienes han usado con resultados satisfactorios la cromatografía de los ésteres de los ácidos grasos en papel de fibra de vidrio impregnada con sílica gel denominada "Thin Layer Chromatography" o Cromatografía de Placa Fina (Christie, 1982).

#### 3.4.2 Cromatografía de partición.

La cromatografía de partición tanto en columna como en papel han sido utilizados para la investigación de ácidos grasos, y en particular los procedimientos en papel de fase invertida. La técnica de Baldingh's usa polvo de caucho como soporte para la fase estacionaria no polar, y mezcla de acetona - agua como solvente para la elución (O'Leary, 1962).

La cromatografía de papel en fase invertida es usada cuando se trata con cantidades muy pequeñas. Desafortunadamente, es necesario impregnar el papel con varios materiales como son látex, hidrocarburos o silicones, lo que introduce otras variables dentro de esta compleja operación (Stock y Rice, 1974).

### 3.5 Espectroscopía.

#### 3.5.1 Espectroscopía de adsorción infrarroja.

La espectroscopía infrarroja fué la primera de las técnicas espectroscópicas aplicadas al análisis de lípidos en general y en particular los ácidos grasos (Christie, 1982).

La frecuencia de la región infrarroja es absorbida por una molécula, de este modo se incrementa la amplitud de las vibraciones en enlaces específicos, entre los átomos de las moléculas. La región de medida más conveniente del espectro infrarrojo esta entre el ámbito de 2.5 - 15  $\mu$ m. Los enlaces entre átomos específicos en sistemas moleculares definidos absorben energía a una cierta frecuencia, la cual es característica y puede ser usada como diagnóstico en el estudio de enlaces específicos en moléculas desconocidas (Christie, 1982).

El análisis por el espectro infrarrojo tiene tres aplicaciones esenciales: la determinación en detalle de la estructura molecular de un compuesto; detectar la presencia de sustancias no identificadas en mezclas complejas y por último la determinación individual de compuestos por comparación de su espectro con otros de espectro ya conocido (O'Leary, 1962).

#### 3.5.2 Espectroscopía de absorción de luz ultravioleta.

La espectroscopía de luz ultravioleta es hoy en día utilizada principalmente para detectar o confirmar la presencia de ácidos grasos con sistemas de dobles enlaces. Los isómeros geométricamente distintos tienen espectros significativamente diferentes (Christie, 1982).

### 3.6 Espectrometría.

#### 3.6.1 Espectrometría de masas.

Una gran variedad de ácidos grasos sintéticos y saturados han sido examinados por espectrometría de masas. Una alta proporción

de datos han sido obtenidos de los ésteres metílicos de los ácidos grasos de donde se obtiene que los ácidos grasos de cadena larga son rápidamente identificados.

El espectro de masas de ésteres metílicos de ácidos grasos insaturados difieren grandemente de los que corresponden a compuestos saturados (Christie, 1982).

### 3.6.2 Espectrometría de resonancia magnética nuclear.

En años recientes la Resonancia Magnética Nuclear (NMR) ha sido aplicada a la identificación de estructuras lipídicas y en particular a la detección y localización de los sistemas con doble enlace en cadenas de ácidos grasos (Christie, 1982).

De los estudios hechos ha dichos compuestos es conocido que la posición de los dobles enlaces afectan el espectro de la NMR de los ácidos grasos de cadena larga. Por ejemplo del cis 2 al cis 5- y cis 14 al cis 17 que son isómeros monoenoicos es posible puedan ser distinguidos por esta técnica (Christie, 1982).

Los esterios metílicos son generalmente disueltos en tetracloruro de carbono para el análisis de espectrometría de NMR, pudiendo también ser usados el cloroformo o el cloroformo deuterado (Christie, 1982).

#### 4 ANTECEDENTES.

La Bacteriología se ha desarrollado por hace más de 100 años como una disciplina científica, sirviendo principalmente a propósitos sanitarios y epidemiológicos. En los últimos años se ha prestado una especial atención a los aspectos ecológicos ambientales (Häusler y Richter b, 1987).

Uno de los puntos principales de esta disciplina científica, es el que se ha enfocado a la determinación de polución fecal, haciendo énfasis en el grupo coliforme incluyendo los patógenos (enterobacterias), los cuales son claros indicadores de contaminación fecal y en consecuencia un peligro potencial para la salud. Por esta razón, es necesario acelerar los procesos de identificación de microorganismos que de una manera u otra afectan directamente al hombre y su ambiente (Häusler y Richter b, 1987).

De 1962 a la fecha se han desarrollado trabajos de gran importancia Bacteriológica, en donde se ha procedido a analizar los componentes químicos celulares de bacterias que interaccionan continuamente con el hombre. Estos análisis se han realizado y se realizan hasta la fecha mediante la cromatografía de gases.

En 1963 Kaneda efectuó el aislamiento e identificación de ácidos grasos provenientes de Bacillus subtilis (ATCC 7059), los ácidos identificados fueron los siguientes: 12 - metiltetradecanoico, 14 - metilhexadecanoico, isopentadecanoico, isopalmítico, palmítico, isoheptadecanoico, isomirístico y mirístico, en orden de abundancia respectivamente. En 1966 Cho y Salton estudiaron la composición de ácidos grasos en la membrana y pared, encontrando que en la membrana de gram positivos aerobios se presenta una alta concentración del metiltetradecanoico. El organismo termofílico, Bacillus stearothermophilus contiene una cantidad substancial de metilhexadecanoico y metiltetradecanoico. La pared de bacteria gram negativas esta compuesta de ácido palmítico, ácido palmitoleico y ácido oleico. En 1968 Cechini y O'Brien y en 1975 Newman y O'Brien

procedieron a identificar Escherichia coli. Brooks et al, en 1969 diferenciaron a Clostridium sordelli y Clostridium bifermentans por cromatografía de gases; Moos y Dunkelberg estudiaron los ácidos grasos de Haemophilus vaginalis. En 1971 Brooks et al analizaron los ácidos grasos provenientes de extractos de especies de Neisseria. En 1971 Kaneda estudió los factores que afectan la concentración de ácidos grasos en Bacillus cereus, como son la temperatura y el medio de cultivo usado, los cuales afectan a los precursores de las porciones terminales de los ácidos grasos de cadena ramificada (L - leucina, L - isoleucina, L - valina) y los substratos relacionados. Amstein y Hartman en 1972 diferenciaron algunos enterococos usando la cromatografía de gases. En 1973 Machtinger y O'Leary enfrentaron problemas para distinguir los géneros Arizona, Citrobacter y Providencia de acuerdo al contenido de ácidos grasos celulares. Antes en 1972 Kaneda estudió la preferencia posicional de los ácidos grasos en los fosfolípidos de Bacillus cereus y su relación con la temperatura de crecimiento. Después en 1975 Vasjurenko et al diferenciaron gracias a la cromatografía de gases bacterias del grupo Proteus-Providencia. Nuevamente Vasjurenko junto con Sinjak en 1976 establecieron diferencias mínimas en la mayoría de las especies pertenecientes a los géneros Escherichia, Salmonella y Shigella. En 1977 Morbes et al desarrollaron un procedimiento cromatográfico para aislar y cuantificar la transformación de hidrocarburos aromáticos policíclicos por microbios, y en este mismo año Drucker y Veazey analizaron los ácidos grasos de Streptococcus mutans (NCTC 10832) crecido a varias temperaturas; por otro lado Alshamaony et al estudiaron la composición de ácidos grasos y ácidos micólicos de Bacterionema matruhotii y organismos relacionados, también este mismo año Vasjurenko et al distinguieron 13 especies del género Erwinia. En 1980 Boe y Gjerde establecieron patrones de ácidos grasos en la clasificación de algunas especies representativas de las familias Enterobacteriaceae y Vibrionaceae. Dees et al en 1981 estudiaron los ácido grasos



de Brucella canis y Brucella suis, encontrando que en Brucella suis se hallaba el ácido ciclopropano siendo este la característica distintiva entre ambos, en este mismo año, nuevamente Dees et al establecieron la composición celular en cuanto a ácidos grasos se refiere en microorganismos frecuentemente asociados con infecciones humanas resultado de mordeduras de perros: Pasteurella multocida. En 1981 Mc Garrity y Armstrong estudiaron los efectos de la temperatura de crecimiento y otros factores en la composición de ácidos grasos en Escherichia coli, en donde encontraron que al descender la temperatura de crecimiento también decrece la concentración de ácidos grasos saturados e insaturados, un segundo tipo de cambio posicional se da durante el crecimiento cuando los ácidos grasos insaturados se ven reemplazados por sus análogos ciclopropanos y también se da un aumento en la concentración del palmitato, concluyendo que el incremento del palmitato se da proporcionalmente de acuerdo al decremento de ácidos grasos insaturados. Posteriormente en 1982 de nueva cuenta Vasjurenko et al establecieron marcadas diferencias entre Providencia alcalifaciens y Providencia stuartii, en este mismo año Hofstad y Jantzen estudiaron los ácidos grasos de Leptotrichia buccalis, Tisdall et al identifican micobacterias aisladas de pacientes, Dees et al estudian los ácidos grasos de especies del género Capnocytophaga. Para 1983 Cernjanskaja y Vasjurenko distinguieron Salmonella por la presencia del 2 - hidroxitetradecanoico de los géneros Escherichia y Shigellalas cuales no tienen este ácido, Lambert et al distinguieron 10 especies del género Vibrio, 2 especies Aeromonas, 3 especies Photobacterium y una especie del género Plesiomonas, Athayle et al estudiaron los ácidos moclícos para identificar una bacteria coriniforme de importancia médica, Bausfield et al realizaron análisis del perfil total de ácidos grasos en la identificación de coriniformes, nocardiformes y algunas otras bacterias; Osipov et al estudia los lípidos de Methanosarcina vacuolata y Methanococcus

halophilus y Alvin et al determinan los ácidos grasos y carbohidratos monoméricos en Mycobacterium gordonae y Mycobacterium scrofulaceum. En 1984 Cernjanskaja y Vasjurenko investigaron la composición de ácidos grasos en 17 cepas del género Proteus. Minnikin et al realizaron una comparación cuantitativa de los ácidos grasos y ácidos micólicos de Mycobacterium leprae y Mycobacterium gordonae, nuevamente Minnikin et al estudiaron los lípidos libres de Mycobacterium leprae en armadillos de nueve bandas infectados, O'Donnell et al realizaron análisis numéricos del perfil de ácidos grasos en la identificación de estafilococos, Häusler y Richter realizaron la identificación de bacterias de la familia Enterobacteriaceae por cromatografía de gases, todo ello durante el año de 1985. Para 1986 Portaels et al realizaron un estudio taxonómico comparativo de micobacterias aisladas de armadillos infectados con Mycobacterium leprae, Fontaine et al efectuaron estudios taxonómicos numéricos de bacilos gram negativos anaerobios clasificados como Bacteroides ureolyticus aislados de pacientes con uretritis gonococal, Rasoamanjara et al caracterizaron especies de Flavobacterium por el análisis de ácidos grasos. En 1987 Portaels et al realizaron estudios de la composición de ácidos grasos de algunas micobacterias y su relación con Mycobacterium gordonae provenientes de armadillos; An Verhulst et al realizaron un análisis sistemático de los ácidos grasos de cadena larga de Eubacterium lentum.

## 5 JUSTIFICACION.

En la actualidad, las técnicas tradicionales de identificación de microorganismos se basan principalmente en sus características fisiológicas, morfológicas, además de pruebas serológicas.

Para la identificación de especies, es necesario efectuar un sin número de pruebas en diferentes medios de cultivo. Estos inconvenientes son eliminados por la técnica de cromatografía de gases, pues el proceso completo de identificación es de aproximadamente 32 hrs (Häusler y Richter a, 1985).

El desarrollo de esta tecnología en nuestro país abre las puertas de aumentar la investigación bacteriológica, dentro de las áreas clínica (epidemiológica y sanitaria), alimenticia, agrícola, ecológica (agua, tierra y aire), petrolera, etc.

Por las razones antes expuestas es necesario implementar esta metodología, tomando en cuenta que en nuestro país aún no se han realizado trabajos sobre esta línea. Por otro lado, en México existen diversas instituciones como Universidades, Centros de Investigación, Instituciones Gubernamentales, incluyendo industrias Paraestatales e industrias Privadas que cuentan con cromatógrafos de gases y que solo tendrían que implementar esta técnica como una línea más en sus investigaciones, optimizando de esta manera sus recursos.

Las 10 cepas que se utilizarán para este trabajo, se seleccionaron debido a la importancia que estas tienen como agentes contaminantes, presentándose como problemas serios en la industria alimenticia, farmacia, etc, además de encontrarse en cuerpos de agua tanto recreacionales como residuales. En consecuencia la contaminación del ser humano y la importancia clínica que esta reviste.

## 6 OBJETIVO.

El objetivo del presente trabajo fué la implementación de una técnica rápida y precisa para la identificación de microorganismos de la familia Enterobacteriaceae, usando para este fin la Cromatografía de Gases y como caracter taxonómico el contenido de ácidos grasos celulares.

Las metas para conseguirlo fueron:

1.- Liofilización de cepas puras de:

Citrobacter amalomaticus,

Citrobacter freundii,

Enterobacter aerogenes,

Enterobacter agglomerans,

Enterobacter cloacae,

Escherichia coli,

Klebsiella oxytoca,

Klebsiella ozaenae,

Klebsiella pneumoniae y

Klebsiella rhinoscleromatis.

2.- Esterificación de ácidos grasos de las cepas puras.

3.- Análisis cromatográfico de los ácidos grasos transformados en ésteres metílicos.

4.- Normalización de los resultados obtenidos en el cromatograma.

5.- Elaboración de cuadros y gráficas comparativas para cada cepa, empleando el tiempo de retención y concentración de cada ácido graso (cualitativo y cuantitativo respectivamente), indispensables para la identificación.

## 7 METODOLOGIA.

### A. MATERIALES.

#### a) BIOLOGICOS.

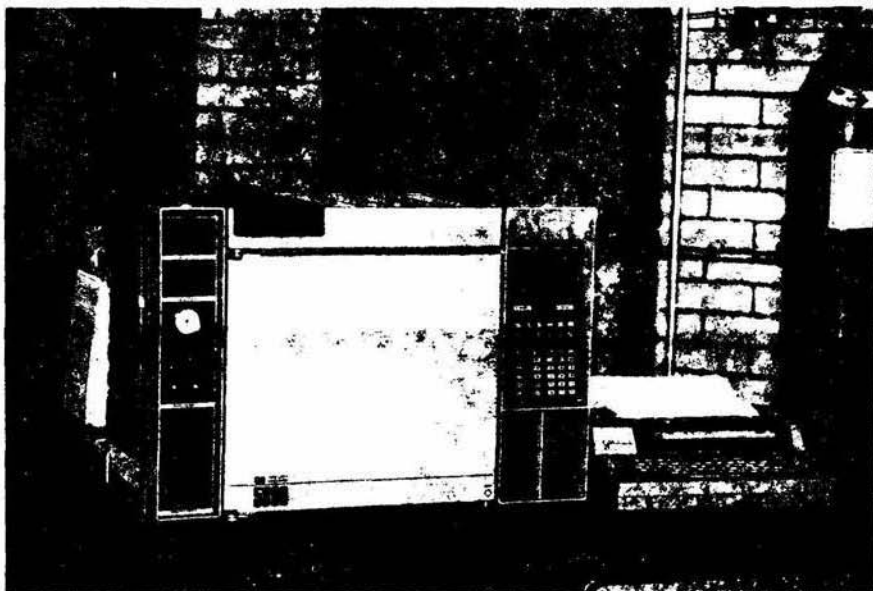
# CATALOGO ENCB	NOMBRE
- 0068	<u>Citrobacter amalonaticus</u>
- 0088	<u>Citrobacter freundii</u>
- 0100	<u>Enterobacter aerogenes</u>
- 0093	<u>Enterobacter agglomerans</u>
- 0089	<u>Enterobacter cloacae</u>
- 0029	<u>Escherichia coli</u> ATCC 25922
- 0077	<u>Klebsiella oxytoca</u>
- 0099	<u>Klebsiella ozaenae</u>
- 0094	<u>Klebsiella pneumoniae</u> ATCC 10031
- 0103	<u>Klebsiella rhinoscleromatis</u>

#### b) MEDIO Y SOLUCIONES.

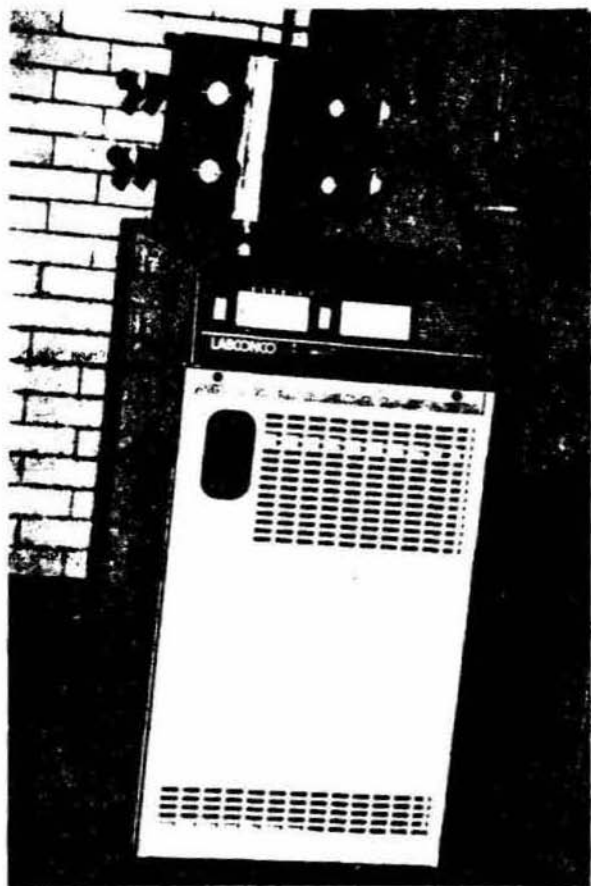
- Agar Nutriente MERCK
- Solución Fisiológica al 0.85%
- Solución de Formaldehido al 0.5% J.T. BAKER
- Solución "A". Metilato de Sodio MERCK
- Solución "B". Metanol saturado con HCl gas J.T. BAKER
- Solución "C". Solución Fisiológica al 0.85%
- Sulfato de Sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) J.T. BAKER
- Hexano grado reactivo J.T. BAKER
- Estándares de Esteres Metilicos
  - SUPELCO, INC. CAT. N° 4-7080  
LOTE N° LA 16143  
BACTERIAL ACID METHYL ESTERS MIX-CP  
10 mg/ml Metyl Caproato.

c) EQUIPO DE LABORATORIO.

- Cromatógrafo de Gases HEWLETT PACKARD HP 5890 A.
- Integrador Gas Chromatography HEWLETT PACKARD HP 5890 A.
- Centrifuga Refrigerada SUPER SPEED DU PONT Instruments SORVALL RC-5B.
- Liofilizadora LABCONCO CORPORATION, Prospect, K.C. Mo. 64132 816-333-8811 Model. 75200.
- Computadora Personal IBM INC.
- Viales con agitador magnético ALL TECH.
- Microjeringa de Cristal 10  $\mu$ l HAMILTON.
- Pipetas de 10, 5 y 1 ml PYREX.
- Gradillas de 4 X 10 espacios.
- Tubos de Ensaye.
- Autoclave.
- Incubadora
- Cajas Petri.
- Asas de Siembra.



CROMATOGRAFO DE GASES HEWLETT PACKARD HP 5890 A  
INTEGRADOR GAS CHROMATOGRAPHY HEWLETT PACKARD HP 5890 A



LIOFILIZADORA LABCONCO CORPORATION, Prospect, K.C. 64132

816-333-8811

Model. 75200



## B. METODO.

### 1.- Preparación del Cultivo Puro.

Se partió de 10 cepas diferentes, resembradas previamente en tubos con agar nutritivo inclinado. El objetivo principal del uso del agar nutritivo es que el medio sea general y que cubra los requerimientos mínimos indispensables para el crecimiento de las bacterias. Posteriormente. Cada cepa bacteriana por regla se sembraba por duplicado, con el propósito de obtener una cantidad abundante de biomasa (se obtienen aproximadamente de 20 a 30 mg. Häusler b, 1985).

Al inicio se seleccionaron 2 cepas al azar, con las cuales se hicieron 5 repeticiones por separado para estandarizar la técnica para posteriormente analizar las cepas por duplicado.

### 2.- Condiciones de Cultivo.

Una vez inoculadas todas las cepas se procedió a incubarlas a 37 °C durante 24 hrs.

### 3.- Lavado de la Biomasa.

Después de incubar las cepas por 24 hrs. se adicionaron 5 ml de formaldehído al 0.5% a cada una de las cajas con el propósito de de coleccionar la biomasa de la superficie del medio; para facilitar la colecta de la biomasa se utilizó una varilla de vidrio en forma de "L".

El contenido de las 2 cajas Petri (10 ml) se transfirió a un tubo para centrífuga y se centrifugó a 12,000 RPM durante 10 min. transcurrido este tiempo se lavó 2 veces más, utilizando solución fisiológica al 0.85%.

### 4.- Liofilización del Paquete Celular.

El sobrenadante del último lavado, fué desechado cuidadosamente y el paquete celular fué transferido a un vial para liofilizar la muestra durante 2 hrs. aproximadamente (Häusler y Richter, 1983).

#### 5.- Esterificación de los Acidos Grasos (Glass, 1971).

Aproximadamente a 20 mg de la materia seca proveniente del paquete celular se le adicionó 1 ml de solución "A" y se agitó durante 5 min., posteriormente se le adicionó solución "B" gota a gota con la ayuda de una pipeta Pasteur, hasta alcanzar un pH ácido de 1 ó 2; una vez que se alcanzó este pH se agitó durante 30 min. Transcurrido este tiempo se agregaron 2 ml de solución "C" para posteriormente realizar la extracción de los ácidos grasos transformados en ésteres metílicos, para lo cual se realizaron 3 extracciones, cada una con 1 ml de hexano, agitando entre cada extracción durante medio minuto aproximadamente, después de cada agitación se deja reposar hasta que hay una diferenciación de capas, procediendo a extraer la capa superior correspondiente al hexano y donde se encuentran los ésteres metílicos. El volumen obtenido de la extracción se transfirió a un tubo de ensayo con sulfato de sodio anhidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), este reactivo se utilizó para absorber pequeños volúmenes de agua que se hubiesen podido colar durante las extracciones. La capa de hexano conteniendo los ésteres metílicos se regresó nuevamente a un vial limpio y se evaporó con nitrógeno gas hasta obtener un volumen aproximado de 0.25 ml. De este volumen se tomó 1  $\mu\text{l}$  con una microjeringa y se inyectó en el cromatógrafo.

#### 6.- Análisis de los Acidos Grasos Transformados en Esteres Metílicos.

Las muestras fueron analizadas con el siguiente equipo: cromatógrafo de gases HEWLETT PACKARD HP 5880 A, acondicionado con un detector de ionización de flama alcalina; una columna capilar de 30 m X 0.25 cm de diámetro interno, en heliflex, RSL 150 y espesor de película de 0.25  $\mu$ ; usando hidrógeno como gas acarreador con un flujo de 30 ml/min.; las temperaturas de inyector y detector fueron isotérmicas (170 °C); el programa de temperatura del horno fue de 120°C, 4°C X min. hasta alcanzar 270°C, el tiempo de análisis varió según las necesidades de cada muestra entre 30-40 min.

Ya inyectado 1  $\mu$ l de la muestra en la columna, los resultados fueron registrados e integrados por un integrador electrónico HEWLETT PACKARD HP 5880 A Gas Chromatography.

#### 7.- Normalización del Cromatograma.

Los datos obtenidos y registrados por el integrador aparecen en un cromatograma y en él aparecen los tiempos de retención de algunos de los ácidos grasos que constituyen la célula bacteriana. Todos los cromatogramas fueron comparados contra un estándar de ácidos grasos y así lograr identificar los ácidos necesarios para la posterior determinación de la bacteria.

Por información bibliográfica se utilizó el hexadecanoato (16:0) como el ácido característico para el grupo de las Enterobacterias y fué tomado como el 100% sobre los valores del tiempo de retención y concentración. Ya establecido este ácido como el 100% se obtienen los porcentajes de los demás ácidos en cuanto a tiempo de retención y concentración (los ácidos van desde n 12:0 a n 20:0) y así efectuar la determinación. Una vez obtenidos todos los porcentajes se procedió a la elaboración de cuadros y gráficas comparativas para cada cepa (Häusler y Richter b, 1985), los resultados obtenidos se analizaron por el método estadístico del "Método de Rango" para estimar la precisión relativa (Kramer y Twigg, 1970).

#### 8.- Método de Rango.

Precisión Relativa.- Este método es utilizado para calcular la diferencia entre duplicados ó más de dos muestras. Particularmente cuando se comparan los valores de las medias y son substancialmente diferentes y el coeficiente de variabilidad no puede ser utilizado como un dato de precisión, entonces se utiliza para estos casos la precisión relativa.

Se calcula de la siguiente manera.

- a) Se calcula la sumatoria de los datos obtenidos ( $\Sigma$ ).
- b) Se calcula la media ( $\bar{X}$ ).
- c) Se calcula el Rango (R).
- d) Se calcula la Desviación Estándar

$$s = \frac{R}{d_2} .$$

$d_2$  = Valor de tablas y se obtiene tomando en cuenta el número de repeticiones o de análisis.

Ejemplo: Para prueba con tres repeticiones.

Número de análisis en grupo "X".	Factor para estimación de "s". ( $d_2$ ).
2	1.128
3	1.693
4	2.059

- e) Se calcula el Coeficiente de Variabilidad

$$V = \frac{s}{\bar{X}} .$$

- f) Se calcula la Precisión Relativa

$$n = \left[ \frac{2 s}{u.m.} \right]^2$$

donde la u.m. es el valor que nos ampliará o disminuirá el número de repeticiones, y este es considerado de acuerdo al tipo de análisis, a las posibilidades económicas del laboratorio y a la experiencia que tenga el analista.

"n" nos da el número de repeticiones para la precisión deseada con un 95% de confianza.

## 8 RESULTADOS.

Los resultados del presente trabajo se presentan en forma de cuadros y gráficas, independientes para cada microorganismo.

Cada cuadro se codifica de la manera siguiente.

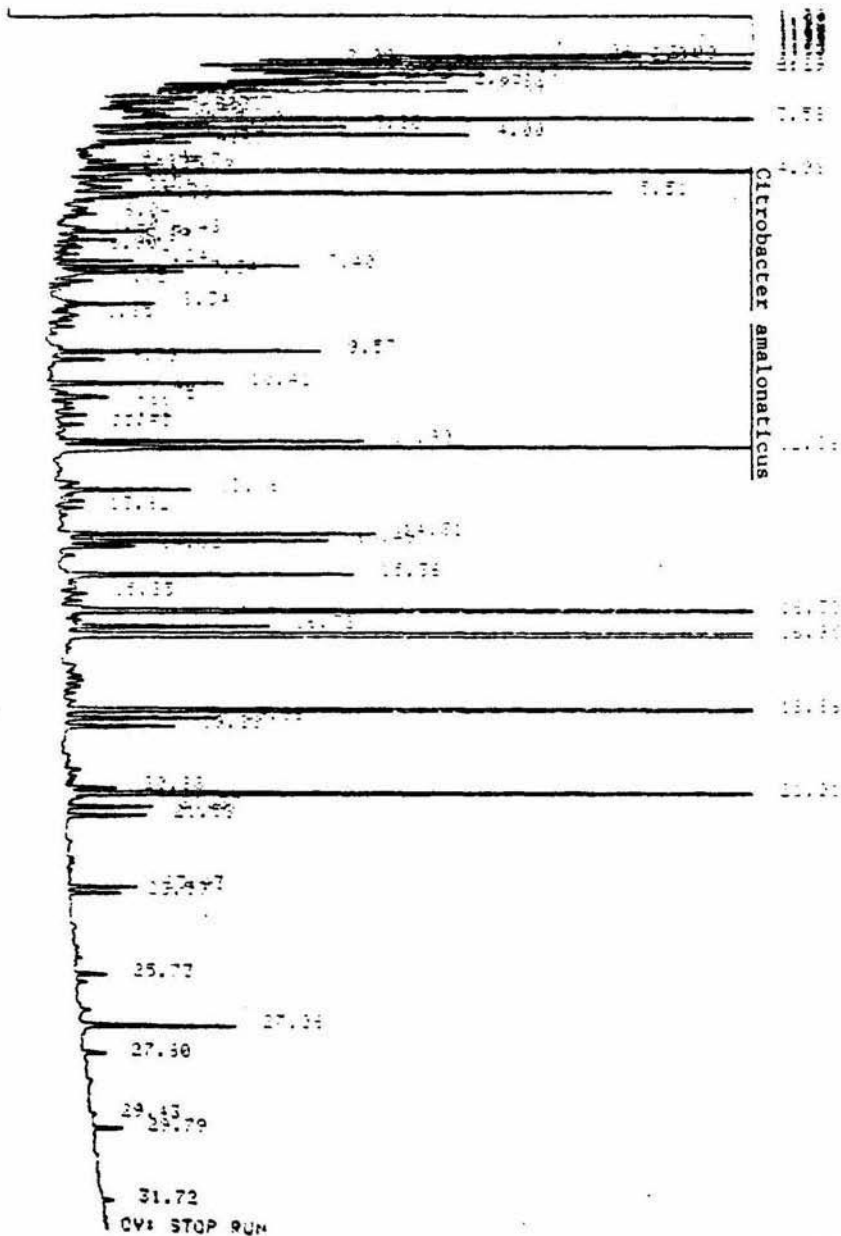
1	2	
3	4	5

- 1.- Número de Cromatograma.
- 2.- Fecha de Análisis.
- 3.- Número clave de la fórmula del ácido graso (pg. 39 ).
- 4.- Area Normalizada de cada ácido graso aislado de la célula bacteriana.
- 5.- Tiempo de Retención de cada ácido graso aislado de la célula bacteriana.

		3
1	2	4

## FORMULAS DE LOS ESTERES DE LOS ACIDOS GRASOS

- |                   |                          |
|-------------------|--------------------------|
| 1. 11:0           | 13. 1-16:0               |
| 2. 2-OH 10:0      | 14. 16:1 <sup>9</sup>    |
| 3. 12:0           | 15. 16:0                 |
| 4. 13:0           | 16. 1-17:0               |
| 5. 2-OH 12:0      | 17. $\alpha$ -17:0       |
| 6. 3-OH 12:0      | 18. 17:0 —               |
| 7. 14:0           | 19. 17:0                 |
| 8. 1-15:0         | 20. 2-OH 16:0            |
| 9. $\alpha$ -15:0 | 21. 18:2 <sup>9,12</sup> |
| 10. 15:0          | 22. 18:1 <sup>9</sup>    |
| 11. 2-OH 14:0     | 23. 18:1 <sup>9,11</sup> |
| 12. 3-OH 14:0     | 24. 18:0                 |



EXP 5832A MANUAL INJECTION @ 14:34 NOV 18, 1987  
 AREA %



## Citrobacter amalonaticus

CROM 42 7-4-89		
N	AN	TN
3	4.26	39.00
7	16.60	66.66
10	4.73	82.85
12	7.46	88.92
14	28.89	95.22
15	100.00	100.00
18	46.57	113.43
19	3.79	116.62
22	5.28	127.92
23	46.49	129.05
24	8.73	133.30

CROM 41 7-4-89		
N	AN	TN
3	6.73	39.12
7	21.06	66.82
10	2.91	83.18
12	4.34	89.50
14	26.59	95.43
15	100.00	100.00
18	37.02	113.62
19	3.60	116.80
22	5.58	128.31
23	36.73	129.30
24	13.22	133.78

CROM 37 3-12-87		
N	AN	TN
3	2.36	37.70
7	16.58	66.09
10	3.30	82.85
12	1.24	89.43
14	13.79	95.32
15	100.00	100.00
18	52.05	113.75
19	2.23	117.45
22	1.32	128.93
23	22.55	129.76
24	3.05	134.44

CROM 36 3-12-87		
N	AN	TN
3	2.28	37.99
7	27.31	66.31
10	2.59	83.31
12	3.02	88.67
14	7.48	95.54
15	100.00	100.00
18	43.79	113.98
19	0.59	116.69
22	2.01	128.93
23	15.76	129.98
24	3.95	134.59

CROM 35 18-11-87		
N	AN	TN
3	4.99	44.51
7	21.38	71.31
10	5.09	85.54
12	7.70	90.67
14	32.00	96.22
15	100.00	100.00
18	39.40	111.33
19	2.61	113.75
22	3.11	124.03
23	29.59	125.20
24	3.78	127.3

CROM 34 18-11-87		
N	AN	TN
3	1.99	44.40
7	17.38	71.27
10	6.02	85.49
12	6.55	90.62
14	31.72	96.17
15	100.00	100.00
18	30.52	111.27
19	2.44	113.75
22	1.33	123.19
23	24.66	123.95
24	1.85	127.32

N= Fórmula del ester ácido graso/ AN=área normalizada/ TN=tiempo normalizado

## Citrobacter amalonaticus

CROM 33 18-11-87		
N	AN	TN
3	5.72	44.58
7	24.89	71.14
10	5.07	85.34
12	8.07	90.46
14	33.88	96.86
15	100.00	100.00
18	33.66	111.13
19	2.17	113.49
22	4.24	122.91
23	24.07	123.79
24	3.36	127.03

Citrobacter amalonaticus

ANALISIS	3	7	10	12	14	15	18	19	22	23	24
33 18/11/87	5.72	24.89	5.07	8.07	33.80	100.00	33.65	2.17	4.24	24.07	3.36
34 18/11/87	1.99	17.38	6.02	6.55	31.72	100.00	38.52	2.44	1.33	24.66	1.85
35 18/11/87	4.99	21.38	5.09	7.70	32.00	100.00	39.40	2.61	3.11	29.59	3.78
36 03/12/87	2.28	27.31	2.59	3.02	7.48	100.00	43.79	0.59	2.01	15.76	3.95
37 03/12/87	2.36	16.58	3.30	1.24	3.79	100.00	52.05	2.23	1.32	22.55	3.85
41 07/04/89	6.73	21.06	2.91	4.34	26.59	100.00	37.02	3.60	5.58	36.73	13.22
42 07/04/89	4.26	16.60	4.73	7.46	28.89	100.00	46.57	3.79	5.28	46.49	8.73
$\Sigma$	28.33	145.20	29.71	38.38	164.27	700.00	291.01	17.43	22.87	199.85	38.47
$X^{-}$	4.04	20.74	4.24	5.48	23.46	100.00	41.57	2.49	3.36	28.55	5.49
R	4.74	10.74	3.11	6.83	30.01	000.00	18.39	3.20	4.26	30.73	11.37
s	1.75	3.96	1.15	2.52	11.09	000.00	6.80	1.18	1.57	11.36	4.20
V	0.43	0.19	0.54	0.45	0.47	000.00	0.16	0.47	0.48	0.39	0.76
n;u.m. 2	3.06	15.68	1.32	6.35	122.98	000.00	46.24	1.39	2.46	129.73	17.64
n;u.m. 3	1.36	6.96	0.58	2.82	54.66	000.00	20.55	0.61	1.09	57.65	7.84
n;u.m. 4	0.76	3.92	0.33	1.58	30.74	000.00	11.56	0.34	0.61	32.43	4.41
n;u.m. 5	0.49	2.50	0.21	1.01	19.67	000.00	7.39	0.22	0.39	20.75	2.82

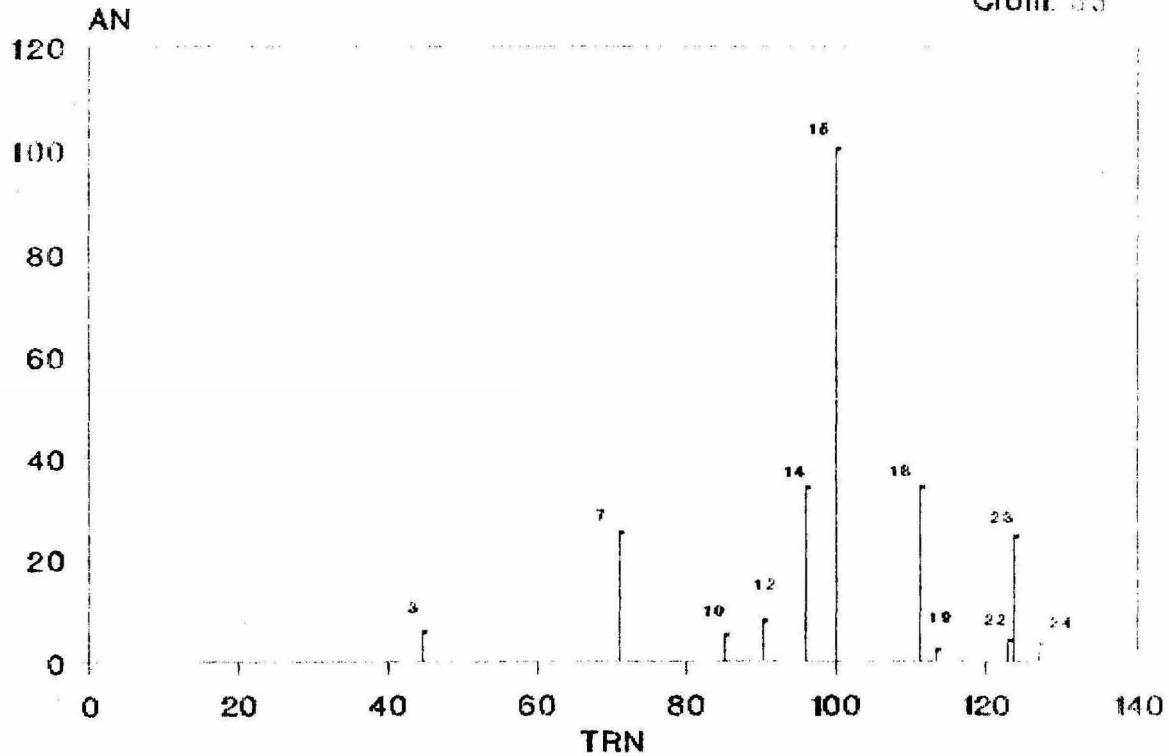
$\Sigma$  = Sumatoria      R = Rango      V = Varianza      u.m. = unidad de medición       $X^{-}$  = Media  
s = Desviación Estándar      n = número de repeticiones

# Cromatograma Normalizado

*Citrobacter amalonaticus*

Crom. 23

44



TRN - TIEMPO DE RETENCION NORMALIZADO  
AN - AREA NORMALIZADA

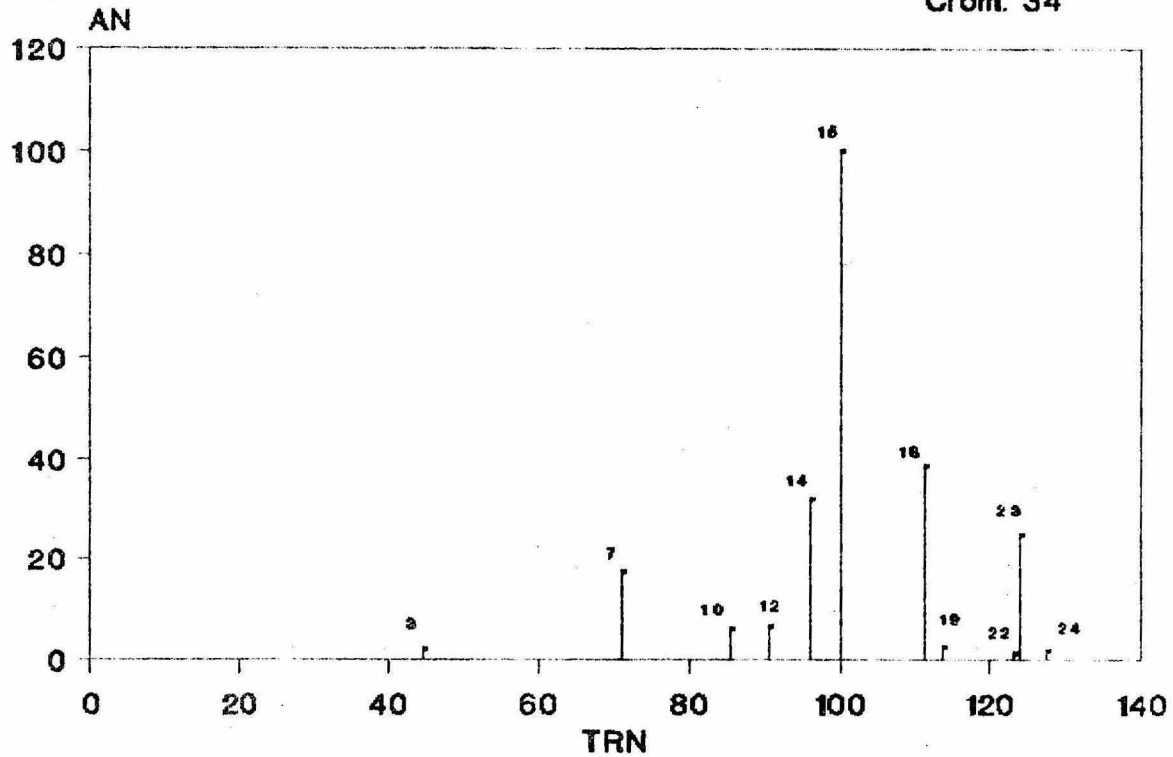
Nov 18 1987

# Cromatograma Normalizado

Citrobacter amalonaticus

Crom. 34

45



TRN - TIEMPO DE RETENCION NORMALIZADO  
AN - AREA NORMALIZADA

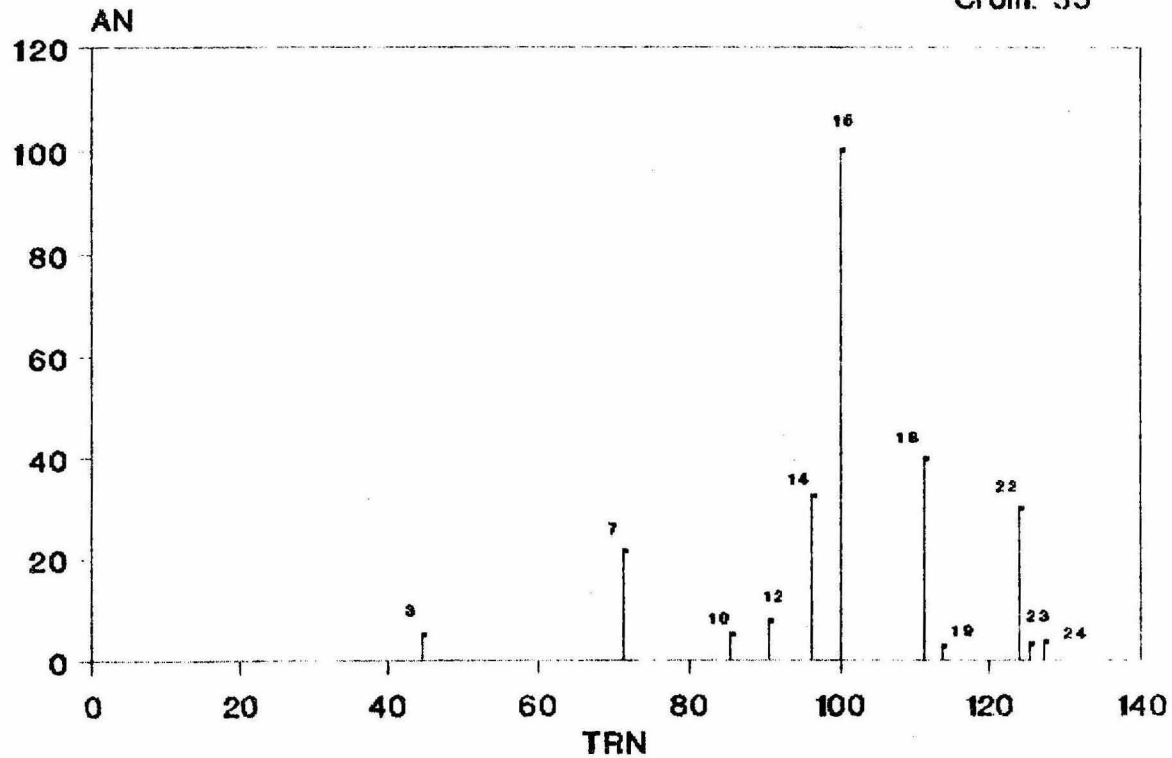
Nov. 18 1987

# Cromatograma Normalizado

Citrobacter amalonaticus

Crom. 35

97



TRN - TIEMPO DE RETENCION NORMALIZADO  
AN - AREA NORMALIZADA

Nov. 18 1987

**Falta página**

**N° 47**  

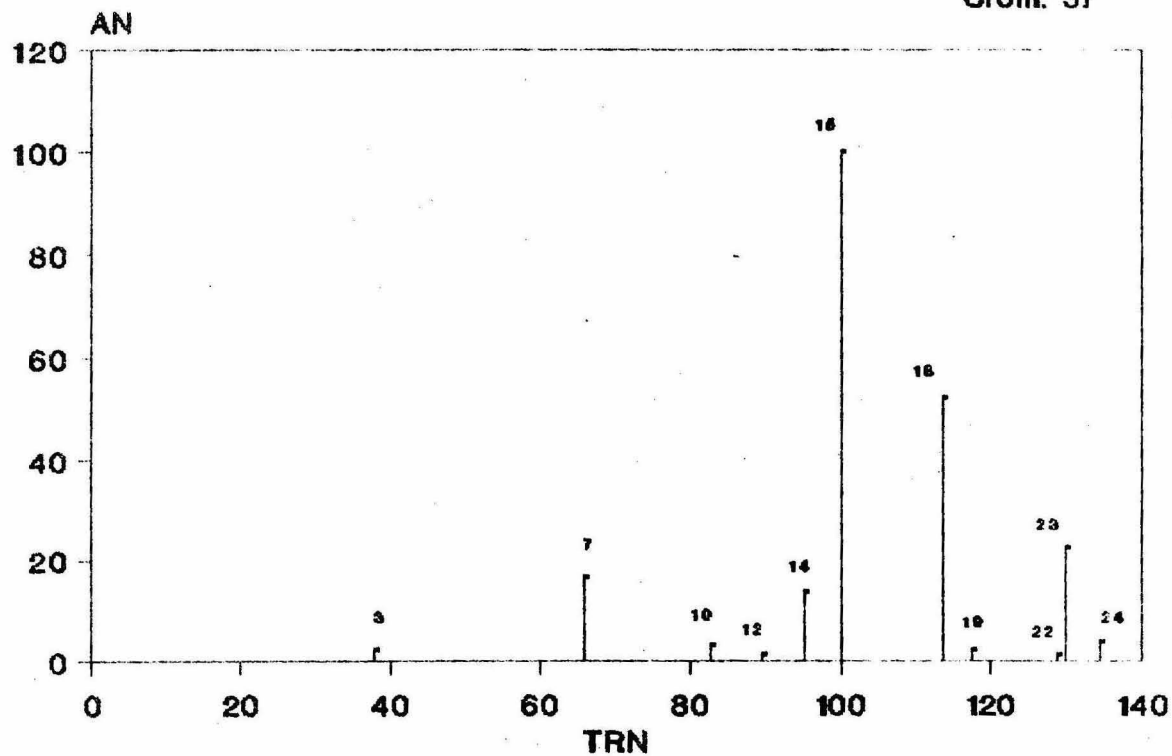
---

# Cromatograma Normalizado

Citrobacter amalonaticus

Crom. 37

87



TRN - TIEMPO DE RETENCION NORMALIZADO  
AN - AREA NORMALIZADA

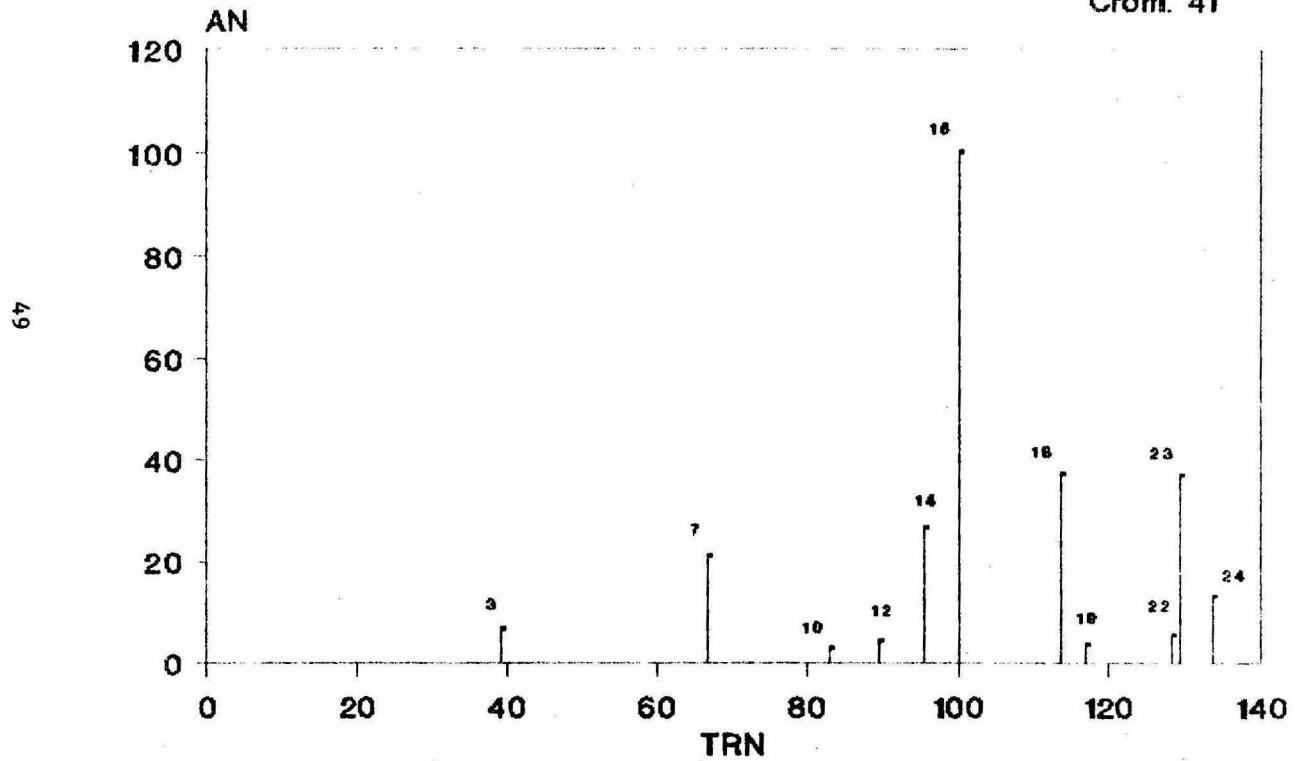
Diciembre 3 1987



# Cromatograma Normalizado

*Citrobacter amalonaticus*

Crom. 41



TRN - TIEMPO DE RETENCION NORMALIZADO  
AN - AREA NORMALIZADA

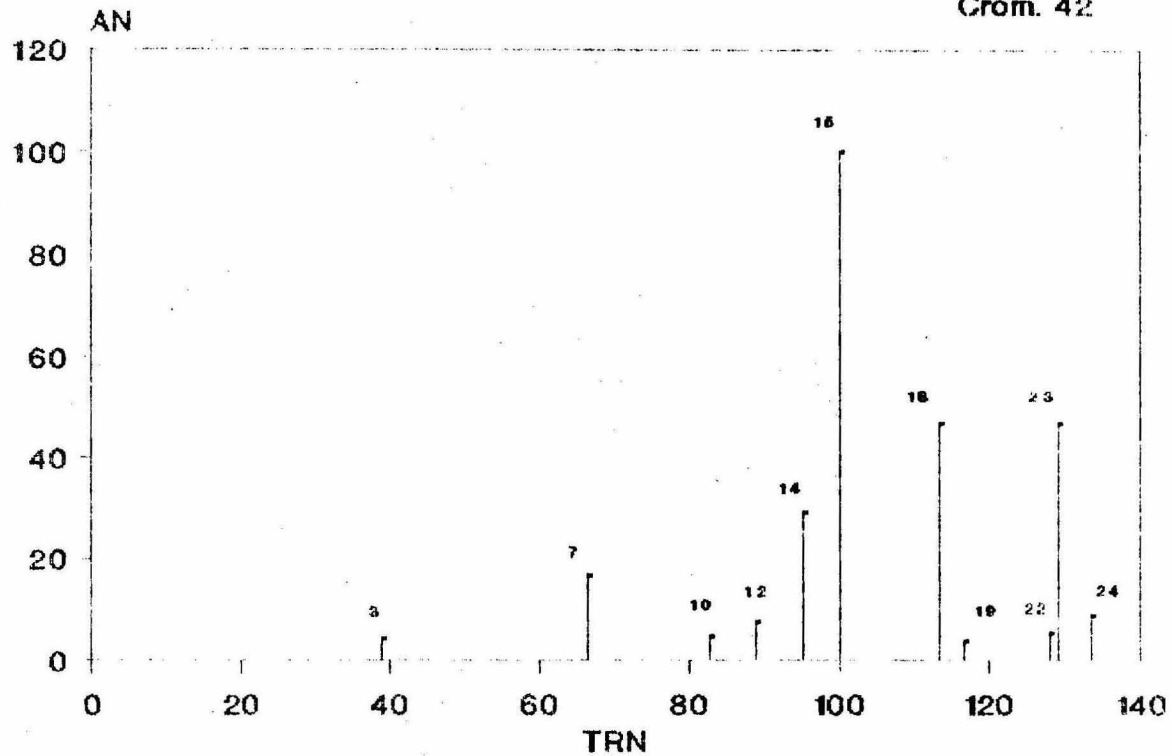
Abril 7 1989

# Cromatograma Normalizado

*Citrobacter amalonaticus*

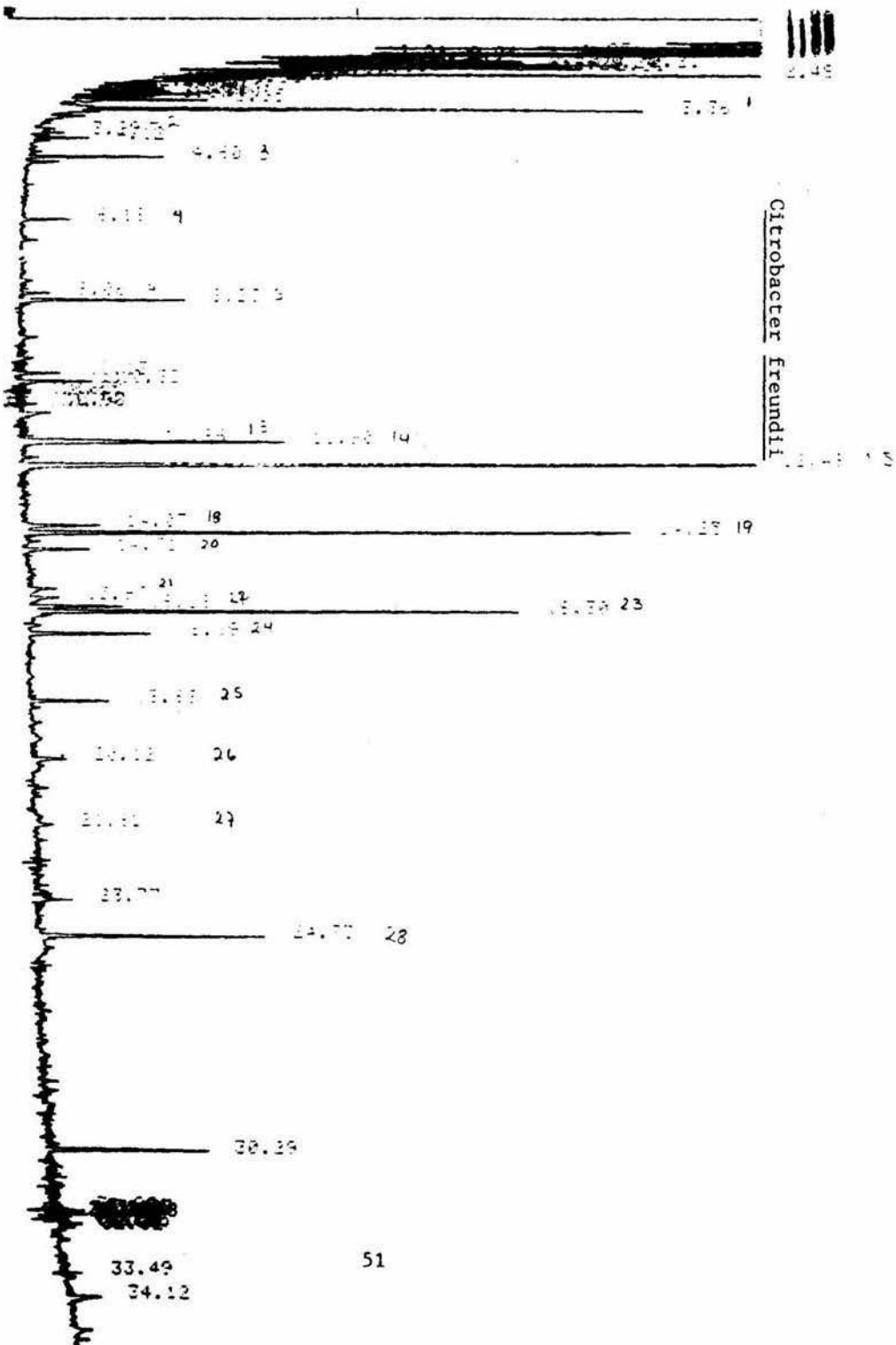
Crom. 42

50



TRN - TIEMPO DE RETENCION NORMALIZADO  
AN - AREA NORMALIZADA

Abril 7 1989



## Citrobacter freundii

CROM 9 28-10-87		
N	AN	TN
1	4.9	33.82
3	3.68	45.88
7	7.49	64.41
10	4.69	81.17
14	25.28	94.47
15	100.00	100.00
18	29.90	108.11
19	1.69	110.33
22	2.96	121.11
23	38.12	122.23
24	3.91	124.94
25	4.67	137.60

CROM 12 2-12-87		
N	AN	TN
1	3.48	26.51
3	6.17	36.66
7	16.28	66.14
10	4.95	82.88
14	42.77	94.38
15	100.00	100.00
18	32.62	113.94
19	4.15	117.65
22	4.45	129.15
23	36.33	129.92
24	10.41	134.62
25	2.59	148.11

CROM 13 3-12-87		
N	AN	TN
1	8.20	26.62
3	5.40	36.87
7	10.50	66.29
10	5.60	81.37
14	44.03	95.48
15	100.00	100.00
18	33.41	113.87
19	6.45	115.76
22	3.02	129.34
23	40.89	129.86
24	5.45	134.69
25	3.13	149.32

CROM 21 24-02-89		
N	AN	TN
1	6.15	25.22
3	6.79	36.83
7	13.43	65.89
10	5.11	82.63
14	23.94	95.27
15	100.00	100.00
18	56.78	114.04
19	5.26	117.77
22	8.97	129.54
23	43.63	130.50
24	10.72	135.23
25	6.81	149.16

CROM 28 3-03-89		
N	AN	TN
1	6.67	29.06
3	4.79	39.40
7	19.24	67.09
10	8.00	83.32
14	26.37	95.55
15	100.00	100.00
18	51.49	113.66
19	4.82	117.13
22	11.50	128.38
23	33.56	129.36
24	9.32	133.80
25	4.28	147.89

N= Formula del ester acido graso/ AN=Area normalizada/ TN=tiempo normalizado

## Citrobacter freundii

ANALISIS	1	3	7	10	14	15	18	19	22	23	24	25
9 28/10/87	4.90	3.68	7.49	4.69	25.28	100.00	29.90	1.69	2.96	38.12	3.91	4.67
12 02/12/87	9.40	6.17	16.28	4.95	42.77	100.00	32.62	4.15	4.45	36.33	10.41	2.59
13 03/12/87	8.20	5.40	10.50	5.60	44.03	100.00	33.41	6.45	3.02	40.89	5.45	3.13
21 24/02/89	6.15	6.79	13.43	5.11	23.94	100.00	56.78	5.26	8.97	43.63	10.72	6.81
28 03/03/89	6.67	4.79	19.24	8.00	26.87	100.00	51.49	4.82	11.50	33.56	9.32	4.28
$\Sigma$	33.52	22.04	66.94	28.35	162.89	600.00	204.90	22.37	30.90	192.54	39.81	21.48
$X^{-}$	7.06	4.40	13.38	5.67	32.57	100.00	40.84	4.47	6.18	38.50	7.96	4.29
R	4.50	3.11	11.75	3.31	20.09	000.00	26.88	4.76	8.54	10.07	6.81	4.22
s	1.93	1.33	5.05	1.42	8.63	000.00	11.55	2.04	3.67	4.33	2.92	1.81
V	0.27	0.30	0.75	0.25	0.26	000.00	0.28	0.45	0.59	0.11	0.36	0.42
n;u.m. 2	3.49	1.78	25.50	2.02	74.59	000.00	133.54	4.18	13.47	18.74	8.56	3.29
n;u.m. 3	1.55	0.29	11.33	0.89	33.15	000.00	59.35	1.86	5.98	8.33	3.80	1.46
n;u.m. 4	0.87	0.16	6.37	0.50	18.64	000.00	33.38	1.04	3.36	4.68	2.14	0.82
n;u.m. 5	0.14	0.10	4.08	0.32	11.93	000.00	21.36	0.70	2.15	3.00	1.37	0.52

$\Sigma$  = Sumatoria

R = Rango

V = Varianza

u.m. = unidad de medición

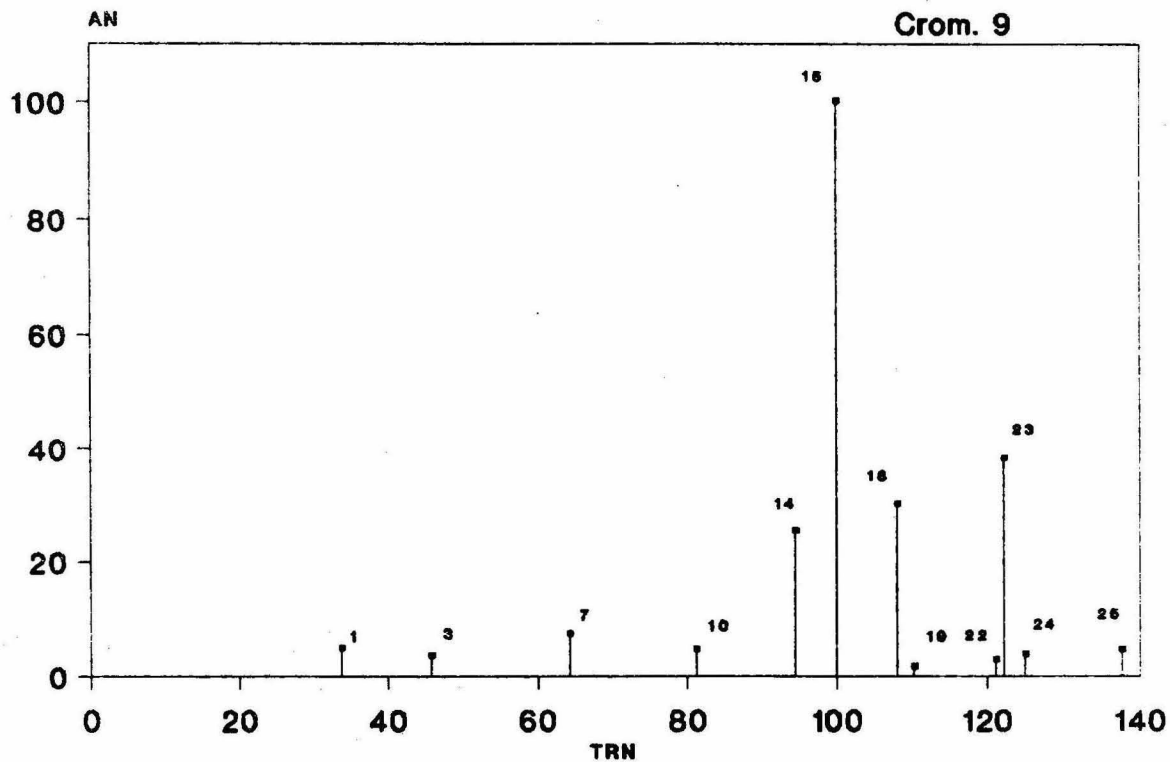
$X^{-}$  = Media

s = Desviación Estándar

n = número de repeticiones

# CROMATOGRAMA NORMALIZADO

Citrobacter freundii



TRN - TIEMPO DE RETENCION NORMALIZADO  
AN - AREA NORMALIZADA

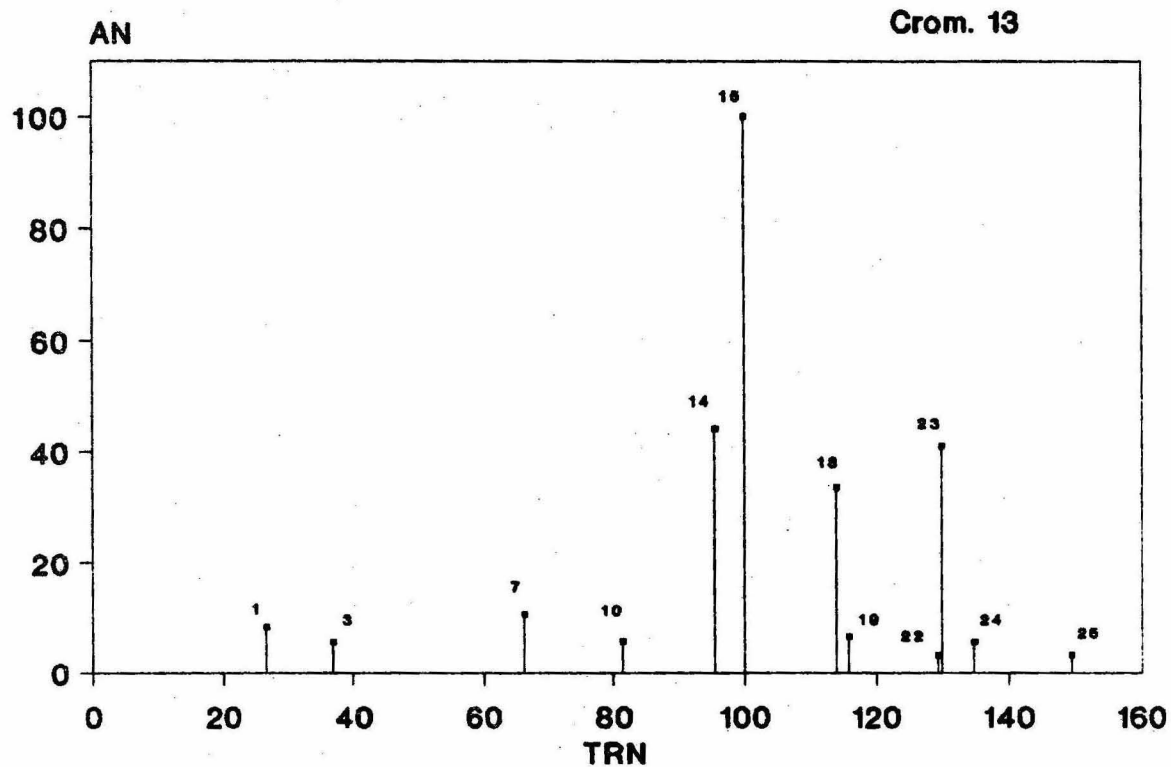
Oct. 28 1987

**Falta página**

**N° 55**

# CROMATOGRAMA NORMALIZADO

Oltrobacter freundli



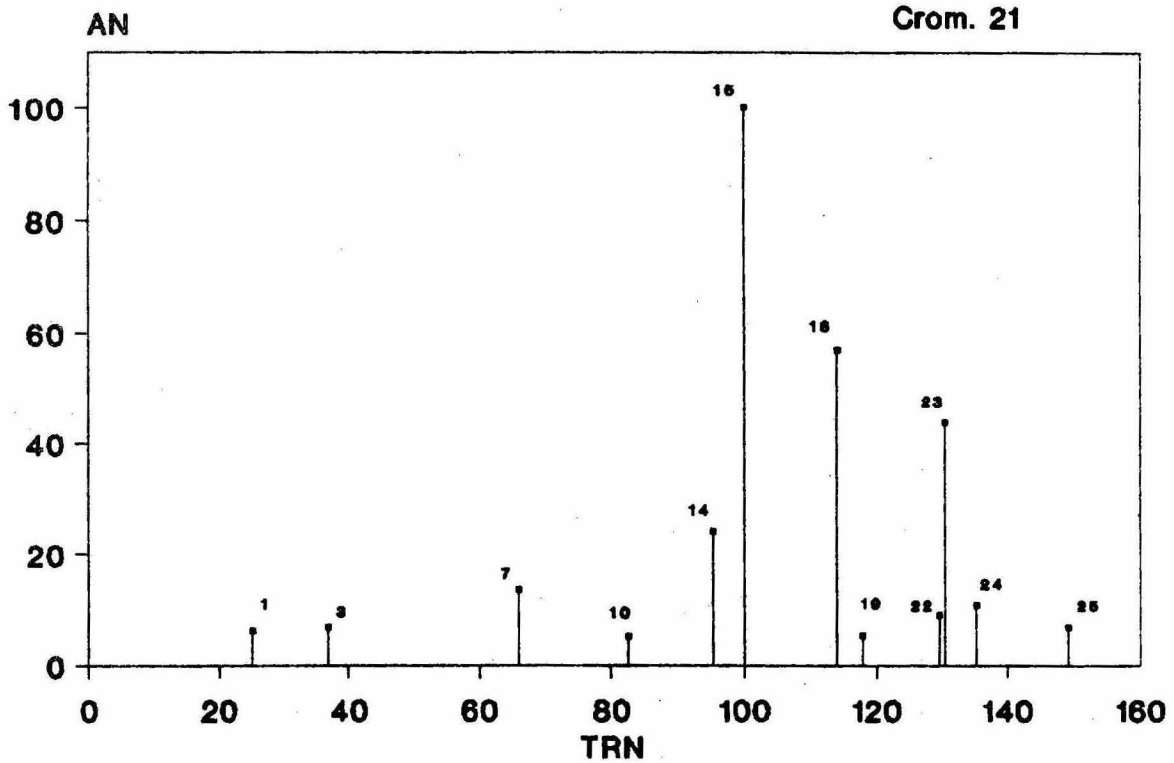
TRN - TIEMPO DE RETENCION NORMALIZADO  
AN - AREA NORMALIZADA

Dic. 3 1987



# CROMATOGRAMA NORMALIZADO

Citrobacter freundii



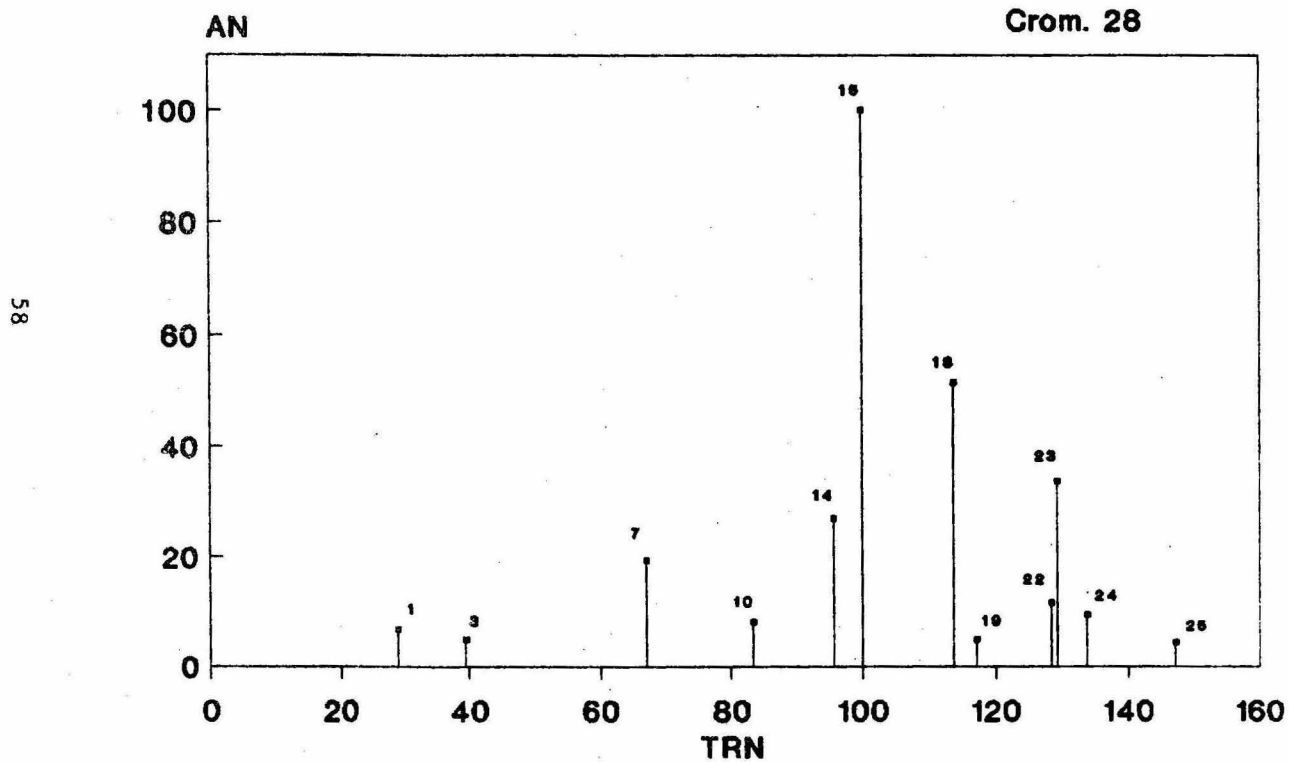
TRN - TIEMPO DE RETENCION NORMALIZADO  
AN - AREA NORMALIZADA

Feb. 24 1989

57

# CROMATOGRAMA NORMALIZADO

Citrobacter freundii



TRN - TIEMPO DE RETENCION NORMALIZADO  
AN - AREA NORMALIZADA

Marzo 3 1989

2.84

3.00  
3.10  
3.20

4.50

5.26

7.33

8.00

8.45

10.10

11.70

17.10

17.70

18.00

18.10

18.50

Enterobacter aerogenes

19.00

19.50

20.00

20.30

20.60

20.90

21.20

21.50

21.80

22.10

23.00

20.50

20.70

22.00

24.00

24.00

26.42

30.01

34.35 MIN

## Enterobacter aerogenes

CROM 5 3-02-89		
N	AN	TN
7	16.67	67.80
10	20.13	83.57
12	5.46	89.94
14	36.89	95.59
15	100.00	100.00
18	46.34	113.02
19	9.68	116.28
23	34.07	128.15
24	2.63	132.24

CROM 9 10-02-89		
N	AN	TN
7	19.49	64.85
10	19.41	81.69
12	9.19	87.88
14	34.80	94.71
15	100.00	100.00
18	47.81	114.80
19	9.91	117.33
23	38.07	138.59
24	6.01	134.99

CROM 22 24-02-89		
N	AN	TN
7	18.32	65.05
10	19.20	82.50
12	7.45	88.84
14	34.98	95.18
15	100.00	100.00
18	47.51	112.68
19	10.98	117.66
23	36.77	138.57
24	4.25	135.31

CROM 40 7-04-89		
N	AN	TN
7	24.26	66.84
10	8.88	83.12
12	9.49	89.15
14	46.83	95.44
15	100.00	100.00
18	40.91	113.61
19	9.98	116.96
23	61.04	129.28
24	9.81	133.69

CROM 43 2-12-87		
N	AN	TN
7	24.21	65.96
10	8.61	82.61
12	7.91	88.70
14	30.20	95.11
15	100.00	100.00
18	47.35	113.63
19	4.61	117.89
23	38.02	129.59
24	1.75	134.04

CROM 44 2-12-87		
N	AN	TN
7	22.57	65.81
10	9.29	82.45
12	7.18	88.48
14	28.77	95.03
15	100.00	100.00
18	47.13	113.55
19	4.78	116.94
23	34.28	129.44
24	4.35	133.89

N=Formula del ester del acido graso/ AN=Area normalizada/ TN=Tiempo normalizado

Enterobacter aerogenes

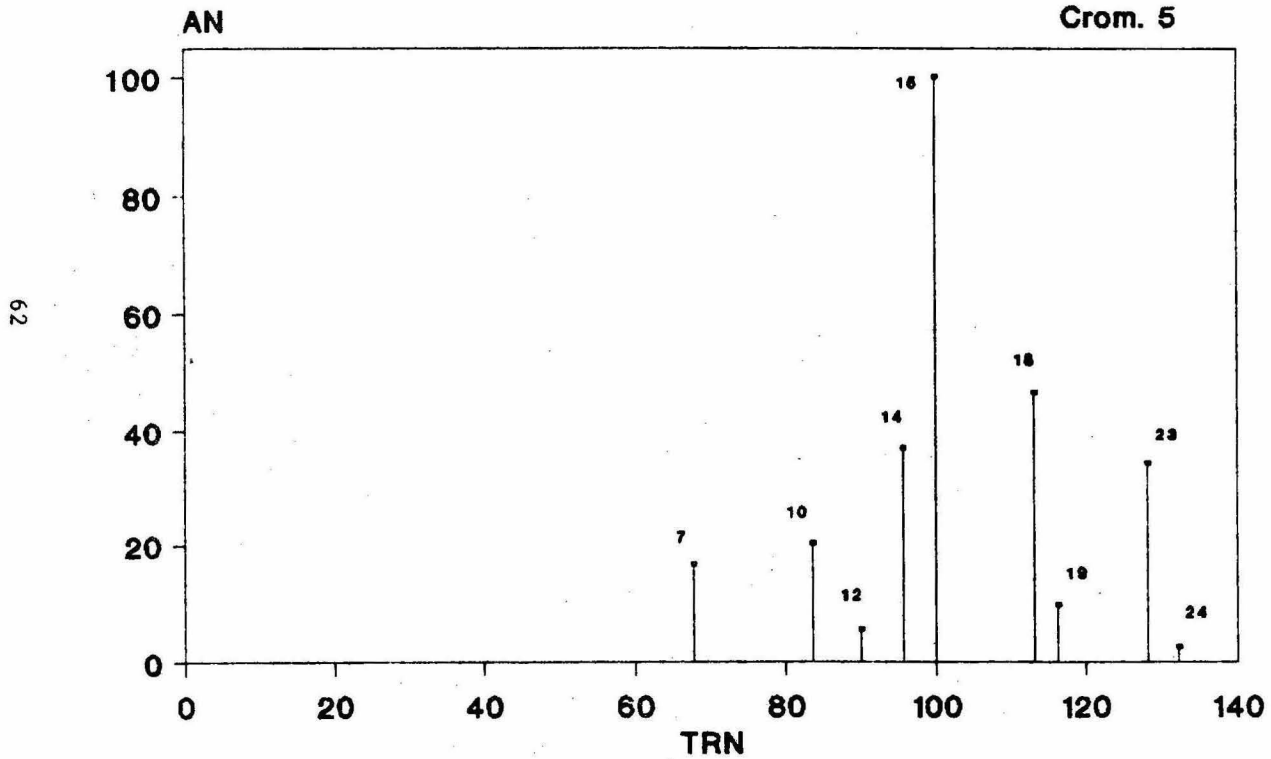
ANALISIS	7	10	12	14	15	18	19	23	24
5 03/02/89	16.67	20.13	5.46	36.89	100.00	46.34	9.68	34.07	2.63
9 10/02/89	19.49	19.42	9.19	34.80	100.00	47.81	9.91	38.07	6.01
22 24/02/89	18.32	19.20	7.45	34.98	100.00	47.51	10.98	36.77	4.25
40 07/04/89	24.26	8.88	9.49	46.03	100.00	40.91	9.98	61.04	9.01
43 02/12/87	24.21	8.61	7.91	30.20	100.00	47.35	4.61	32.02	1.75
44 02/12/87	22.57	9.29	7.18	28.77	100.00	47.13	4.78	34.28	4.35
$\Sigma$	125.52	85.52	46.68	211.67	600.00	277.05	49.94	242.25	28.00
$X^-$	20.92	14.25	7.78	35.27	100.00	46.17	8.32	40.37	4.60
R	7.59	11.52	4.03	17.26	000.00	6.90	6.37	26.97	7.26
s	2.99	4.54	1.59	6.81	000.00	2.72	2.51	10.64	2.86
V	0.14	0.31	0.20	0.19	000.00	0.05	0.30	0.26	0.62
n;u.m. 2	8.97	20.66	2.52	46.39	000.00	7.29	6.31	113.27	8.20
n;u.m. 3	3.98	9.18	1.12	20.61	000.00	3.24	2.80	50.34	3.64
n;u.m. 4	2.24	5.16	0.19	11.60	000.00	1.82	1.58	28.31	2.05
n;u.m. 5	1.43	3.30	0.12	7.42	000.00	1.16	1.01	18.12	1.31

$\Sigma$  = Sumatoria      R= Rango      V= Varianza      u.m.= unidad de medición

s= Desviación Estándar       $X^-$  = Media      n= número de repeticiones

# CROMATOGRAMA NORMALIZADO

Enterobacter aerogenes



TRN- TIEMPO DE RETENCION NORMALIZADO  
AN- AREA NORMALIZADA

Febrero 3 1989

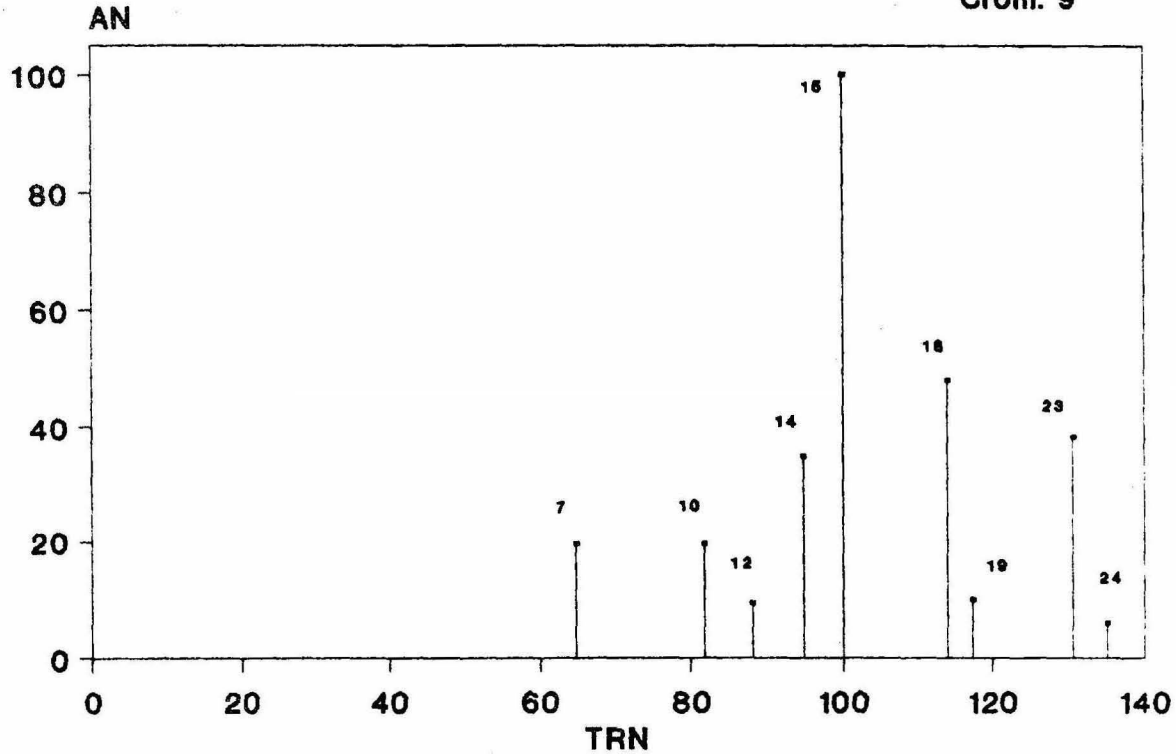
62

# CROMATOGRAMA NORMALIZADO

Enterobacter aerogenes

Crom. 9

63



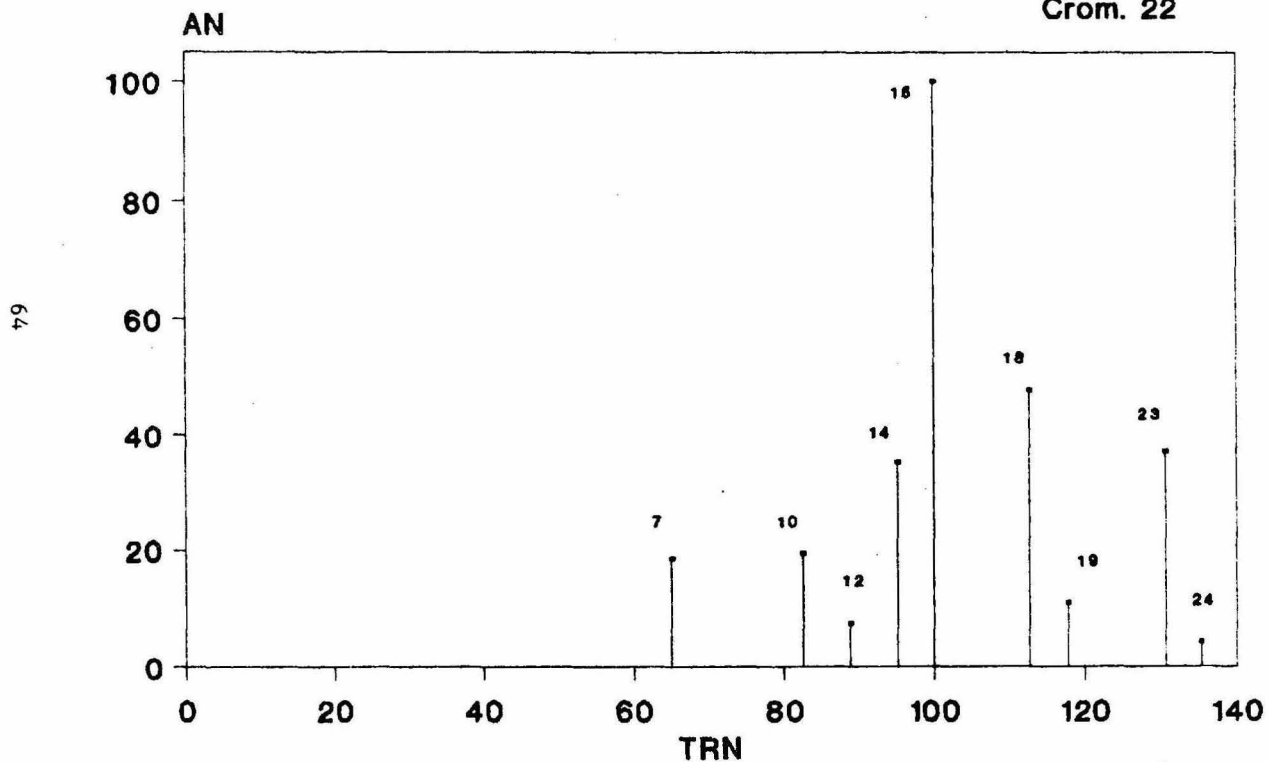
TRN- TIEMPO DE RETENCION NORMALIZADO  
AN- AREA NORMALIZADA

Febrero 10 1989

# CROMATOGRAMA NORMALIZADO

Enterobacter aerogenes

Crom. 22



TRN- TIEMPO DE RETENCION NORMALIZADO  
AN- AREA NORMALIZADA

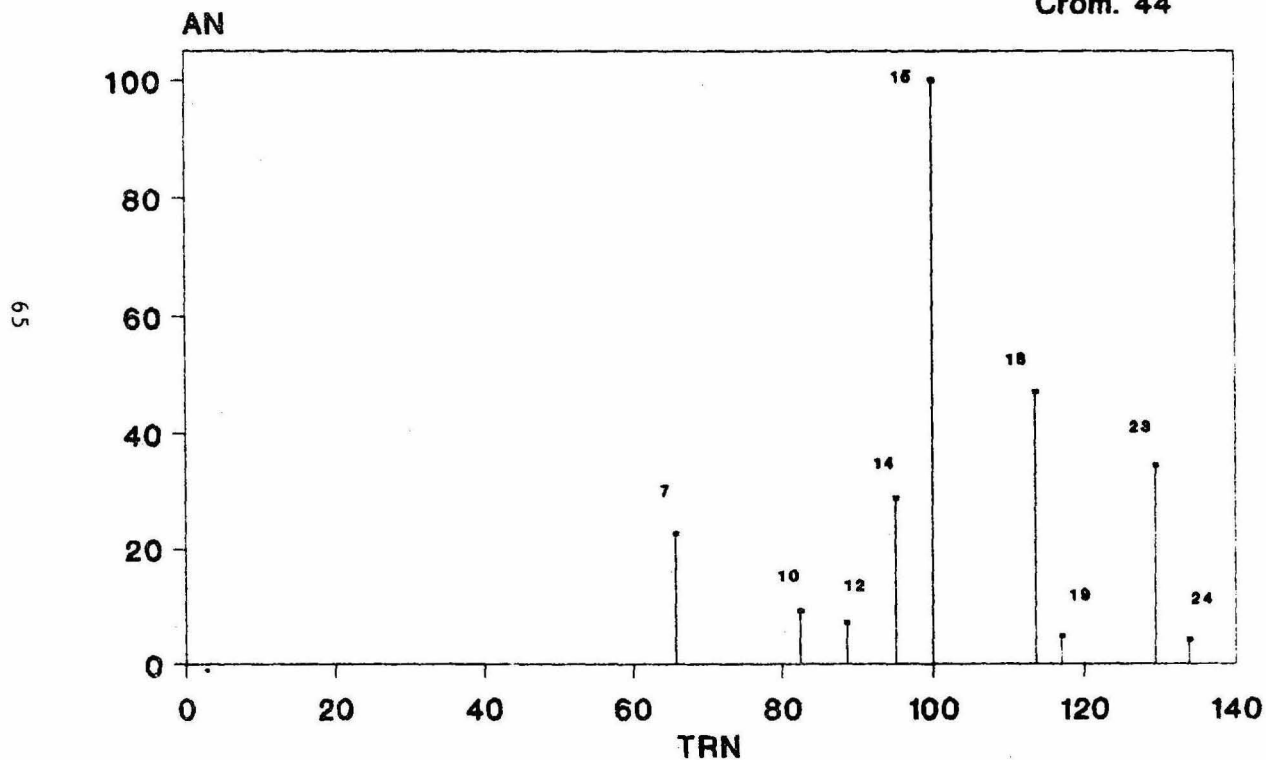
Febrero 24 1989



# CROMATOGRAMA NORMALIZADO

Enterobacter aerogenes

Crom. 44

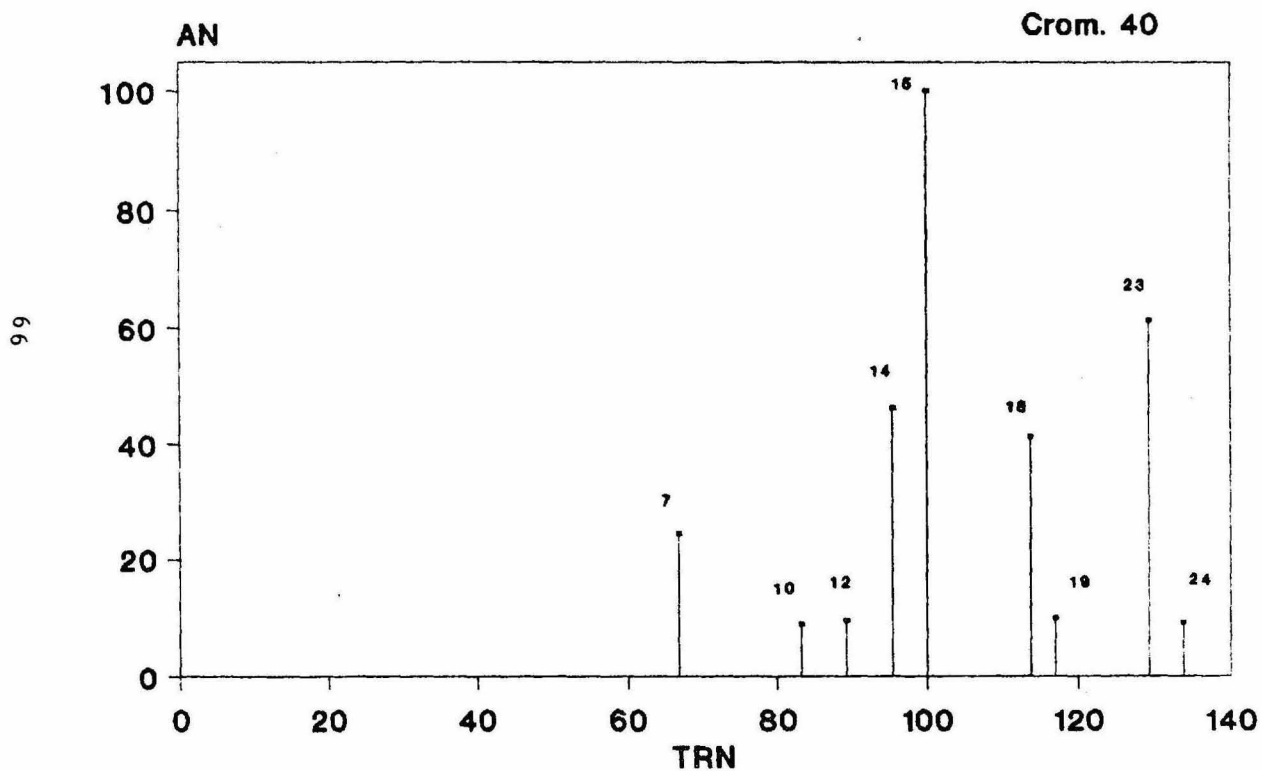


TRN- TIEMPO DE RETENCION NORMALIZADO  
AN- AREA NORMALIZADA

Diciembre 2 1987

# CROMATOGRAMA NORMALIZADO

Enterobacter aerogenes



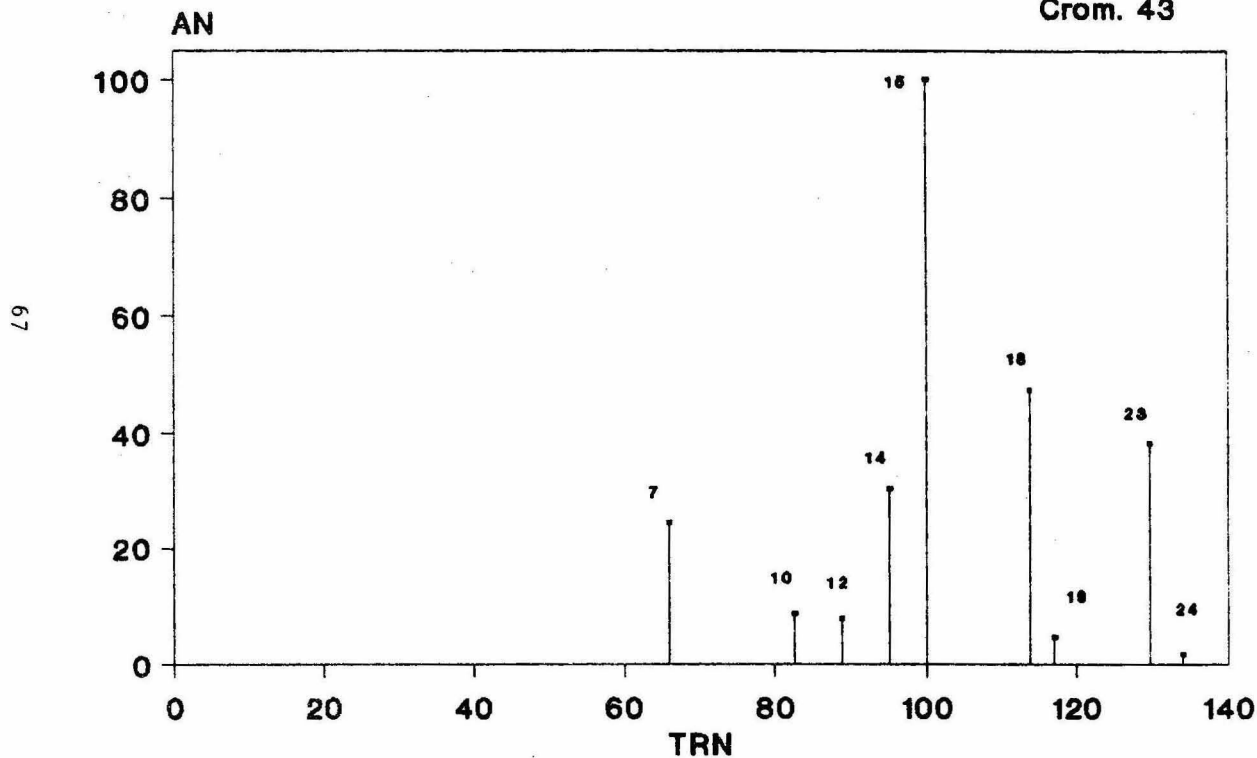
TRN- TIEMPO DE RETENCION NORMALIZADO  
AN- AREA NORMALIZADA

Abril 7 1989

# CROMATOGRAMA NORMALIZADO

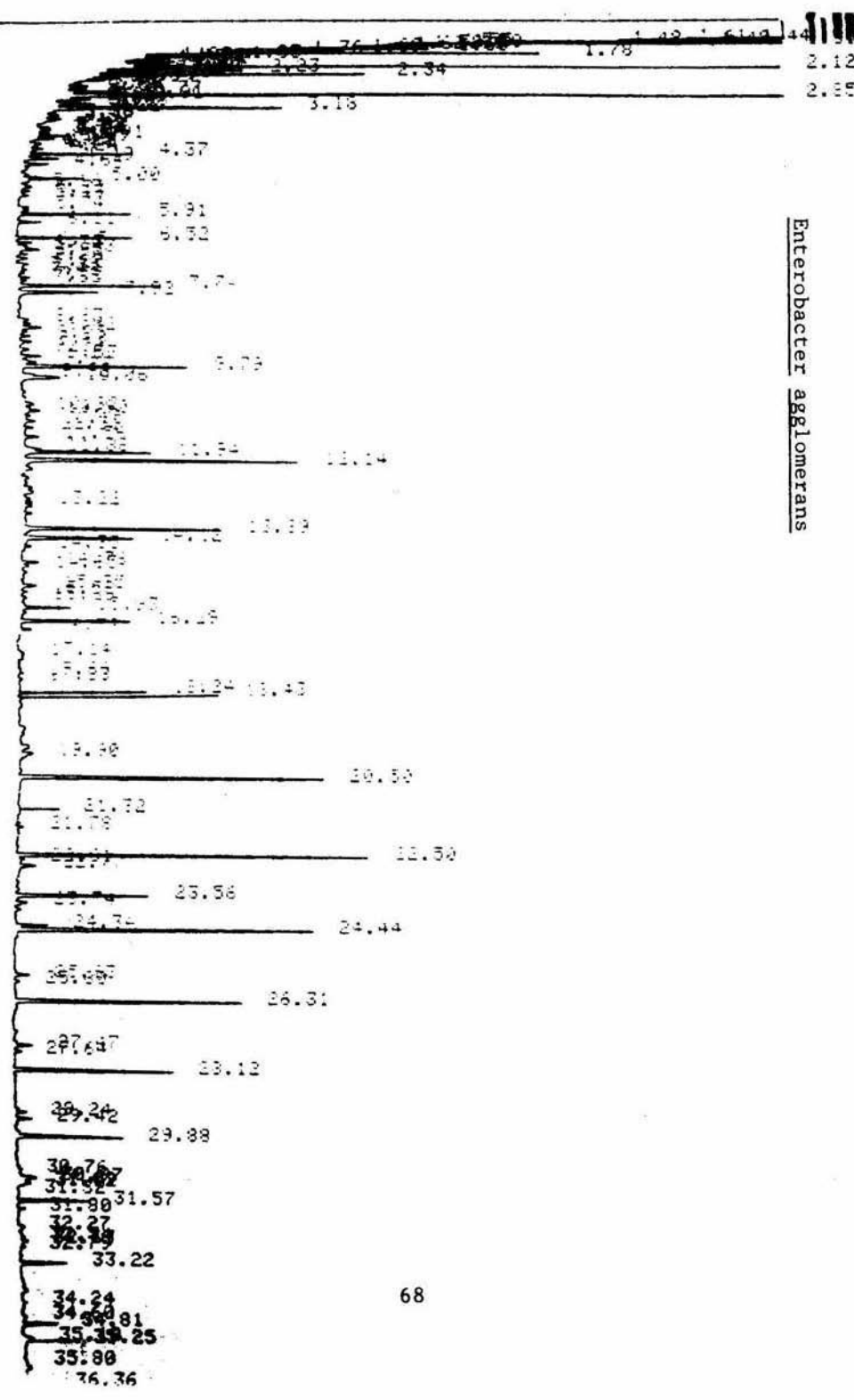
Enterobacter aerogenes

Crom. 43



TRN- TIEMPO DE RETENCION NORMALIZADO  
AN- AREA NORMALIZADA

Diciembre 2 1987



Enterobacter agglomerans

## Enterobacter agglomerans

CROM 27 11-11-87		
N	AN	TN
3	7.53	44.62
7	21.63	71.42
8	2.38	80.01
12	7.20	90.89
14	9.10	96.33
15	100.00	100.00
18	47.50	111.42
23	10.00	124.20
24	12.90	127.20
25	19.52	138.52

CROM 28 11-11-87		
N	AN	TN
3	5.14	44.56
7	18.25	71.42
8	2.33	80.59
12	6.10	90.84
14	9.30	96.39
15	100.00	100.00
18	60.60	111.48
23	11.77	124.20
24	5.56	127.57
25	23.96	138.52

CROM 32 17-03-89		
N	AN	TN
3	5.07	38.79
7	28.55	66.49
8	3.64	76.51
12	7.56	88.91
14	4.90	95.18
15	100.00	100.00
18	41.79	113.74
23	12.68	129.22
24	21.18	133.66
25	27.56	147.13

CROM 46 28-04-89		
N	AN	TN
3	11.21	37.06
7	29.29	65.24
8	3.85	75.62
12	1.23	88.47
14	1.60	94.65
15	100.00	100.00
18	68.10	114.42
23	16.71	131.30
24	1.32	136.00
25	52.22	150.25

CROM 47 28-04-89		
N	AN	TN
3	9.01	38.22
7	31.45	65.24
8	3.49	75.62
12	1.21	88.78
14	6.08	95.22
15	100.00	100.00
18	71.13	114.42
23	17.48	131.22
24	4.21	136.00
25	50.58	150.25

N= Fórmula del ester ácido graso/ AN=Área normalizada/ TN=Tiempo normalizado

Enterobacter agglomerans

ANALISIS	3	7	8	12	14	15	18	23	24	25
27 11/11/87	7.53	21.63	2.88	7.20	9.10	100.00	47.50	10.00	12.90	19.52
28 11/11/87	5.14	18.25	2.38	6.10	9.30	100.00	60.60	11.77	5.56	23.96
32 17/03/89	5.07	28.55	3.64	7.56	4.90	100.00	41.79	12.68	21.18	27.56
46 28/04/89	11.21	29.29	3.85	1.23	1.60	100.00	68.10	16.71	1.32	52.22
47 28/04/89	9.01	31.45	3.49	1.21	6.08	100.00	71.13	17.48	4.21	50.58
$\Sigma$	37.96	129.17	15.74	23.30	30.98	600.00	289.12	68.64	45.17	137.84
$X^{-}$	7.59	25.83	3.14	4.66	6.19	100.00	57.82	13.72	9.03	34.76
R	6.14	13.20	1.47	6.35	7.70	000.00	29.34	7.48	19.86	32.70
s	2.64	5.67	0.63	2.73	3.31	000.00	12.61	3.21	8.53	14.05
V	0.34	0.21	0.20	0.58	0.53	000.00	0.21	0.23	0.94	0.40
n;u.m. 2	7.00	32.00	0.40	7.00	11.00	000.00	159.00	10.00	73.00	198.00
n;u.m. 3	3.00	14.00	0.20	3.00	5.00	000.00	71.00	5.00	32.00	88.00
n;u.m. 4	2.00	8.00	0.10	2.00	3.00	000.00	49.00	3.00	18.00	49.00
n;u.m. 5	1.00	5.00	0.06	1.00	2.00	000.00	25.00	2.00	12.00	32.00

$\Sigma$  = Sumatoria      R = Rango      V = Varianza       $X^{-}$  = Media

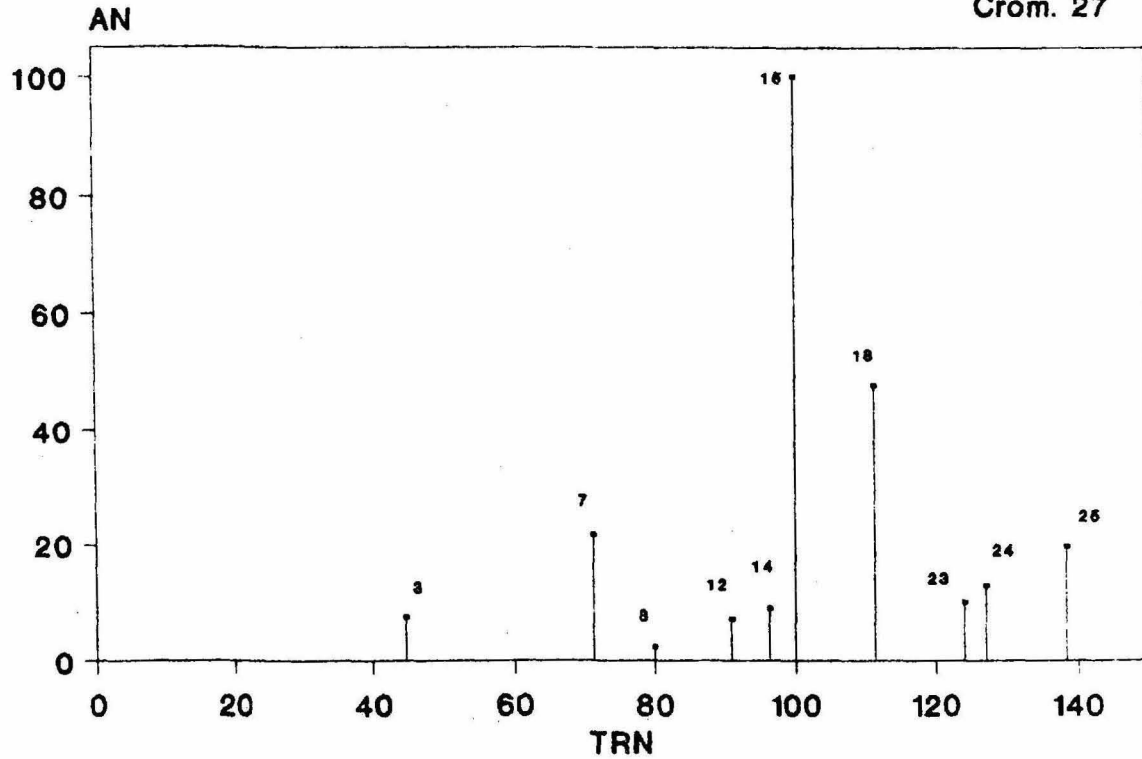
s = Desviación Estándar      n = número de repeticiones

u.m. = unidad de medición

# CROMATOGRAMA NORMALIZADO

Enterobacter agglomerans

Crom. 27



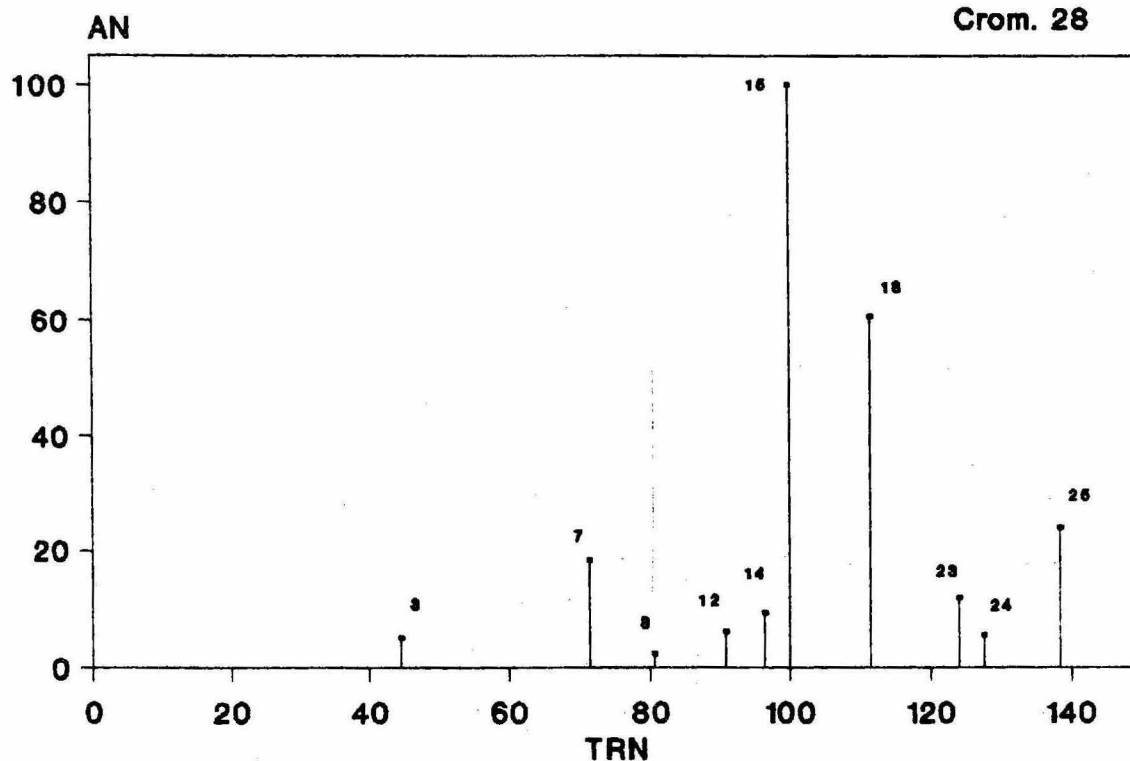
71

TRN- TIEMPO DE RETENCION NORMALIZADO  
AN- AREA NORMALIZADA

Nov. 11 1987

# CROMATOGRAMA NORMALIZADO

Enterobacter agglomerans



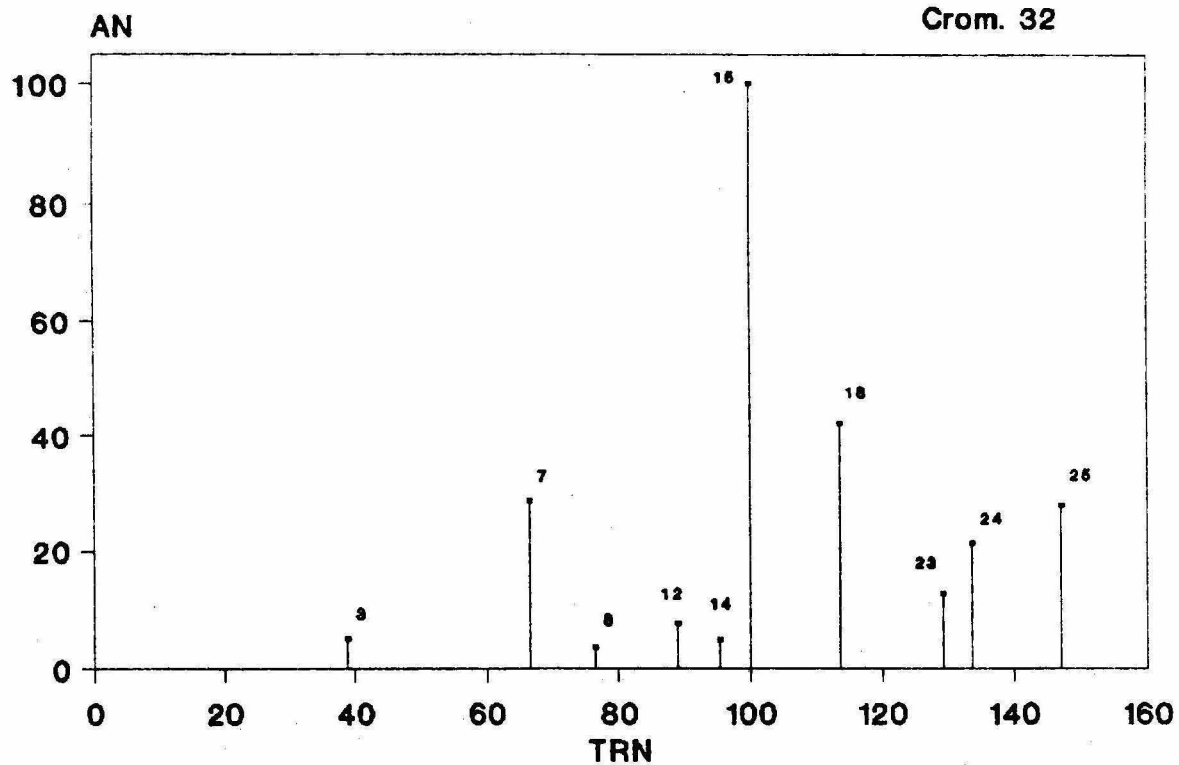
TRN- TIEMPO DE RETENCION NORMALIZADO  
AN- AREA NORMALIZADA

Nov.11 1987



# CROMATOGRAMA NORMALIZADO

Enterobacter agglomerans



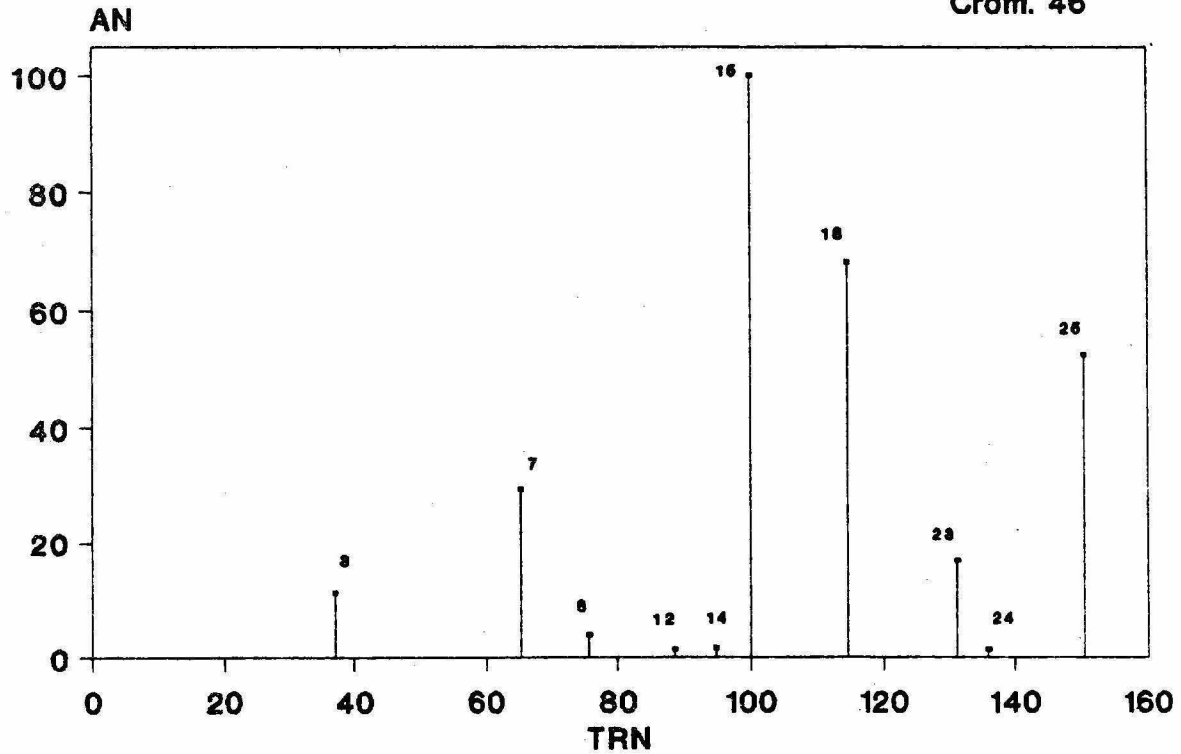
TRN - TIEMPO DE RETENCION NORMALIZADO  
AN - AREA NORMALIZADA

Marzo 17 1989

# CROMATOGRAMA NORMALIZADO

Enterobacter agglomerans

Crom. 46



74

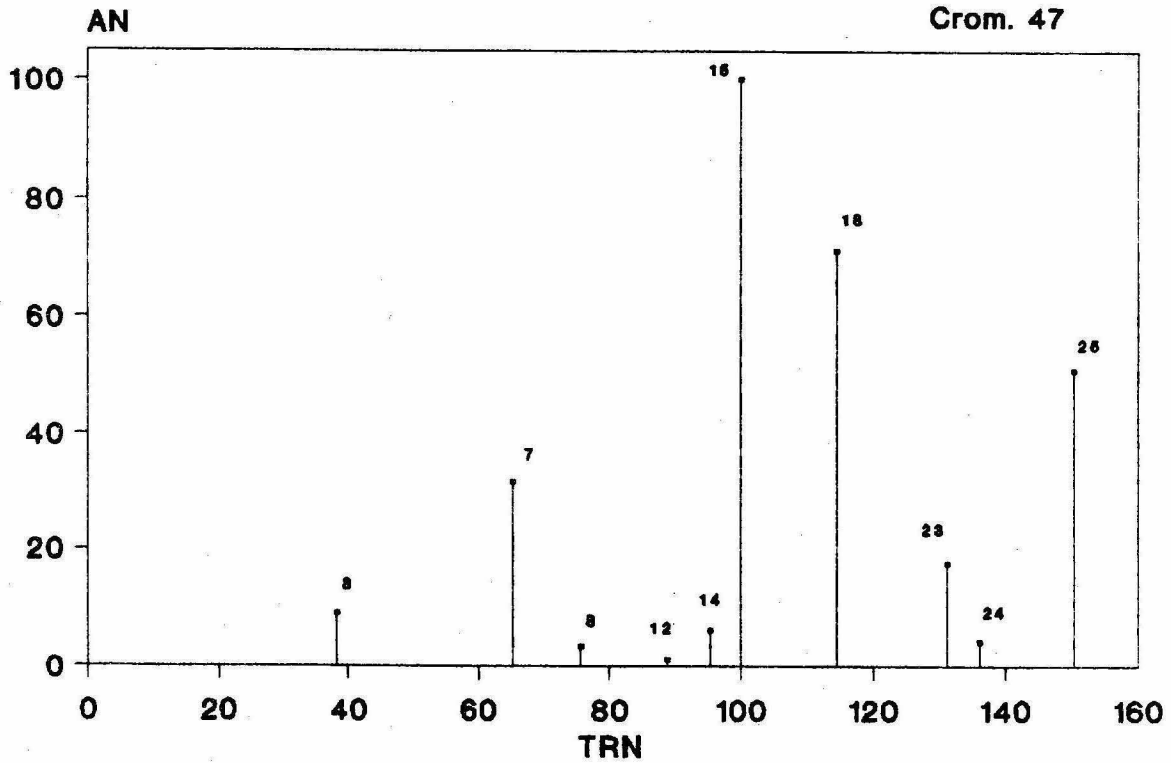
TRN- TIEMPO DE RETENCION NORMALIZADO  
AN- AREA NORMALIZADA

Abril 28 1989

# CROMATOGRAMA NORMALIZADO

Enterobacter agglomerans

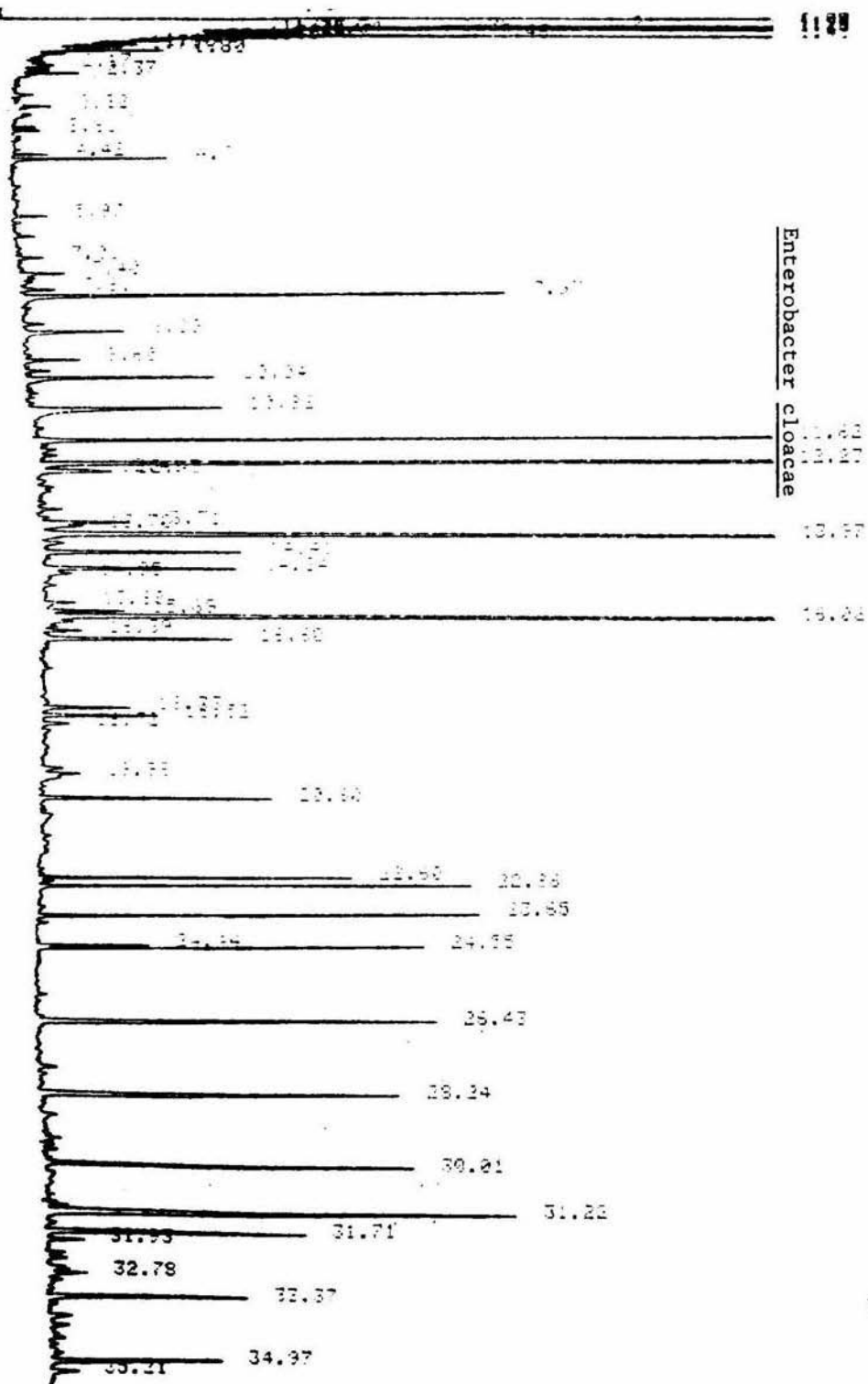
75



Crom. 47

TRN- TIEMPO DE RETENCION NORMALIZADO  
AN- AREA NORMALIZADA

Abril 28 1989



## Enterobacter cloacae

CROM 23 25-11-87		
N	AN	TN
3	2.76	43.4
7	9.54	70.4
10	2.0	84.6
14	30.88	95.8
15	100.00	100.00
18	51.49	111.4
19	1.68	113.6
22	4.25	123.2
24	4.7	127.4

CROM 24 25-11-87		
N	AN	TN
3	2.47	43.53
7	8.13	70.61
10	2.11	85.12
14	38.64	96.05
15	100.00	100.00
18	43.61	111.46
19	1.36	113.46
22	2.95	123.00
24	4.17	127.8

CROM 25 25-11-87		
N	AN	TN
3	2.99	43.3
7	8.63	70.3
10	2.23	84.8
14	33.08	95.8
15	100.00	100.00
18	48.5	111.4
19	1.6	113.7
22	5.70	133.2
24	6.56	127.6

CROM 45 28-04-89		
N	AN	TN
3	1.28	37.0
7	19.48	65.38
10	2.8	83.4
14	40.28	95.2
15	100.00	100.00
18	26.33	114.5
19	4.39	118.2
22	2.9	130.0
24	11.06	136.11

CROM 20 24-02-89		
N	AN	TN
3	2.29	37.6
7	9.67	65.7
10	4.0	82.59
14	27.29	95.16
15	100.00	100.00
18	52.4	114.11
19	5.5	117.7
22	6.58	129.5
24	8.35	135.2

CROM 44 28-04-89		
N	AN	TN
3	1.3	37.2
7	18.4	65.38
10	3.1	83.2
14	41.1	95.3
15	100.00	100.00
18	27.44	114.5
19	5.0	117.7
22	2.3	129.0
24	13.5	136.11

N= Formula del ester acido graso/ AN=Area normalizada/ TN=Tiempo normalizado

## Enterobacter cloacae

CROM 7 10-02-89		
N	AN	TN
3	3.04	37.04
7	12.73	65.17
10	5.25	87.09
14	32.86	95.01
15	100.00	100.00
18	50.50	114.23
19	5.79	117.8
22	2.48	129.9
24	5.64	135.7

CROM 8 10-02-89		
N	AN	TN
3	1.33	37.20
7	12.89	65.36
10	6.11	82.39
14	35.89	95.17
15	100.00	100.00
18	45.21	114.33
19	5.04	118.10
22	6.73	130.14
24	7.47	136.04

N=Formula del ester acido graso/ AN=Area normalizada/ TN=Tiempo normalizado

Enterobacter cloacae

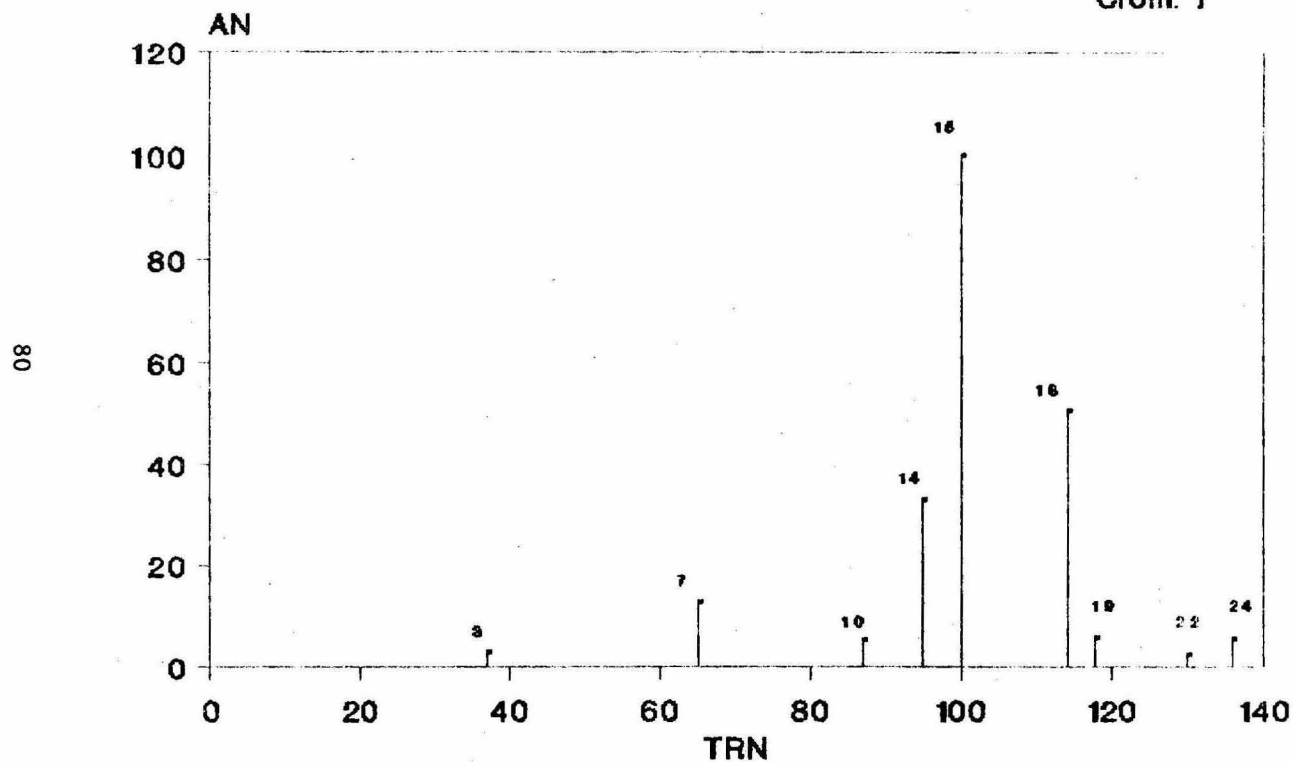
ANALISIS	3	7	10	14	15	18	19	22	24
7 10/02/89	3.03	12.73	5.25	32.86	100.00	50.50	5.79	2.48	5.64
8 10/02/89	1.33	12.89	6.11	35.89	100.00	45.21	5.04	6.73	7.47
20 24/02/89	2.29	9.67	4.00	27.29	100.00	52.40	5.50	6.58	8.35
23 25/11/87	2.76	9.54	2.00	30.88	100.00	51.49	1.68	4.25	4.70
24 25/11/87	2.47	8.13	2.11	38.64	100.00	43.61	1.36	2.95	4.17
25 25/11/87	2.99	8.63	2.23	33.08	100.00	48.50	1.60	5.70	6.56
44 28/04/89	1.30	18.40	3.10	41.10	100.00	27.44	5.00	2.30	13.50
45 28/04/89	1.28	19.48	2.80	40.28	100.00	26.33	4.39	2.90	11.06
$\Sigma$	17.46	99.47	27.60	280.02	800.00	345.48	30.36	33.89	61.45
$X^-$	2.18	12.43	3.45	35.00	100.00	43.18	3.79	4.23	7.68
R	1.76	11.35	4.11	10.22	000.00	26.07	4.43	4.43	9.33
s	0.70	4.56	1.65	4.10	000.00	10.48	1.78	1.78	3.75
V	0.32	0.36	0.47	0.11	000.00	0.24	0.46	0.46	0.48
n;u.m. 2	0.49	20.79	2.72	16.81	000.00	109.83	3.16	3.16	14.06
n;u.m. 3	0.21	9.24	1.21	7.47	000.00	48.81	1.40	1.40	6.25
n;u.m. 4	0.12	5.19	0.68	4.20	000.00	27.45	0.79	0.79	3.51
n;u.m. 5	0.07	3.32	0.43	2.68	000.00	17.57	0.50	0.50	2.25

$\Sigma$  = Sumatoria    R= Rango    V= Varianza    s= Desviación Estándar  
 $X^-$  = Media    n= número de repeticiones    u.m.= unidad de medición

# Cromatograma Normalizado

Enterobacter cloacae

Crom. 7



TRN - TIEMPO DE RETENCION NORMALIZADO  
AN - AREA NORMALIZADA

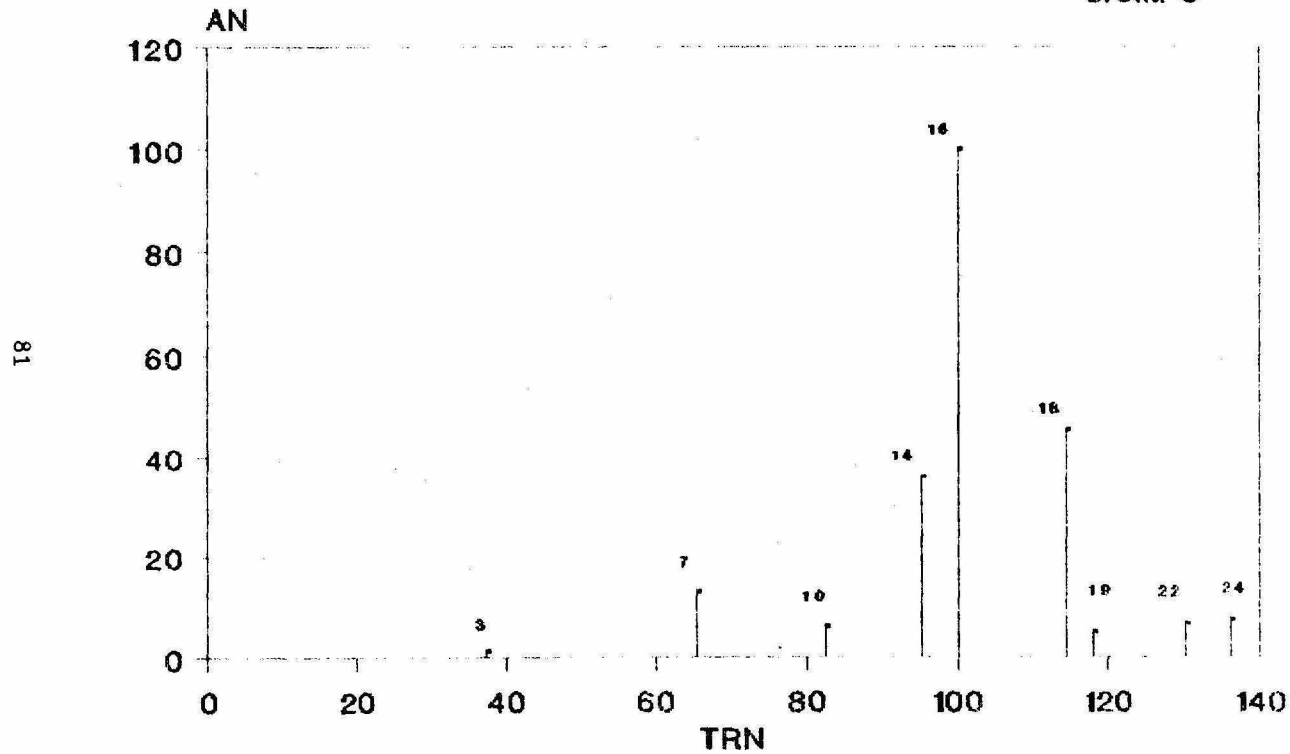
Febrero 10 1989



# Cromatograma Normalizado

Enterobacter cloacae

Crom. 8



TRN - TIEMPO DE RETENCION NORMALIZADO  
AN - AREA NORMALIZADA

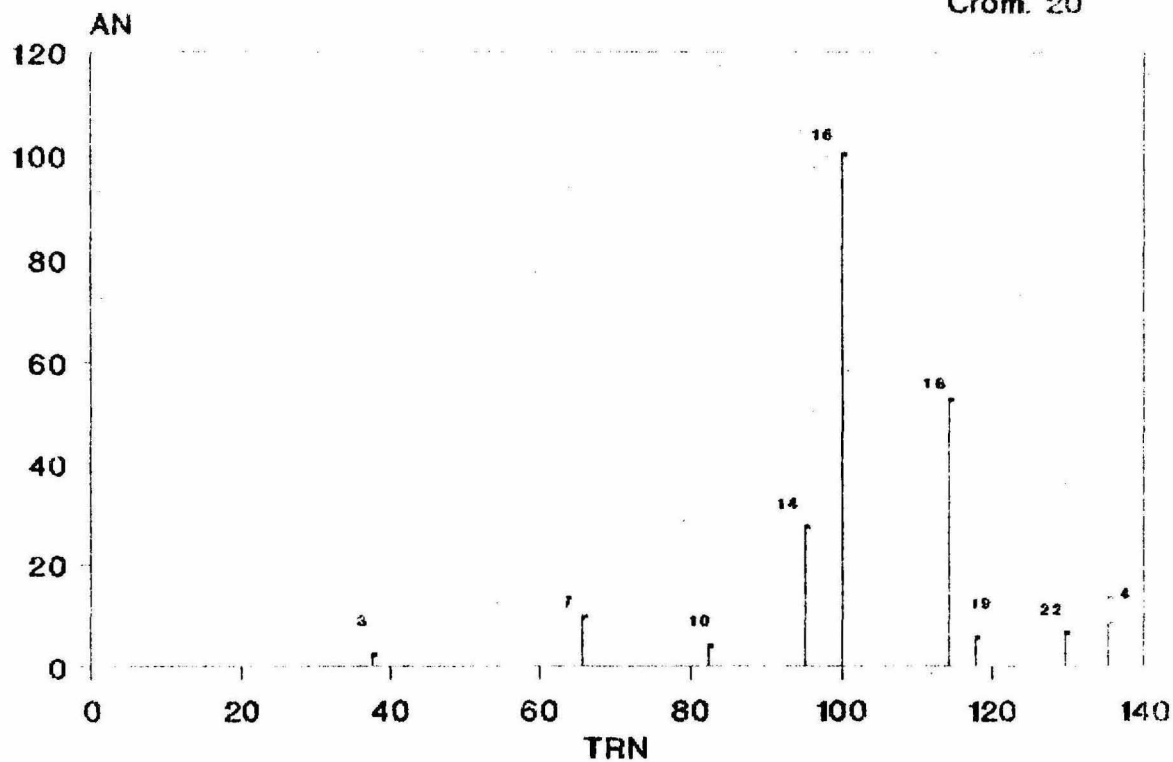
Febrero 10 1989

# Cromatograma Normalizado

*L. nterobacter cloacae*

Crom. 20

82



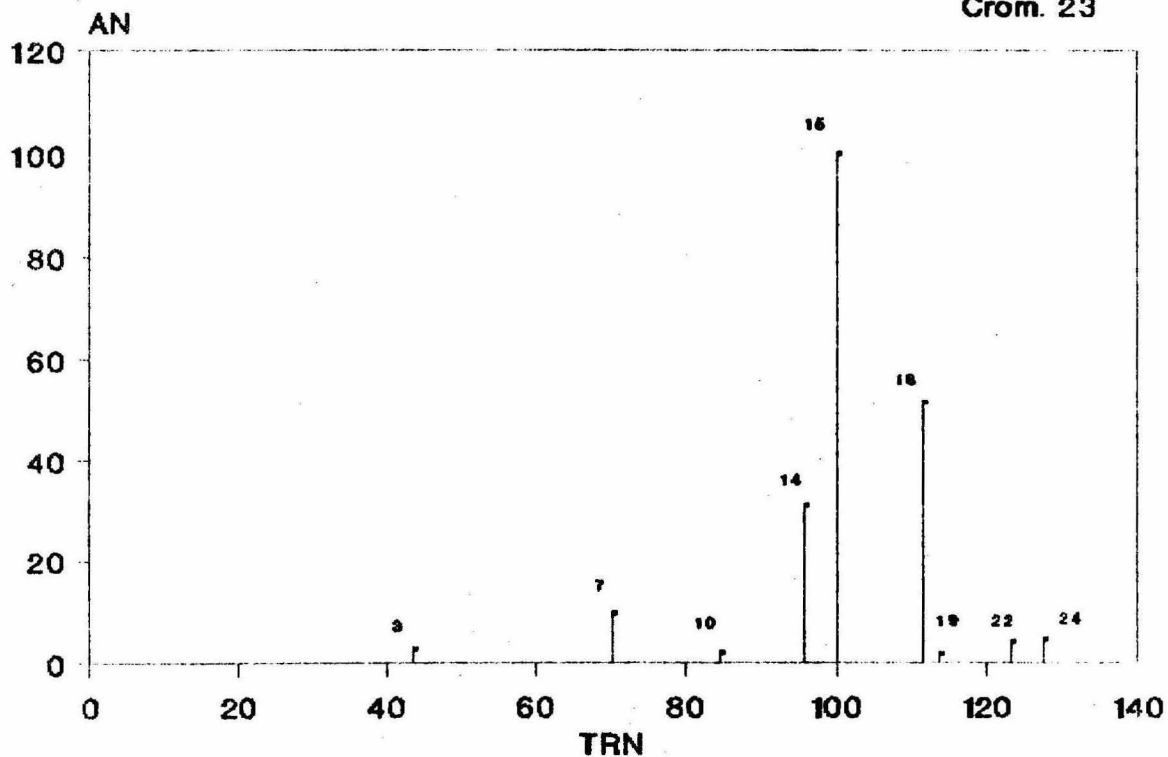
TRN - TIEMPO DE RETENCION NORMALIZADO  
AN - AREA NORMALIZADA

Febrero 24 1988

# Cromatograma Normalizado

Enterobacter cloacae

Crom. 23



TRN - TIEMPO DE RETENCION NORMALIZADO  
AN - AREA NORMALIZADA

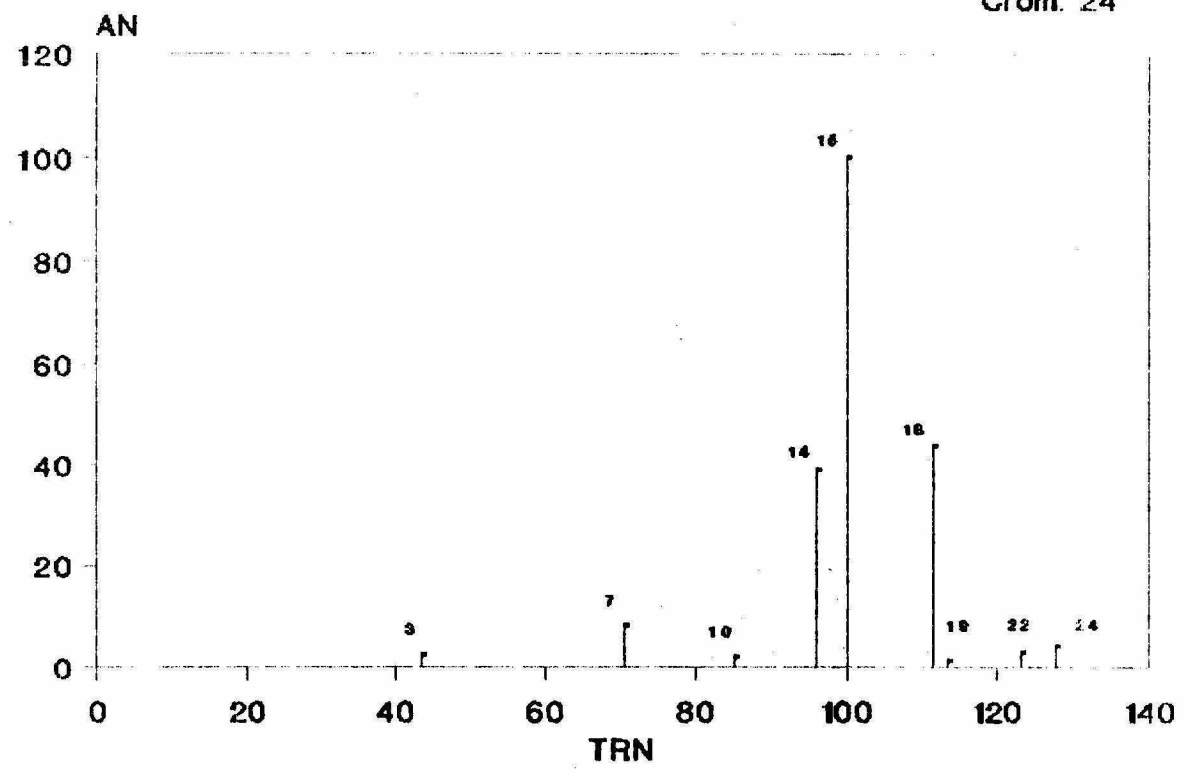
Nov. 25 1987

# Cromatograma Normalizado

Enterobacter cloacae

Crom. 24

84



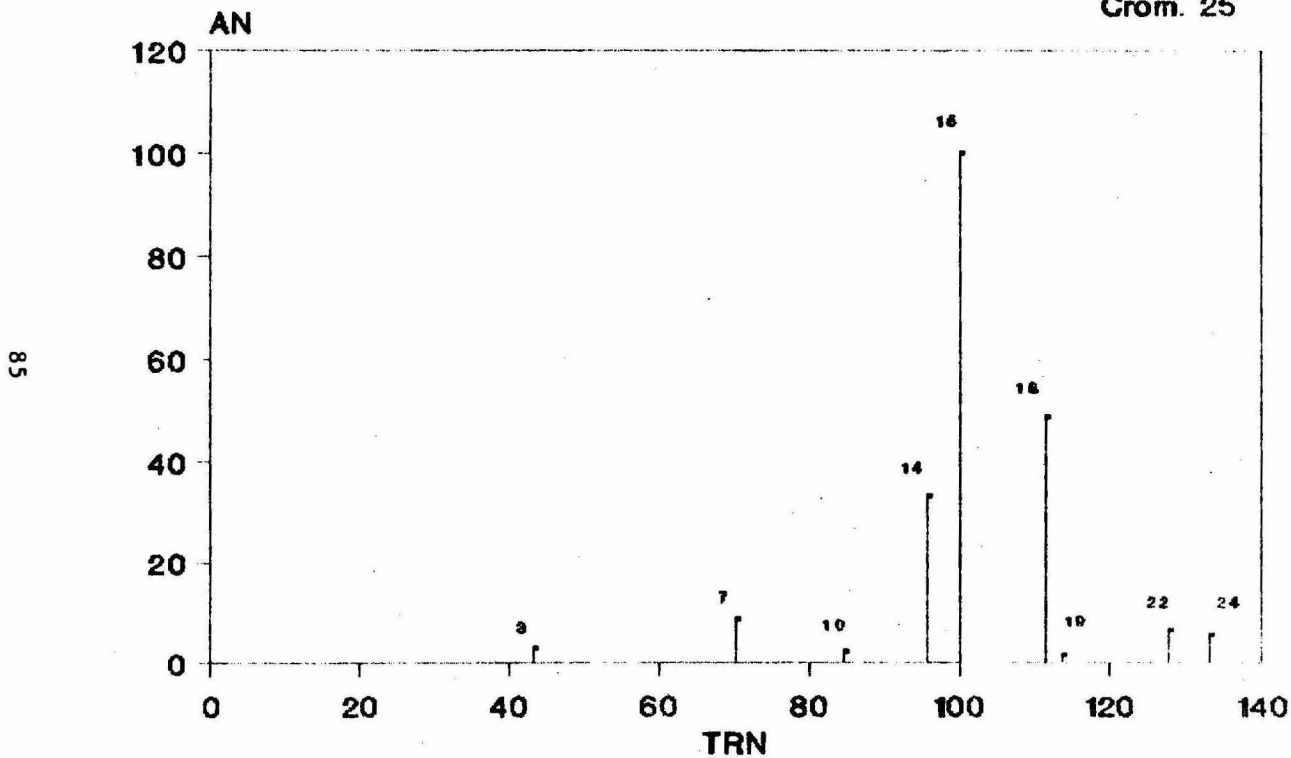
TRN - TIEMPO DE RETENCIÓN NORMALIZADO  
AN - AREA NORMALIZADA

Nov. 25 1987

# Cromatograma Normalizado

Enterobacter cloacae

Crom. 25



TRN - TIEMPO DE RETENCION NORMALIZADO  
AN - AREA NORMALIZADA

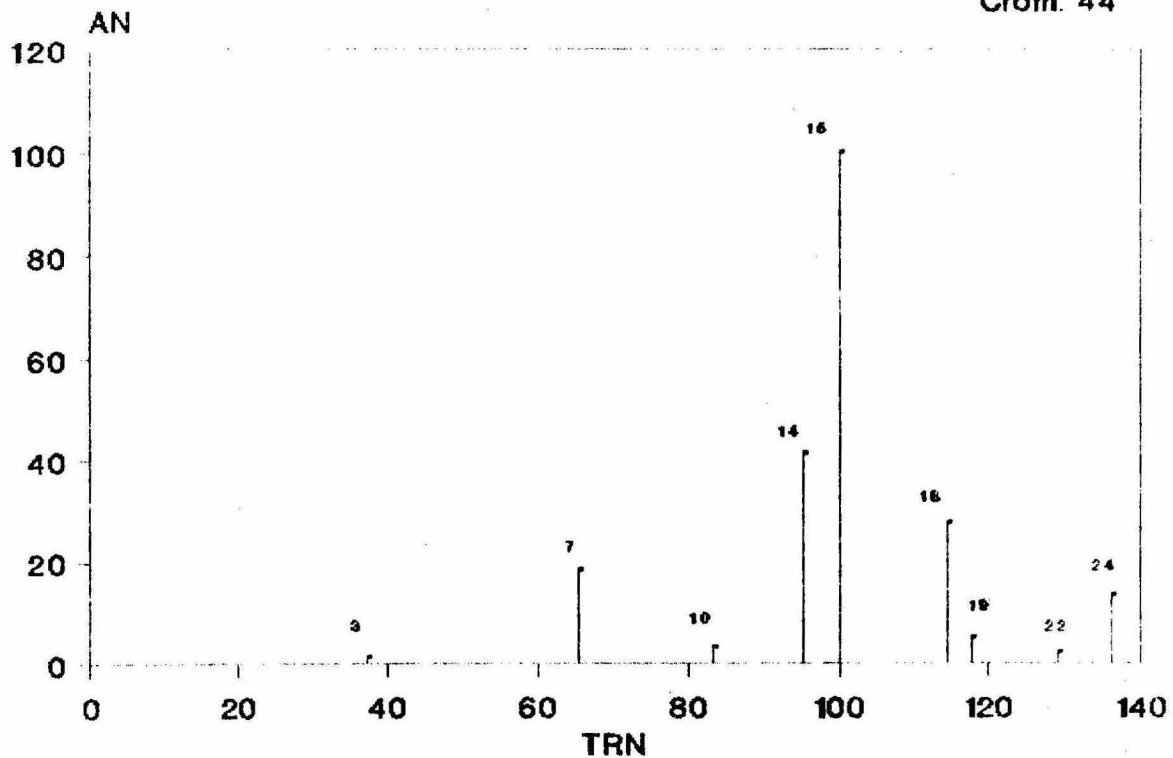
Nov. 26 1987

# Cromatograma Normalizado

Enterobacter cloacae

Crom. 44

98



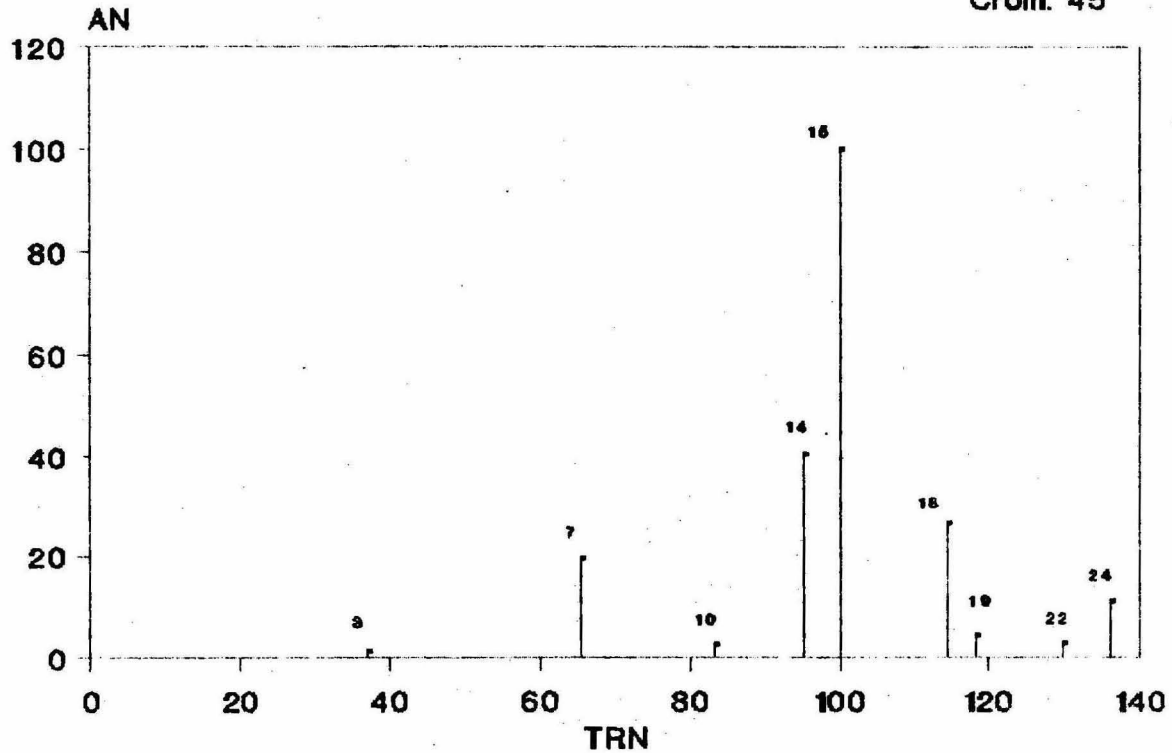
TRN - TIEMPO DE RETENCION NORMALIZADO  
AN - AREA NORMALIZADA

Abril 28 1989

# Cromatograma Normalizado

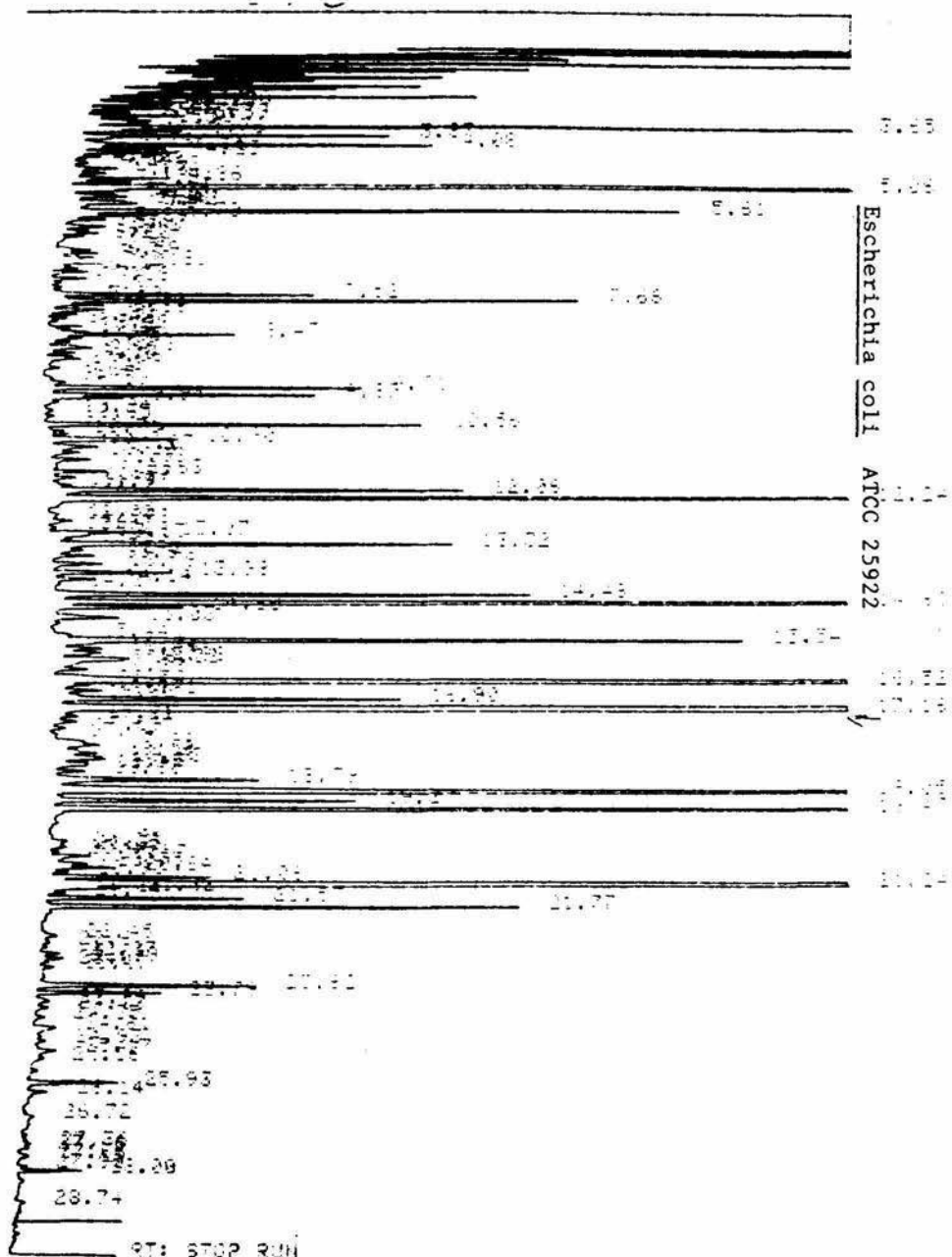
Enterobacter cloacae

Crom. 45



TRN - TIEMPO DE RETENCION NORMALIZADO  
AN - AREA NORMALIZADA

Abril 28 1989



DATA 0880F MANUAL INJECTION 9 15:06 0071-470987  
AREA % COMPENSATED ANALYSIS

RT	AREA	TYPE	AREA %
3.09	9.22	OV	3.105
5.10	5.34	VP	1.851
7.17	11.55	VP	4.132
9.22	2.77	OV	1.001



## Escherichia coli

CROM 1 14-10-87		
N	AN	TN
1	8.81	33.22
3	4.85	44.64
7	18.07	71.83
10	28.33	85.35
12	9.00	90.5
14	53.48	96.27
15	100.00	100.00
18	23.8	111.00
19	15.5	113.46
22	2.18	122.73
23	50.05	123.78
24	5.45	126.86

CROM 2 14-10-87		
N	AN	TN
1	1.25	33.12
3	6.92	44.57
7	21.68	71.24
10	34.00	85.50
12	11.08	90.40
14	59.25	96.22
15	100.00	100.00
18	24.7	110.87
19	15.8	113.30
22	2.79	122.43
23	52.90	123.65
24	4.55	126.55

CROM 5 25-11-87		
N	AN	TN
1	5.43	32.14
3	5.09	43.56
7	16.48	70.60
10	22.59	85.18
12	17.17	90.34
14	61.94	96.15
15	100.00	100.00
18	14.82	111.42
19	17.39	114.03
22	9.63	123.69
23	53.74	124.60
24	9.43	127.95

CROM 6 25-11-87		
N	AN	TN
1	2.78	32.14
3	4.67	43.56
7	14.23	70.60
10	22.07	85.18
12	13.27	90.34
14	62.47	96.11
15	100.00	100.00
18	17.07	111.42
19	18.13	114.03
22	4.43	123.63
23	56.21	124.67
24	6.74	127.95

CROM 7 25-11-87		
N	AN	TN
1	2.67	32.08
3	6.39	43.46
7	16.51	70.46
10	27.88	85.05
12	11.03	90.07
14	68.49	96.07
15	100.00	100.00
18	15.67	111.08
19	17.37	113.74
22	4.38	123.31
23	59.39	124.46
24	5.65	127.54

CROM 8 25-11-87		
N	AN	TN
1	3.75	32.14
3	5.06	43.56
7	15.22	70.60
10	21.35	85.18
12	16.62	90.34
14	62.65	96.17
15	100.00	100.00
18	15.79	111.42
19	16.52	114.03
22	9.40	123.69
23	51.54	124.61
24	9.07	127.95

N= Fórmula del ester ácido graso/ AN=Área normalizada/ TN=Tiempo normalizado

Escherichia coli ATCC 25922

ANALISIS	1	3	7	10	12	14	15	18	19	22	23	24
1 14/10/87	0.81	4.85	18.07	28.33	9.00	53.40	100.00	23.80	15.50	2.18	50.05	5.45
2 14/10/87	1.25	6.92	21.68	34.00	11.00	59.25	100.00	24.70	15.80	2.79	52.90	4.55
5 25/11/87	5.43	5.09	16.48	22.59	17.17	61.94	100.00	14.82	17.39	9.63	53.74	9.43
6 25/11/87	2.78	4.67	14.23	22.07	13.27	62.47	100.00	17.07	18.13	4.43	56.21	6.74
7 25/11/87	2.67	6.39	16.51	27.88	11.03	68.49	100.00	15.67	17.37	4.38	59.39	5.65
8 25/11/87	3.75	5.06	15.22	21.35	16.62	62.65	100.00	15.79	16.52	9.40	51.54	9.07
$\Sigma$	16.69	32.98	102.19	156.22	78.17	368.20	600.00	111.85	100.71	32.81	323.80	40.89
$X^{-}$	2.78	5.49	17.03	26.03	13.02	61.36	100.00	18.64	16.78	5.46	53.96	6.81
R	2.94	2.25	7.45	12.65	8.17	15.09	000.00	9.88	2.63	7.45	9.34	4.88
s	1.16	0.88	2.94	4.99	3.22	5.95	000.00	3.89	1.03	2.94	3.68	1.92
V	0.41	0.16	0.17	0.19	0.24	0.09	000.00	0.20	0.06	0.53	0.06	0.28
n;u.m. 2	1.34	0.78	8.64	24.92	10.39	35.46	000.00	15.19	1.07	8.64	13.57	3.70
n;u.m. 3	0.59	0.34	3.84	11.07	4.61	15.76	000.00	6.75	0.47	3.84	6.03	1.64
n;u.m. 4	0.33	0.19	2.16	6.23	2.59	8.86	000.00	3.79	0.26	2.16	3.39	0.92
n;u.m. 5	0.21	0.12	1.38	3.98	1.66	5.67	000.00	2.43	0.17	1.38	2.17	0.59

$\Sigma$  = Sumatoria

R= Rango

V= Varianza

u.m.= unidad de medición

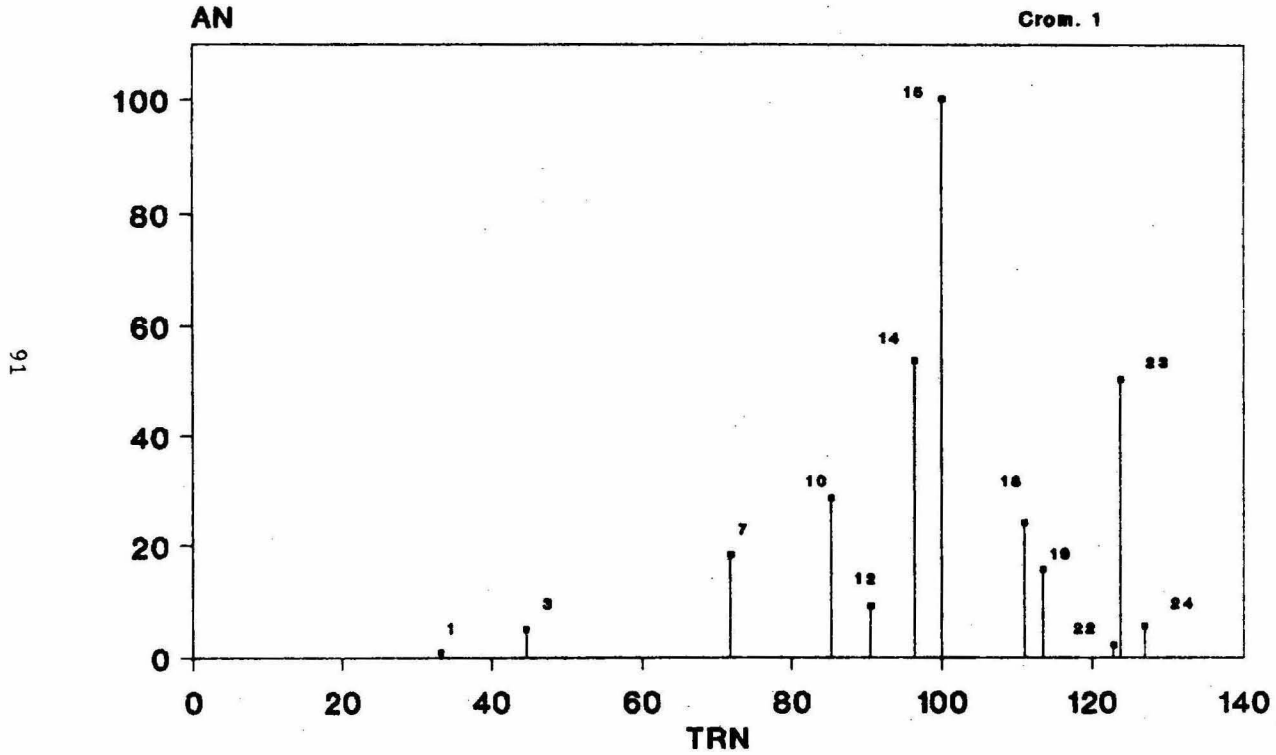
$X^{-}$  = Media

s = Desviación Estándar

n= número de repeticiones

# CROMATOGRAMA NORMALIZADO

Escherichia coli

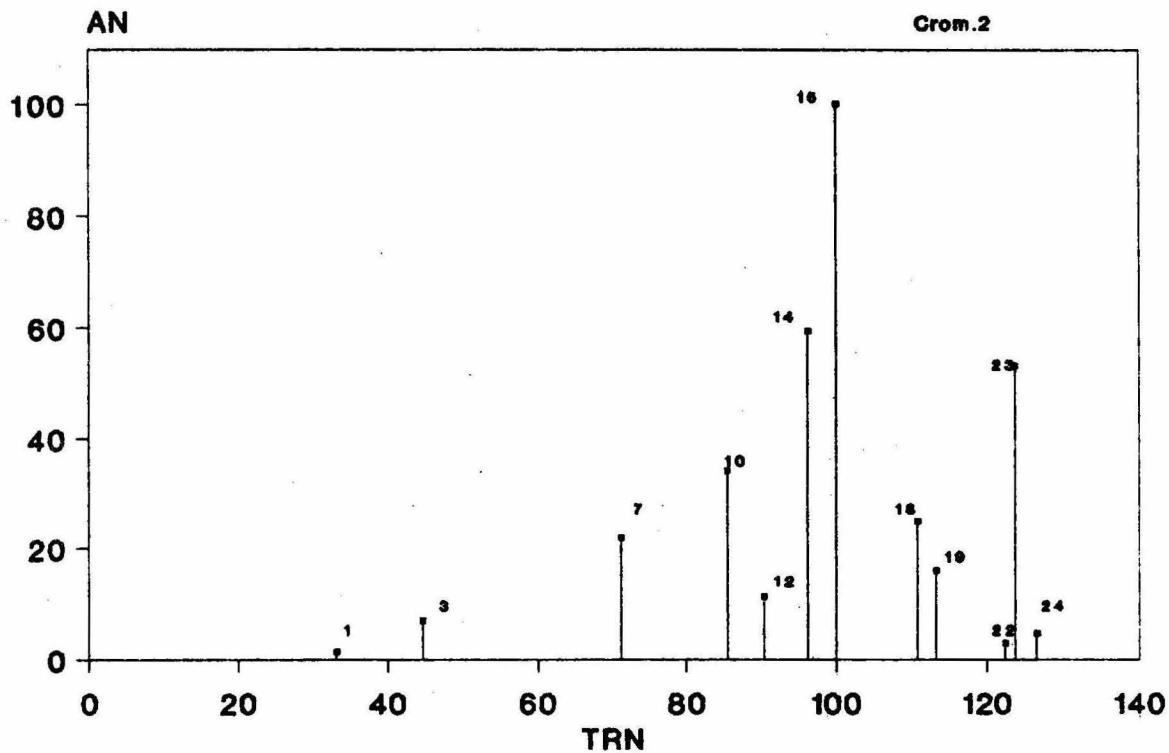


TRN - TIEMPO DE RETENCION NORMALIZADO  
AN - AREA NORMALIZADA

Oct.14 1987

# CROMATOGRAMA NORMALIZADO

Escherichia coli

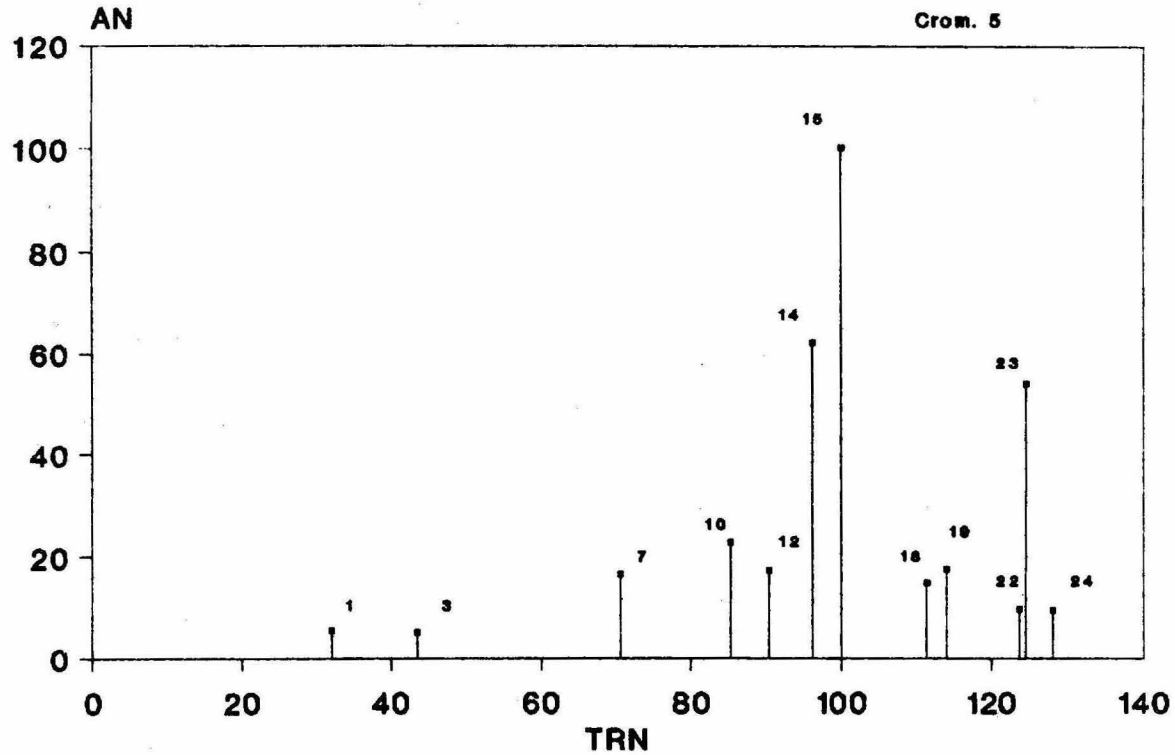


TRN - TIEMPO DE RETENCION NORMALIZADO  
AN - AREA NORMALIZADA

Oct. 14 1987

# CROMATOGRAMA NORMALIZADO

Escherichia coli

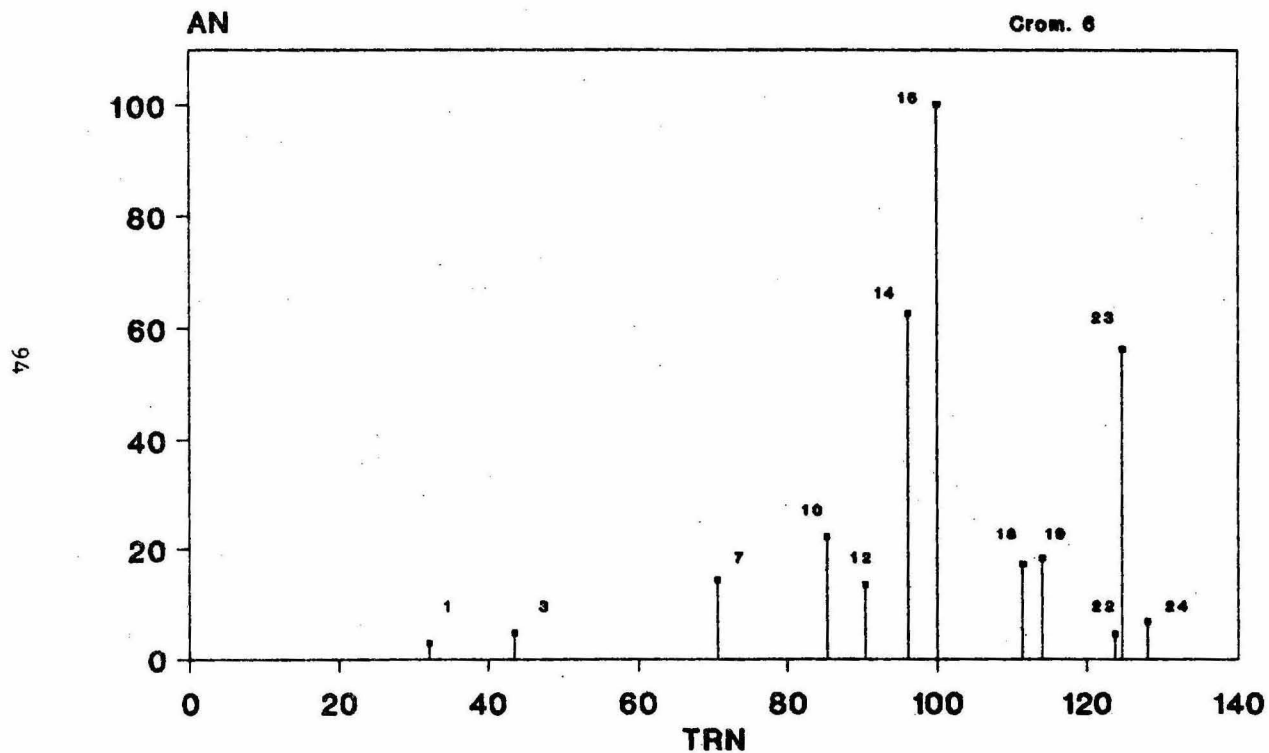


TRN - TIEMPO DE RETENCION NORMALIZADO  
AN - AREA NORMALIZADA

Nov. 25 1987

# CROMATOGRAMA NORMALIZADO

Escherichia coli

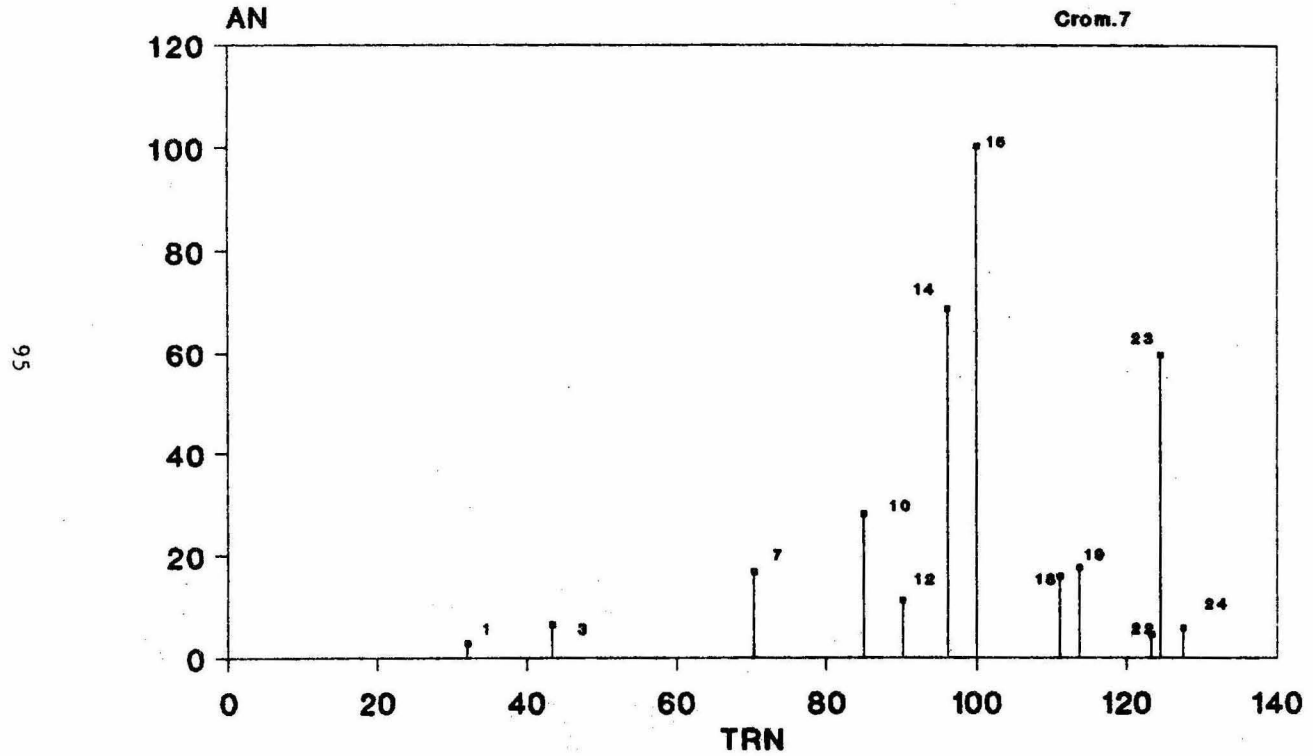


TRN - TIEMPO DE RETENCION NORMALIZADO  
AN - AREA NORMALIZADA

Nov. 25 1987

# Cromatograma Normalizado

Escherichia coli

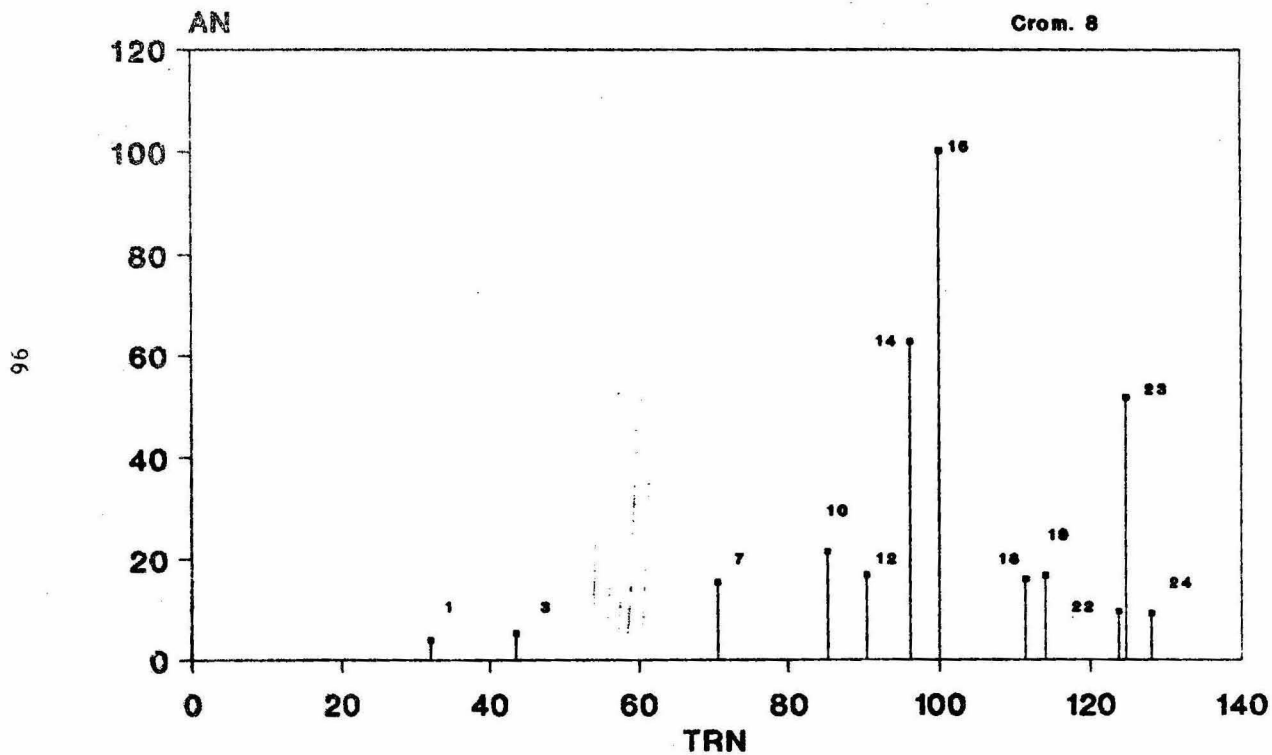


TRN-TIEMPO DE RETENCION NORMALIZADO  
AN -AREA NORMALIZADA

Nov. 25 1987

# CROMATOGRAMA NORMALIZADO

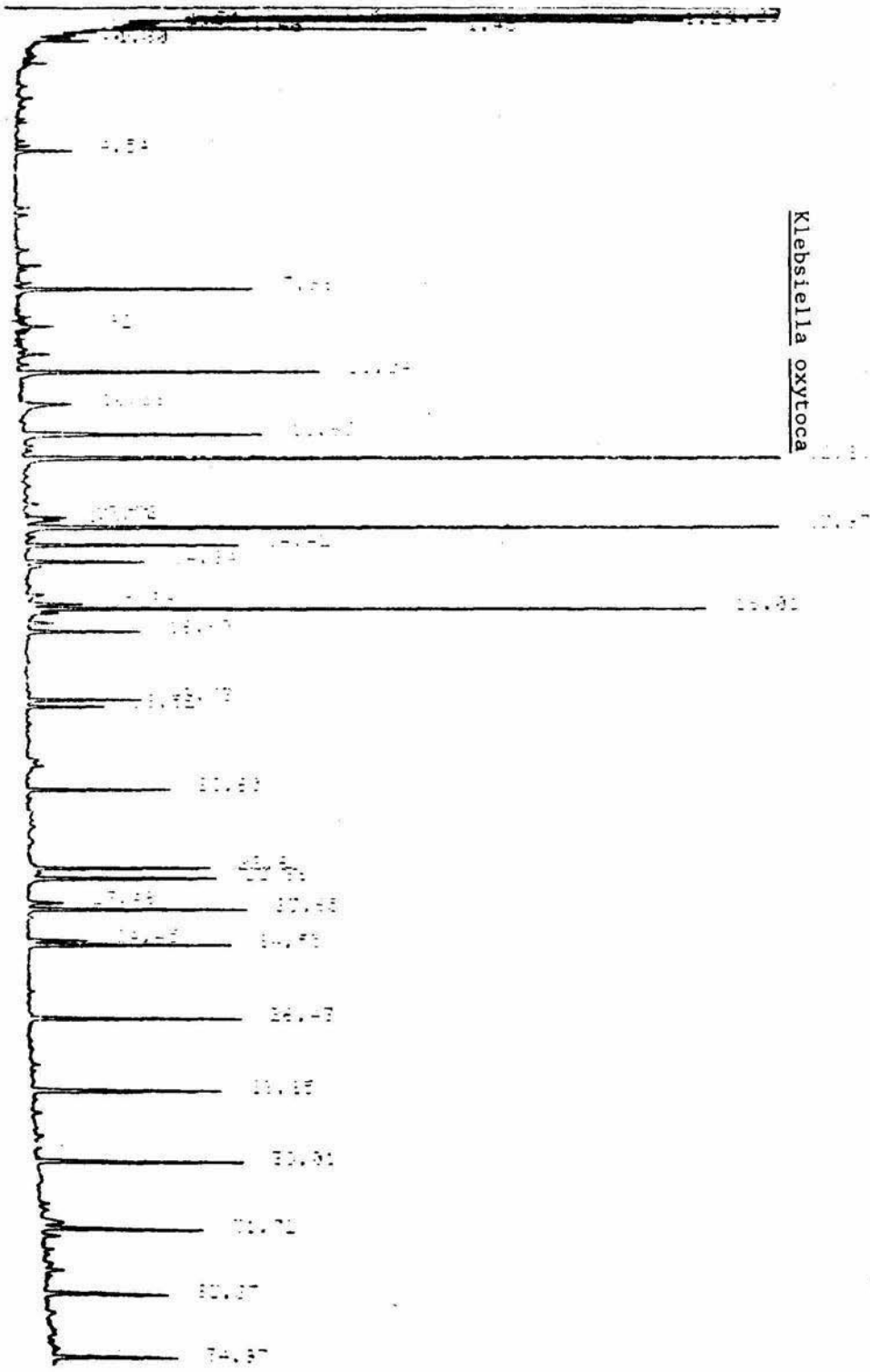
Escherichia coli



TRN - TIEMPO DE RETENCION NORMALIZADO  
AN - AREA NORMALIZADA

Nov. 25 1987





## Klebsiella oxytoca

CROM 10 10-02-89		
N	AN	TN
3	1.62	37.12
7	10.71	65.25
10	19.29	82.50
12	2.39	88.72
14	14.89	95.09
15	100.00	100.00
18	57.20	114.31
19	15.85	117.91
22	5.26	129.93
23	43.96	130.99
24	8.71	135.73
25	10.05	149.88

CROM 11 10-02-89		
N	AN	TN
3	2.82	37.18
7	14.47	65.36
10	19.14	82.23
12	0.70	88.90
14	12.09	95.25
15	100.00	100.00
18	64.34	114.41
19	15.51	118.10
22	4.78	130.14
23	50.65	131.12
24	8.50	135.95
25	8.32	150.12

CROM 19 24-02-89		
N	AN	TN
3	1.76	37.82
7	11.82	65.79
10	20.00	82.45
12	1.34	88.94
14	20.75	95.27
15	100.00	100.00
18	63.21	114.18
19	16.36	117.63
22	5.67	129.49
23	55.99	130.53
24	10.13	135.18
25	0.59	149.12

CROM 31 2-12-87		
N	AN	TN
3	3.60	37.69
7	15.47	66.09
10	10.27	81.26
12	4.49	89.05
14	21.61	95.24
15	100.00	100.00
18	54.60	113.75
19	6.85	117.30
22	4.89	128.78
23	47.55	129.76
24	10.00	134.37
25	5.78	147.89

CROM 32 2-12-87		
N	AN	TN
3	2.97	37.64
7	12.62	66.06
10	6.78	82.69
12	4.69	89.04
14	25.51	95.24
15	100.00	100.00
18	54.77	113.75
19	7.32	117.30
22	3.11	128.99
23	56.32	129.78
24	7.27	134.39
25	5.13	147.80

N= Formula del ester acido graso/ AN=Area normalizada/ TN=tiempo normalizado

## Klebsiella oxytoca

ANALISIS	3	7	10	12	14	15	18	19	22	23	24	25
10 10/02/89	1.62	10.71	19.29	2.89	14.89	100.00	57.20	15.85	5.26	43.96	8.71	10.05
11 10/02/89	2.82	14.47	19.14	0.70	12.09	100.00	64.34	15.51	4.78	50.65	8.50	8.32
19 24/02/89	1.76	11.82	20.00	1.34	20.75	100.00	63.21	16.36	5.67	55.99	10.13	8.59
31 02/12/87	3.60	15.47	10.27	4.48	21.61	100.00	54.60	6.85	4.89	47.55	10.80	5.78
32 02/12/87	2.97	12.62	6.78	4.69	25.51	100.00	54.77	7.32	3.11	56.32	7.27	5.13
$\Sigma$	12.77	65.09	75.48	14.10	94.85	600.00	294.12	61.89	23.71	254.47	45.41	37.87
$X^{-}$	2.55	13.01	15.09	2.82	18.97	000.00	58.82	12.37	4.74	50.89	9.08	7.57
R	1.98	4.76	13.22	3.99	13.42	000.00	9.74	9.51	2.56	12.36	3.53	4.92
s	0.85	2.04	5.58	1.71	5.76	000.00	4.18	4.08	1.10	5.31	1.51	2.11
V	0.33	0.15	0.37	0.60	0.30	000.00	0.07	0.33	0.23	0.10	0.16	0.55
n;u.m. 2	0.72	4.18	32.26	2.94	33.38	000.00	17.53	16.71	1.21	28.22	2.30	4.47
n;u.m. 3	0.32	1.86	14.33	1.30	14.79	000.00	7.79	7.42	0.53	12.54	1.02	1.98
n;u.m. 4	0.18	1.04	8.06	0.73	8.32	000.00	4.38	4.17	0.30	7.05	0.57	1.11
n;u.m. 5	0.11	0.66	5.16	0.47	5.32	000.00	2.80	2.67	0.19	4.51	0.86	0.71

$\Sigma$  = Sumatoria

R= Rango

V= Varianza

u.m.= unidad de medición

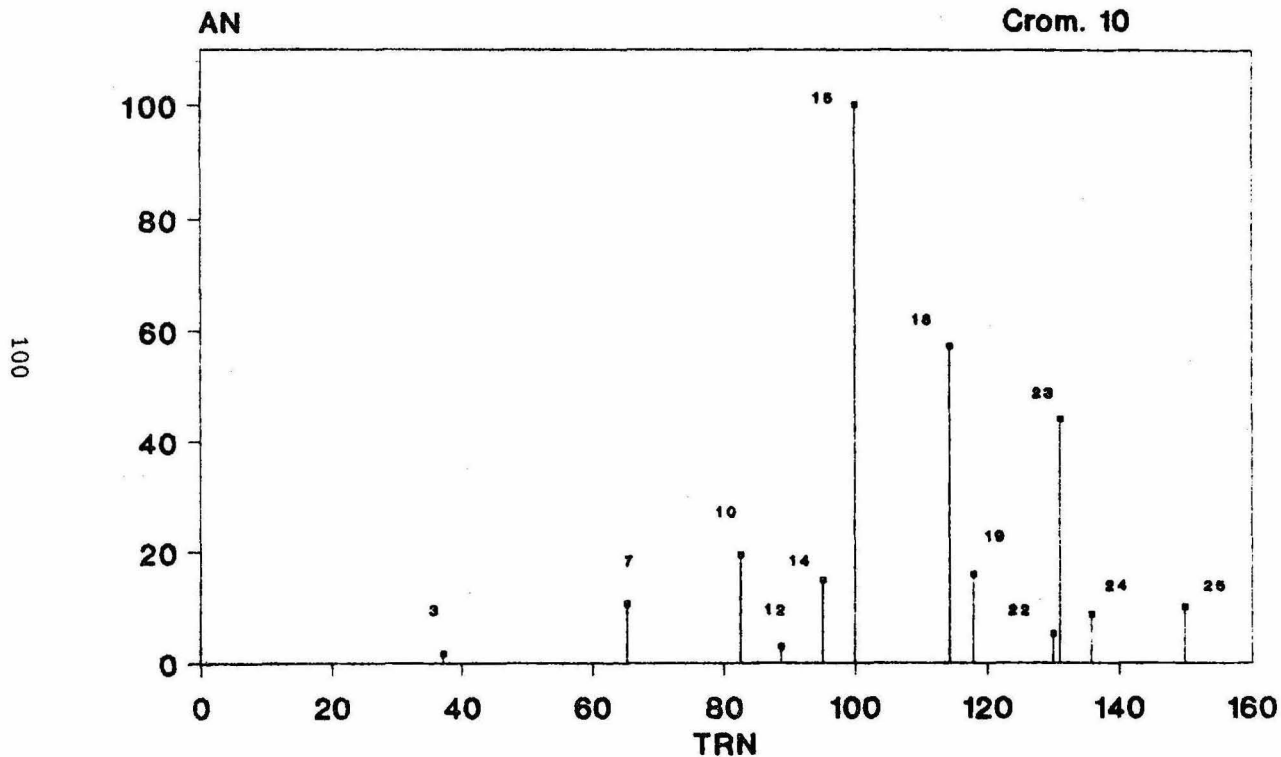
$X^{-}$  = Media

s = Desviación Estándar

n= número de repeticiones

# CROMATOGRAMA NORMALIZADO

*Klebsiella oxytoca*

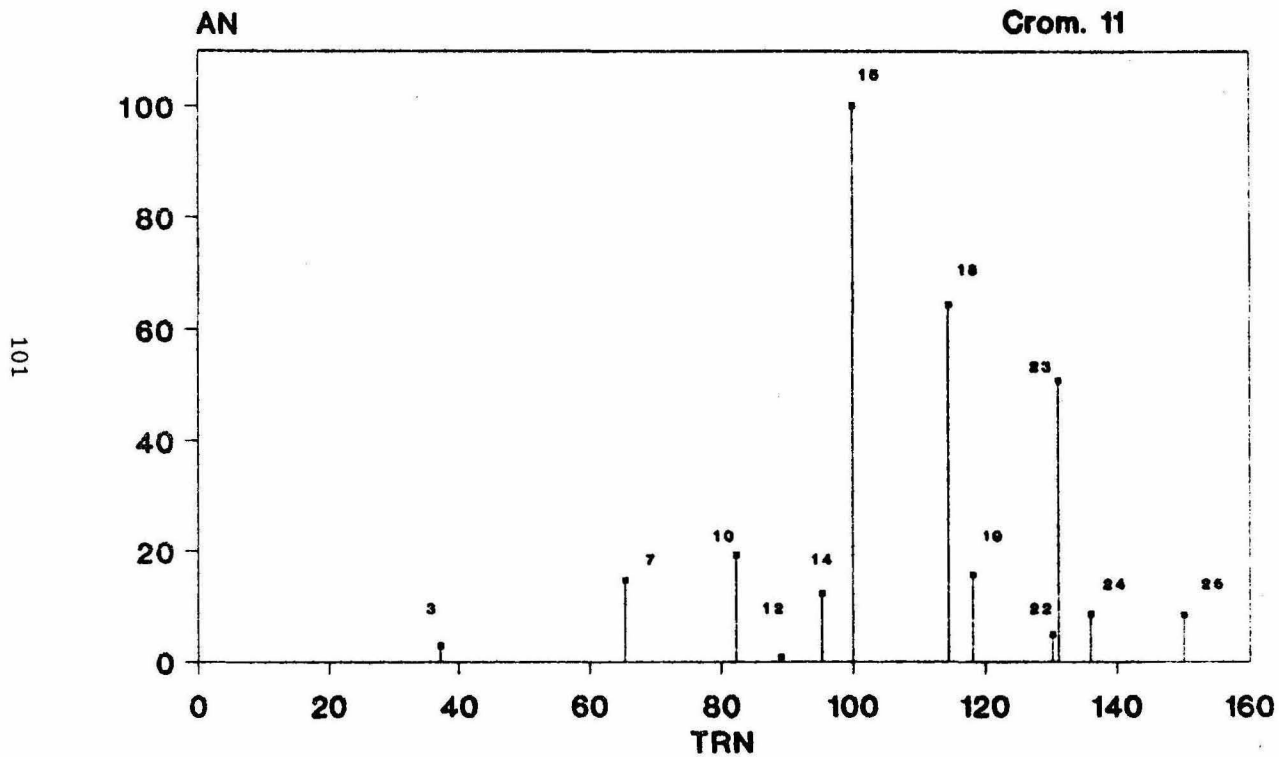


TRN - TIEMPO DE RETENCION NORMALIZADO  
AN - AREA NORMALIZADA

Feb. 10 1989

# CROMATOGRAMA NORMALIZADO

Klebsiella oxytoca

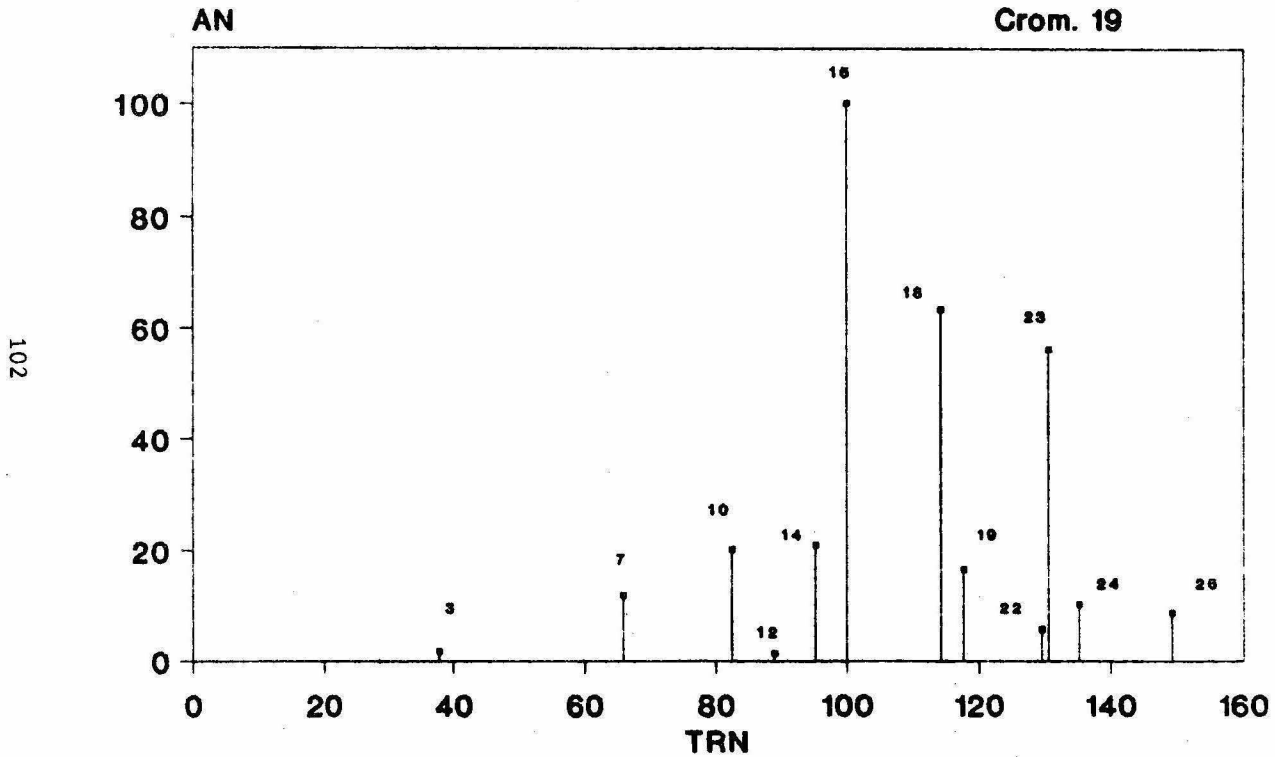


TRN - TIEMPO DE RETENCION NORMALIZADO  
AN - AREA NORMALIZADA

Feb. 10 1989

# CROMATOGRAMA NORMALIZADO

Klebsiella oxytoca

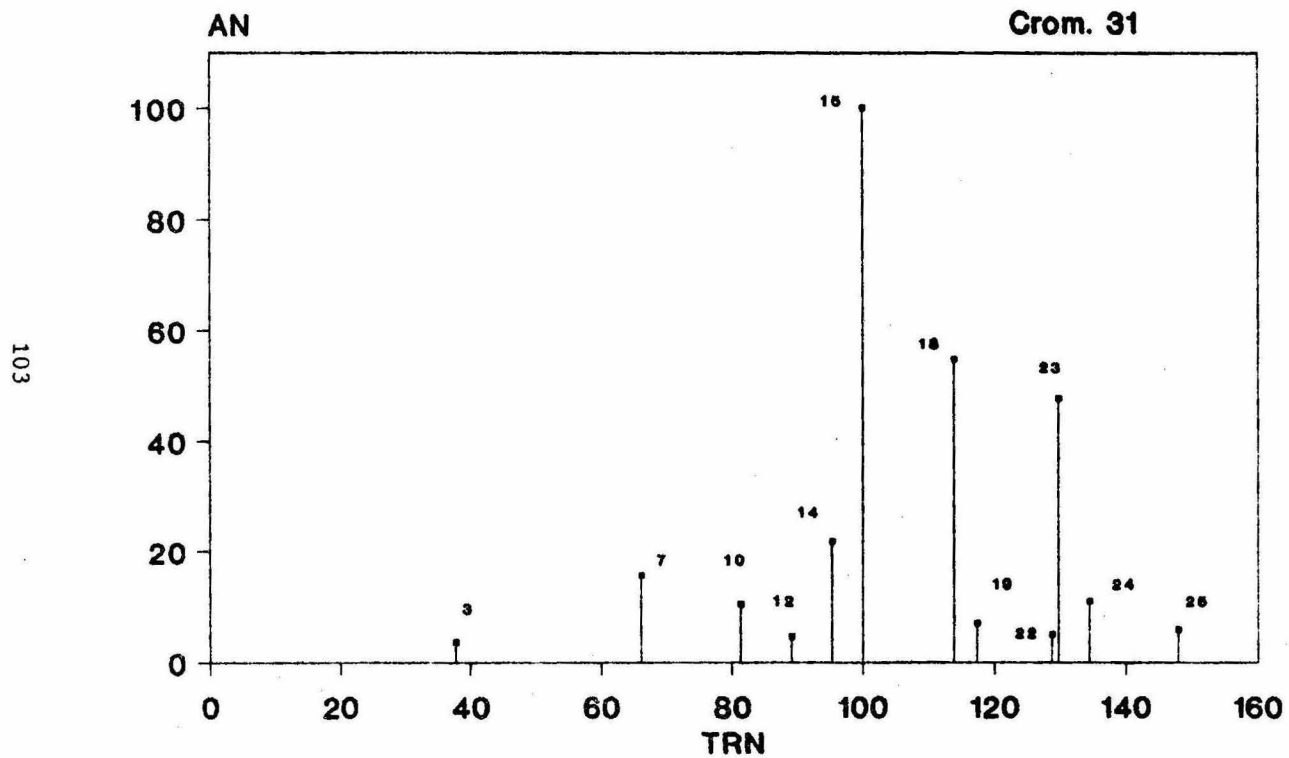


TRN - TIEMPO DE RETENCION NORMALIZADO  
AN - AREA NORMALIZADA

Feb. 24 1989

# CROMATOGRAMA NORMALIZADO

Klebsiella oxytoca

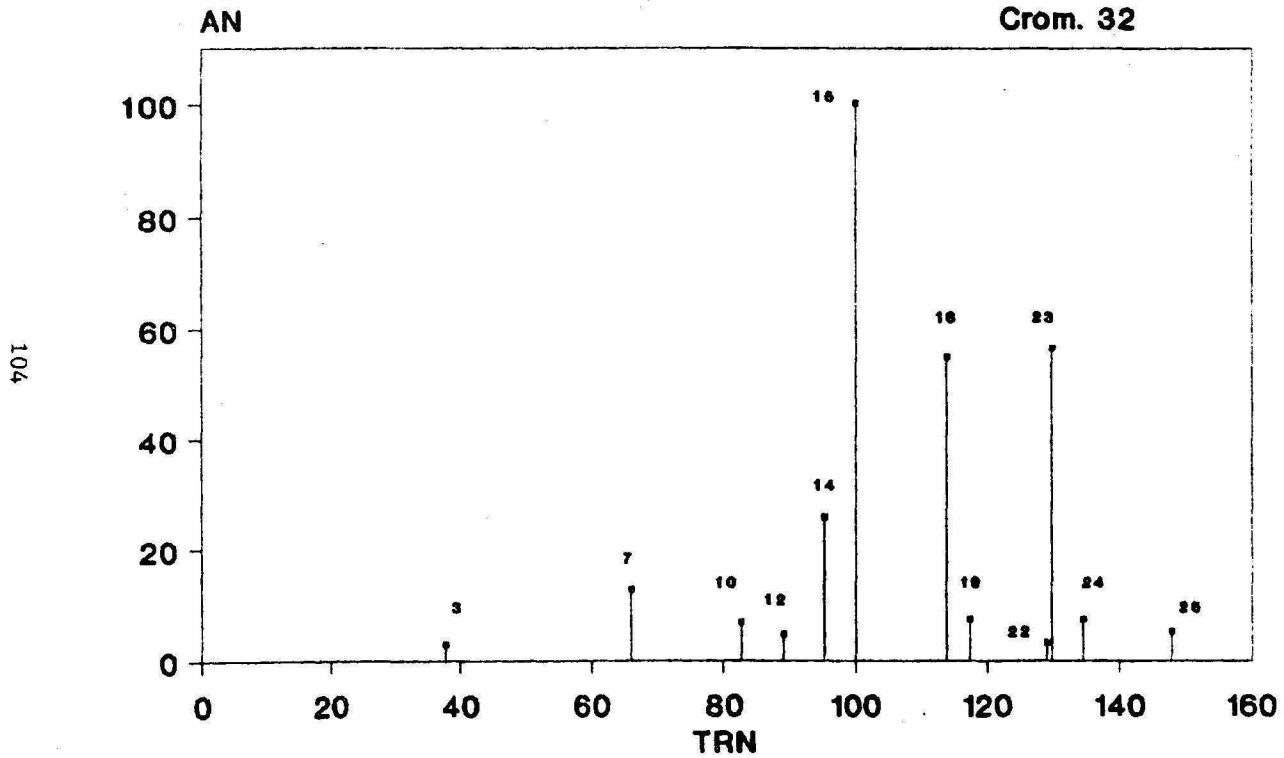


TRN - TIEMPO DE RETENCION NORMALIZADO  
AN - AREA NORMALIZADA

Dic.2 1987

# CROMATOGRAMA NORMALIZADO

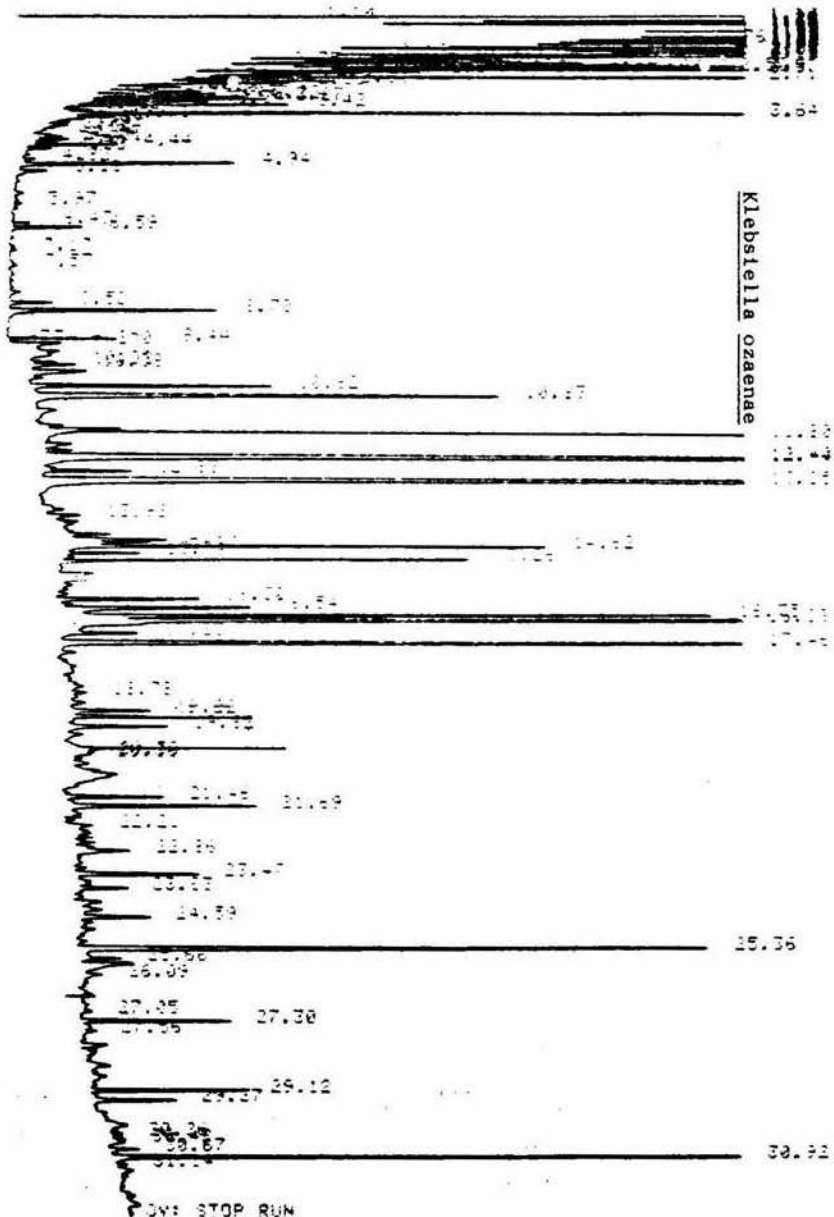
*Klebsiella oxytoca*



TRN - TIEMPO DE RETENCION NORMALIZADO  
AN - AREA NORMALIZADA

Dic. 2 1987





IMP 5380A MANUAL INJECTION @ 14:23 MAR 17, 1989  
 AREA %

105

RT	AREA	TYPE	WIDTH	HEIGHT	BASELINE	AREA %
----	------	------	-------	--------	----------	--------

## Klebsiella ozaenae

CROM 42 2-12-87		
N	AN	TN
7	25.50	66.23
10	3.59	83.27
14	30.29	95.33
15	100.00	100.00
19	3.45	117.48
22	5.73	128.86
23	34.89	129.77
24	9.97	134.44

CROM 36 17-3-89		
N	AN	TN
7	16.26	66.46
10	10.36	82.70
14	41.58	95.25
15	100.00	100.00
19	6.93	116.69
22	12.50	128.10
23	31.85	129.23
24	18.46	133.60

CROM 35 17-3-89		
N	AN	TN
7	14.48	66.87
10	9.83	82.99
14	38.73	95.33
15	100.00	100.00
19	7.33	116.93
22	12.51	128.35
23	41.33	129.35
24	19.06	133.79

CROM 42 2-12-87		
N	AN	TN
7	14.98	66.77
10	9.53	83.12
14	42.86	95.47
15	100.00	100.00
19	6.39	117.11
22	12.63	128.55
23	33.24	129.55
24	18.97	134.00

CROM 18 24-2-89		
N	AN	TN
7	21.90	65.89
10	8.78	82.66
14	28.61	94.94
15	100.00	100.00
19	6.96	117.98
22	18.98	127.05
23	36.79	129.53
24	51.88	135.38

Klebsiella ozaenae

ANALISIS	7	10	14	15	19	22	23	24
18 24/02/89	21.90	8.78	20.61	100.00	6.96	10.90	36.79	51.80
33 17/03/89	14.98	9.53	42.06	100.00	6.39	12.63	33.24	18.97
35 17/03/89	14.48	9.02	38.73	100.00	7.53	12.51	41.33	19.06
36 17/03/89	16.26	10.36	41.58	100.00	6.93	12.50	31.85	18.46
42 02/12/87	25.50	3.59	30.29	100.00	3.45	5.73	34.09	9.97
$\Sigma$	93.12	41.28	173.27	600.00	31.26	54.27	177.30	118.26
$X^{-}$	18.62	8.25	34.65	100.00	6.25	10.85	35.46	23.65
R	11.02	6.77	21.45	000.00	4.08	6.90	9.48	41.83
s	4.73	2.91	9.22	000.00	1.75	2.96	4.07	17.98
V	0.25	0.35	0.26	000.00	0.28	0.27	0.11	0.76
n;u.m. 2	22.37	8.46	85.00	000.00	3.06	8.76	16.56	323.28
n;u.m. 3	9.94	3.76	37.78	000.00	1.36	3.89	7.36	143.68
n;u.m. 4	5.59	2.11	21.25	000.00	0.76	2.19	4.14	80.82
n;u.m. 5	3.57	1.36	13.60	000.00	0.49	1.40	2.65	51.72

$\Sigma$  = Sumatoria    R= Rango    V= Varianza     $X^{-}$ = Media

s= Desviación Estándar    n= número de repeticiones

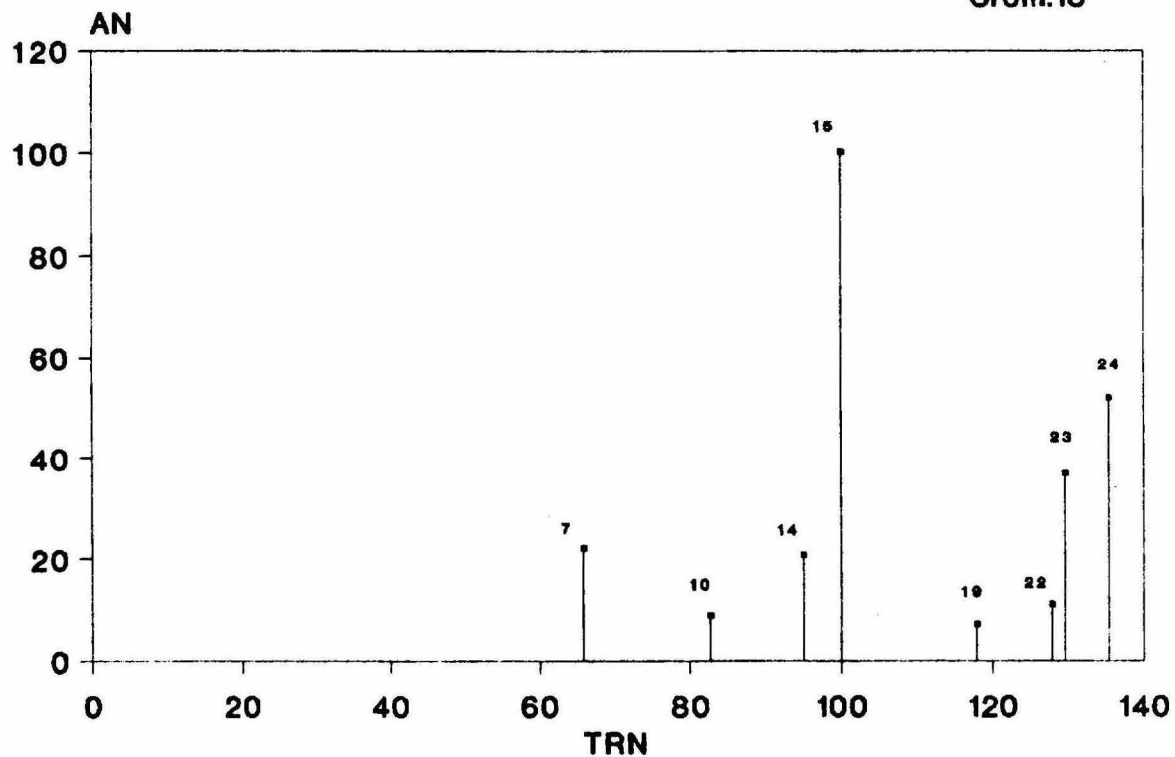
u.m.= unidad de medición

# Cromatograma Normalizado

Klebsiella ozaenae

Crom.18

108



TRN - TIEMPO DE RETENCION NORMALIZADO  
AN - AREA NORMALIZADA

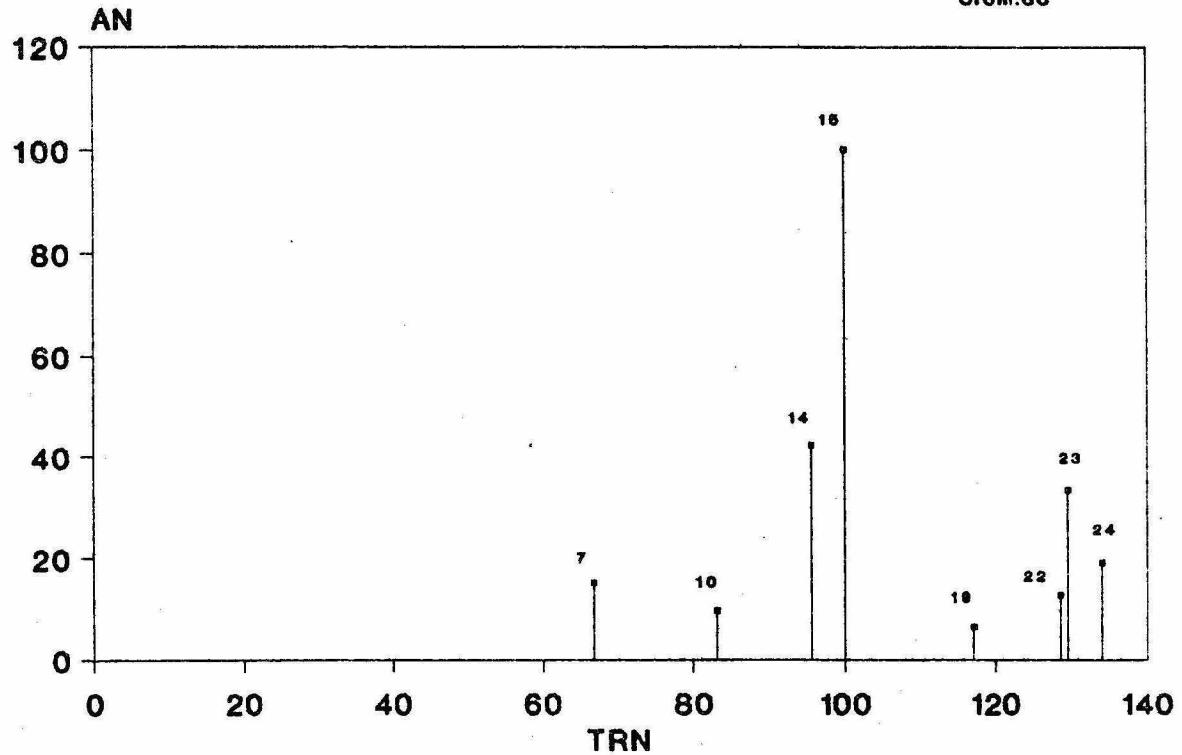
Feb. 24 1989

# Cromatograma Normalizado

Klebsiella ozaenae

Crom.33

109



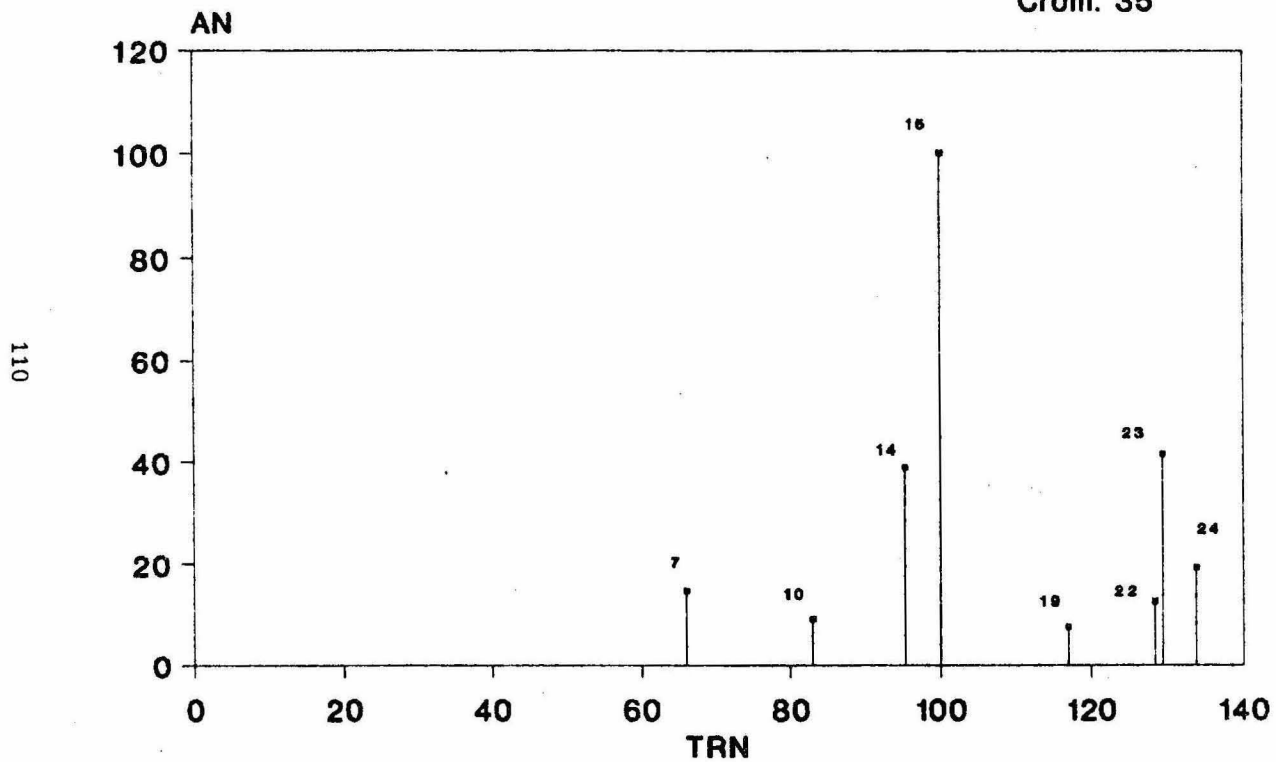
TRN - TIEMPO DE RETENCION NORMALIZADO  
AN - AREA NORMALIZADA

Marzo 17 1989

# Cromatograma Normalizado

Klebsiella ozaenae

Crom. 35



TRN - TIEMPO DE RETENCION NORMALIZADO  
AN - AREA NORMALIZADA

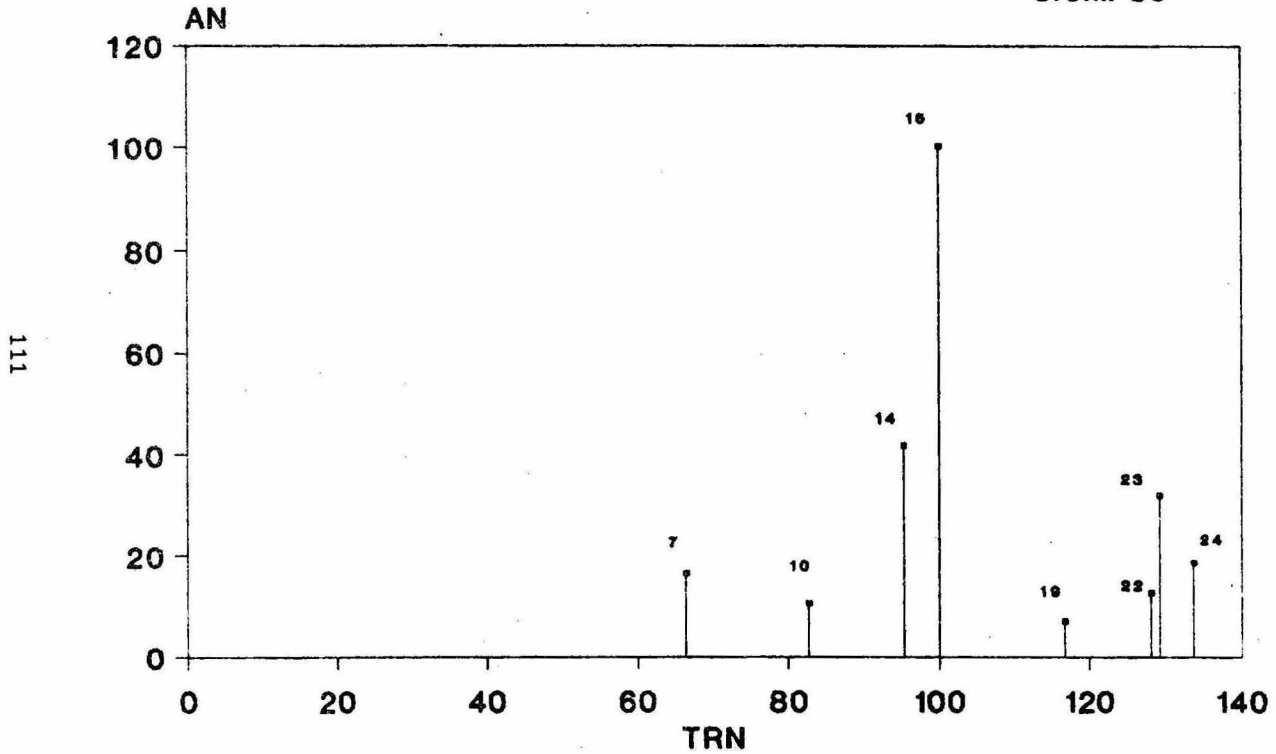
Marzo 17 1989

110

# Cromatograma Normalizado

Klebsiella ozaenae

Crom. 36



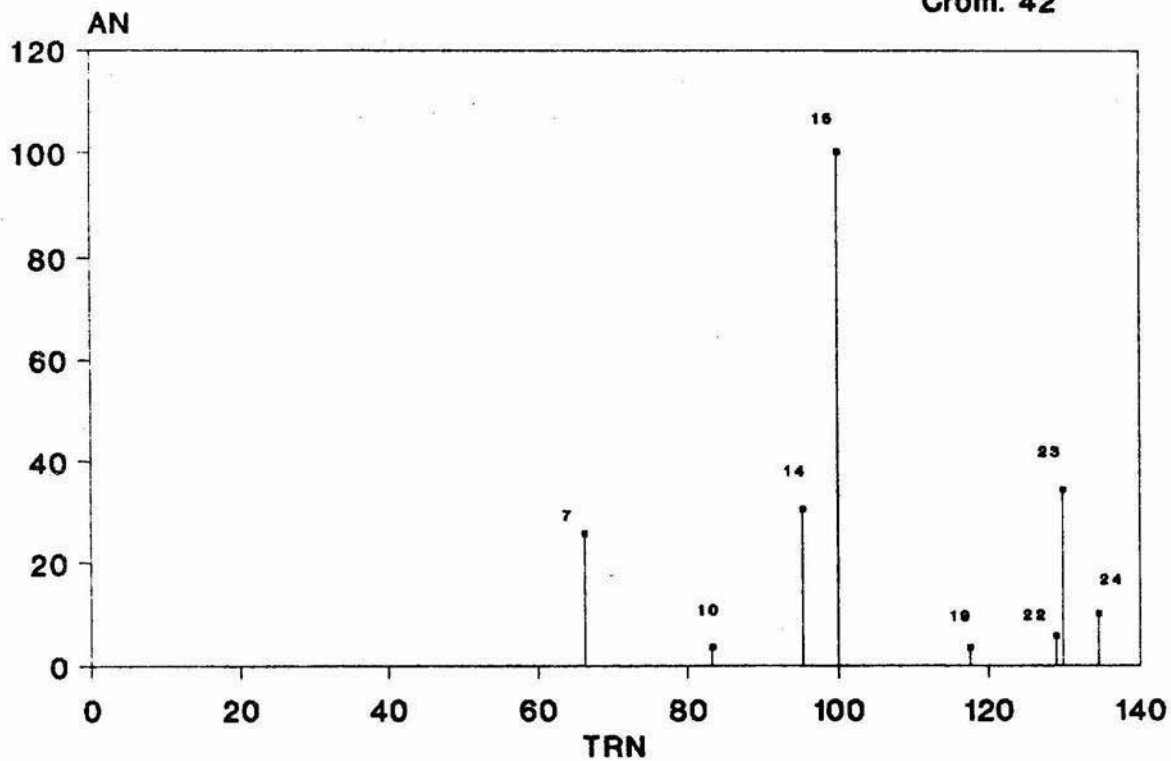
TRN - TIEMPO DE RETENCION NORMALIZADO  
AN - AREA NORMALIZADA

Marzo 17 1989

# Cromatograma Normalizado

*Klebsiella ozaenae*

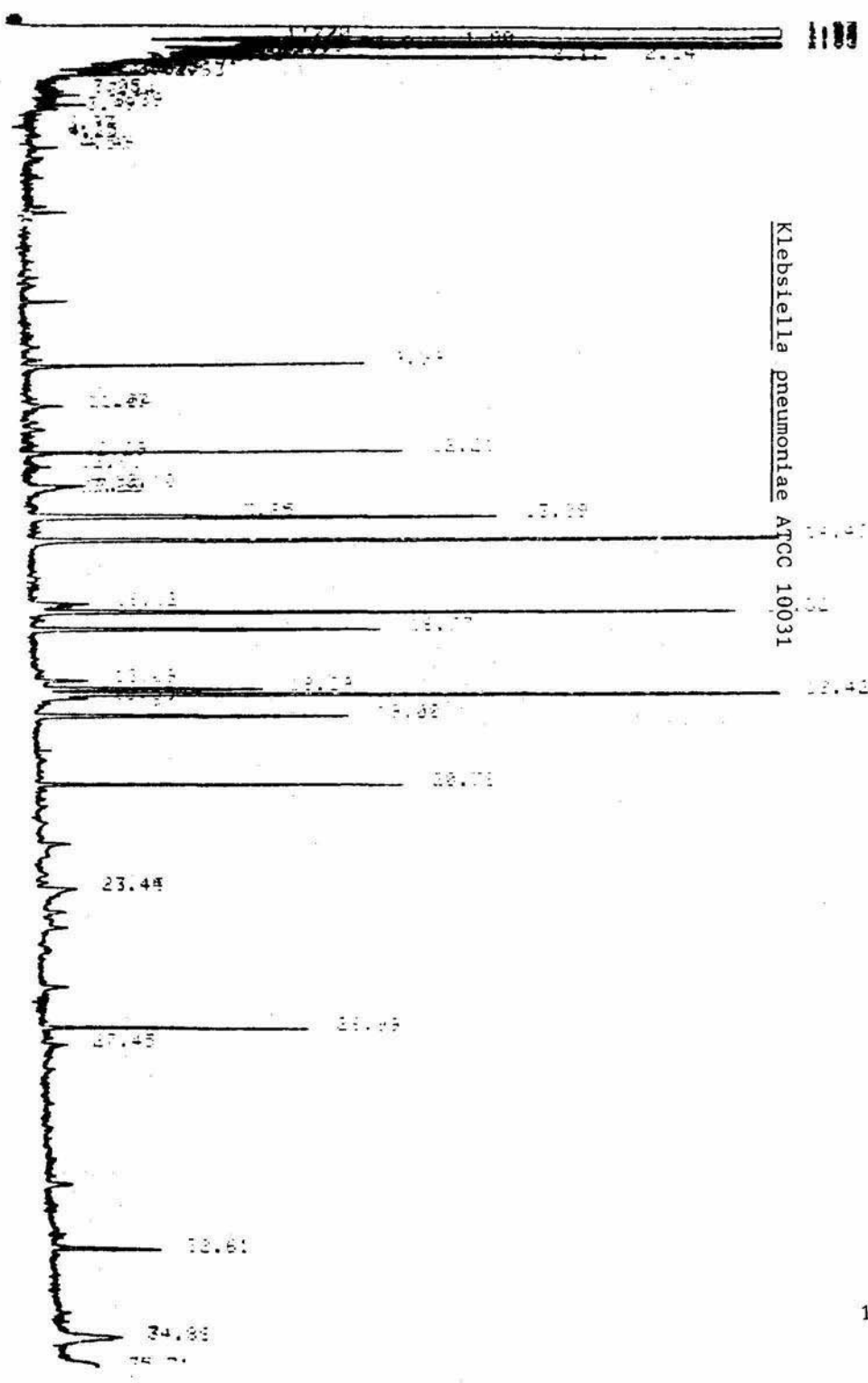
Crom. 42



TRN - TIEMPO DE RETENCION NORMALIZADO  
AN - AREA NORMALIZADA

Dic. 2 1987





## Klebsiella pneumoniae

CROM 47 7-10-87		
N	AN	TN
3	8.96	38.73
7	23.22	66.21
8	5.7	75.12
10	5.8	82.49
12	11.59	88.58
14	33.58	95.85
15	100.00	100.00
18	35.87	113.24
19	5.26	116.43
22	8.97	128.23
24	1.8	133.33

CROM 48 7-10-87		
N	AN	TN
3	2.95	38.34
7	29.52	66.21
8	5.5	75.3
10	4.69	82.23
12	21.11	88.38
14	58.00	95.86
15	100.00	100.00
18	26.88	112.98
19	4.18	116.84
22	1.87	127.56
24	2.28	132.87

CROM 45 26-11-87		
N	AN	TN
3	11.43	43.72
7	29.25	78.85
8	7.25	88.12
10	8.11	85.43
12	11.20	98.73
14	34.31	96.28
15	100.00	100.00
18	26.13	111.77
19	7.3	114.30
22	18.96	124.89
24	18.18	128.41

CROM 46 26-11-87		
N	AN	TN
3	17.27	43.66
7	44.61	78.79
8	6.88	88.12
10	7.48	85.43
12	18.39	98.67
14	38.95	96.28
15	100.00	100.00
18	24.56	111.77
19	6.2	114.11
22	17.47	124.85
24	13.45	128.35

CROM 14 17-02-89		
N	AN	TN
3	8.26	38.75
7	14.45	68.94
8	7.58	76.58
10	16.26	84.27
12	18.85	89.16
14	15.14	95.86
15	100.00	100.00
18	38.12	112.63
19	17.88	115.73
22	12.17	126.22
24	16.58	131.12

CROM 34 17-03-89		
N	AN	TN
3	8.37	38.88
7	43.94	66.72
8	8.58	76.69
10	14.82	82.98
12	28.07	89.26
14	26.48	95.48
15	100.00	100.00
18	43.75	113.65
19	18.31	117.82
22	15.21	128.53
24	25.78	133.97

N= Formula del ester acido graso/ AN=Area normalizada/ TN=tiempo normalizado

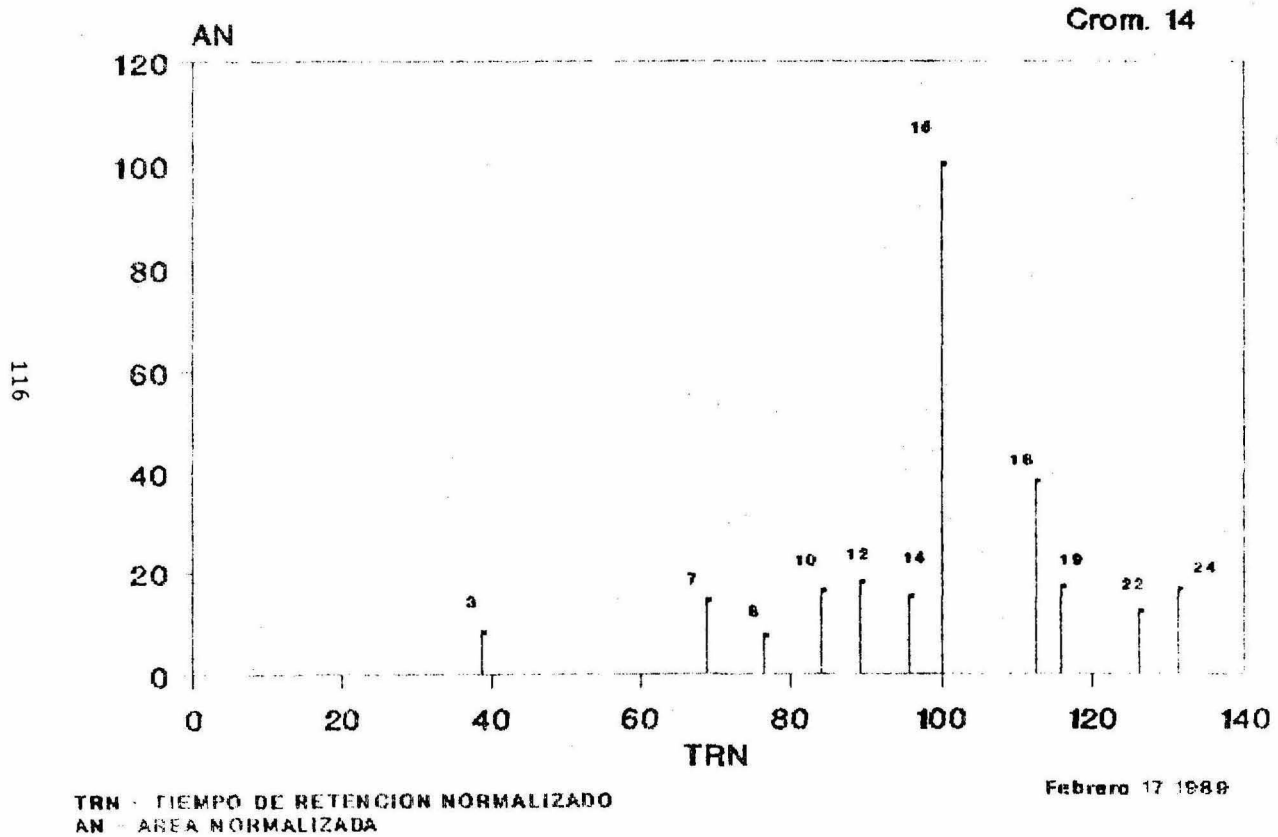
Klebsiella pneumoniae ATCC 10031

ANALISIS	3	7	8	10	12	14	15	18	19	22	24
14 17/02/89	8.26	14.45	7.50	16.26	18.05	15.14	100.00	38.12	17.08	12.17	16.58
34 17/03/89	8.37	43.94	8.58	14.82	20.07	26.40	100.00	43.75	10.31	15.21	25.70
45 26/11/87	11.43	29.95	7.25	8.11	11.20	34.31	100.00	26.13	7.30	10.96	10.10
46 26/11/87	17.27	44.61	6.08	7.40	10.39	30.95	100.00	24.56	6.20	17.47	13.45
47 07/10/87	0.96	23.22	5.70	5.80	11.59	33.58	100.00	35.07	5.26	0.97	1.80
48 07/10/87	2.95	29.52	5.50	4.69	21.11	50.00	100.00	26.08	4.10	1.07	2.28
$\Sigma$	49.24	185.69	40.61	57.08	92.41	190.38	600.00	193.71	50.25	54.85	69.91
$X^{-}$	8.20	30.94	6.76	9.51	15.40	31.73	100.00	32.28	8.37	9.14	11.65
R	16.31	30.16	3.08	11.57	10.72	34.86	000.00	19.19	12.98	16.50	23.90
s	6.43	11.90	1.21	4.56	4.23	13.75	000.00	7.57	5.12	6.51	9.43
V	0.78	0.38	0.17	0.47	0.27	0.43	000.00	0.23	0.61	0.71	0.80
n;u.m. 2	41.34	141.61	1.46	20.79	17.89	189.06	000.00	57.30	26.61	42.38	88.92
n;u.m. 3	18.37	62.93	0.65	9.24	7.95	84.02	000.00	25.46	11.65	18.83	39.52
n;u.m. 4	10.33	35.40	0.36	5.19	4.47	47.26	000.00	14.32	6.55	10.59	22.23
n;u.m. 5	6.61	22.65	0.23	3.32	2.86	30.25	000.00	9.16	4.19	6.78	14.22

$\Sigma$  = Sumatoria      R = Rango      V = Varianza      u.m. unidad de medición       $X^{-}$  = Media  
s = Desviación Estándar      n = número de repeticiones

# Cromatograma Normalizado

*Klebsiella pneumoniae*

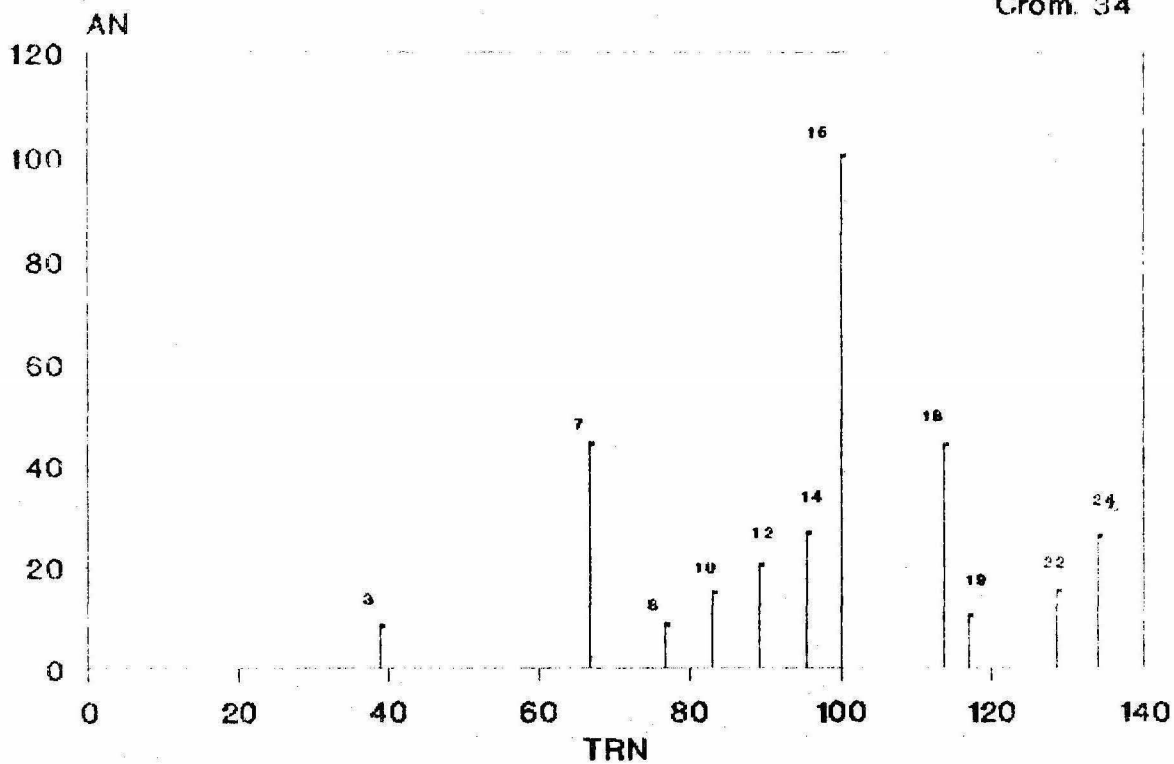


# Cromatograma Normalizado

*Klebsiella pneumoniae*

Crom. 34

117



TRN - TIEMPO DE RETENCIÓN NORMALIZADO  
AN - AREA NORMALIZADA

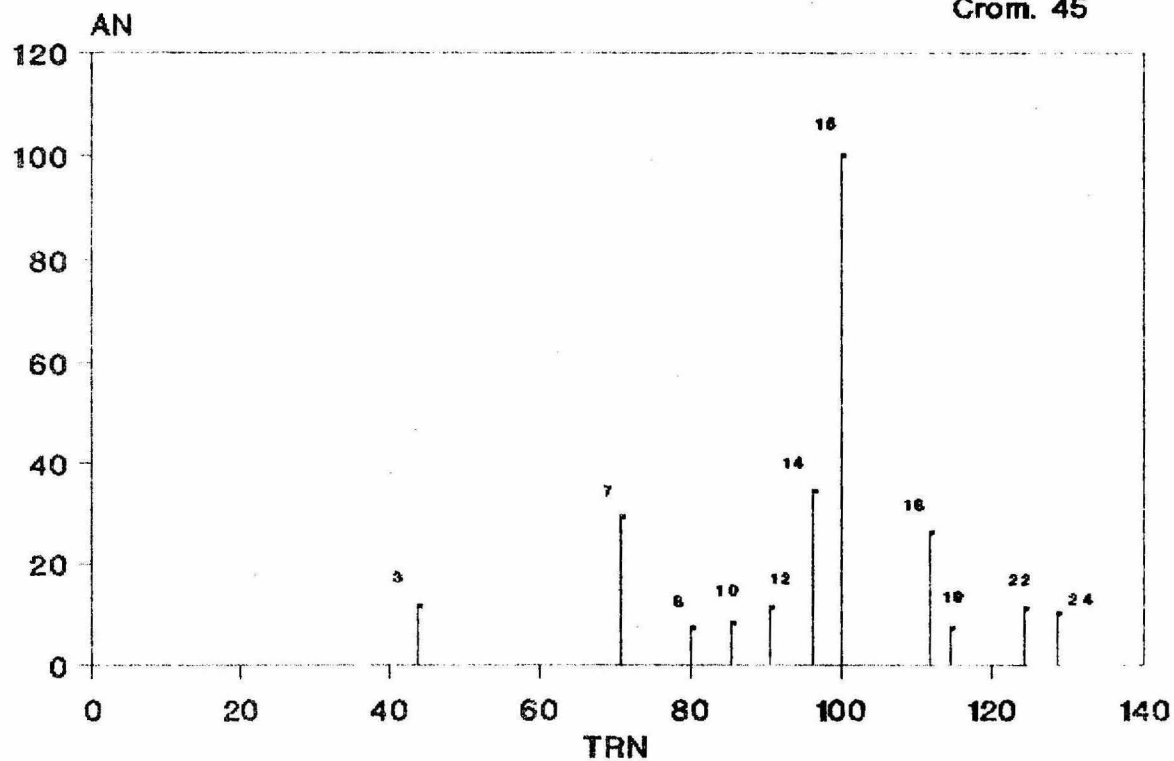
Marzo 17 1989

# Cromatograma Normalizado

Klebsiella pneumoniae

Crom. 45

118



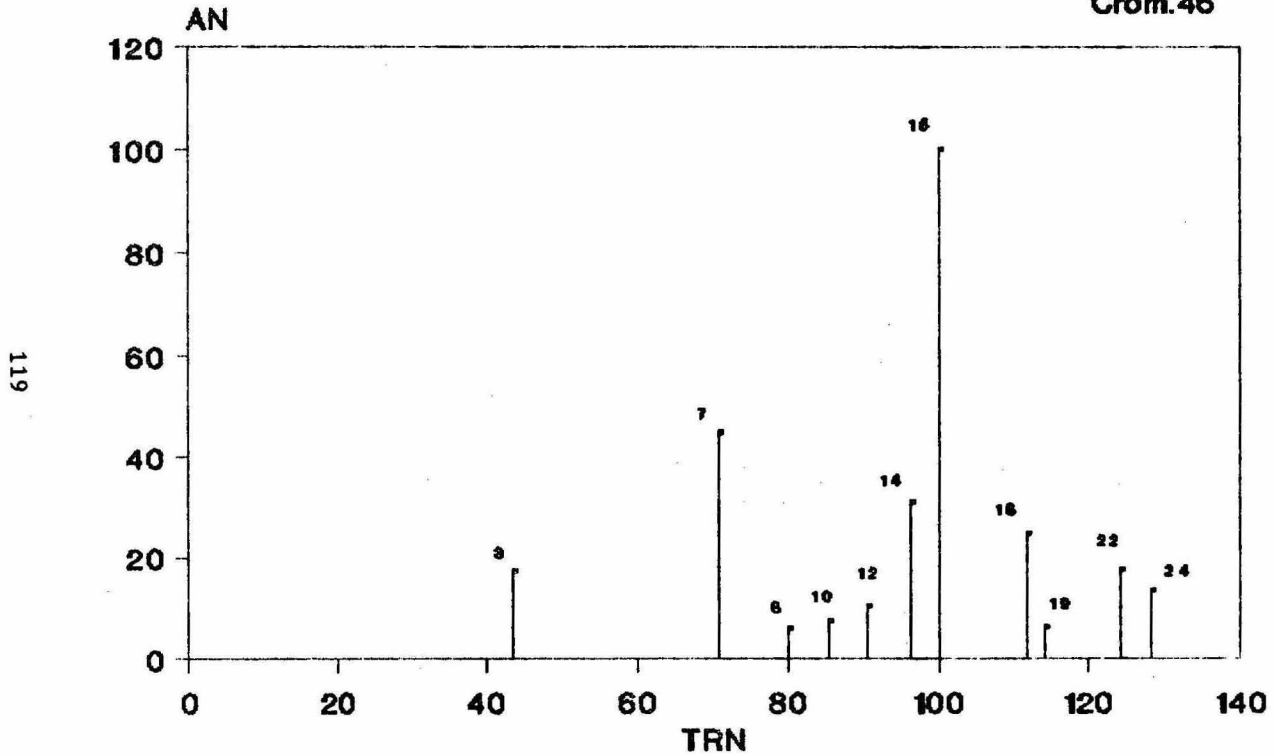
TRN - TIEMPO DE RETENCION NORMALIZADO  
AN - AREA NORMALIZADA

Nov. 23 1987

# Cromatograma Normalizado

*Klebsiella pneumoniae*

Crom.46



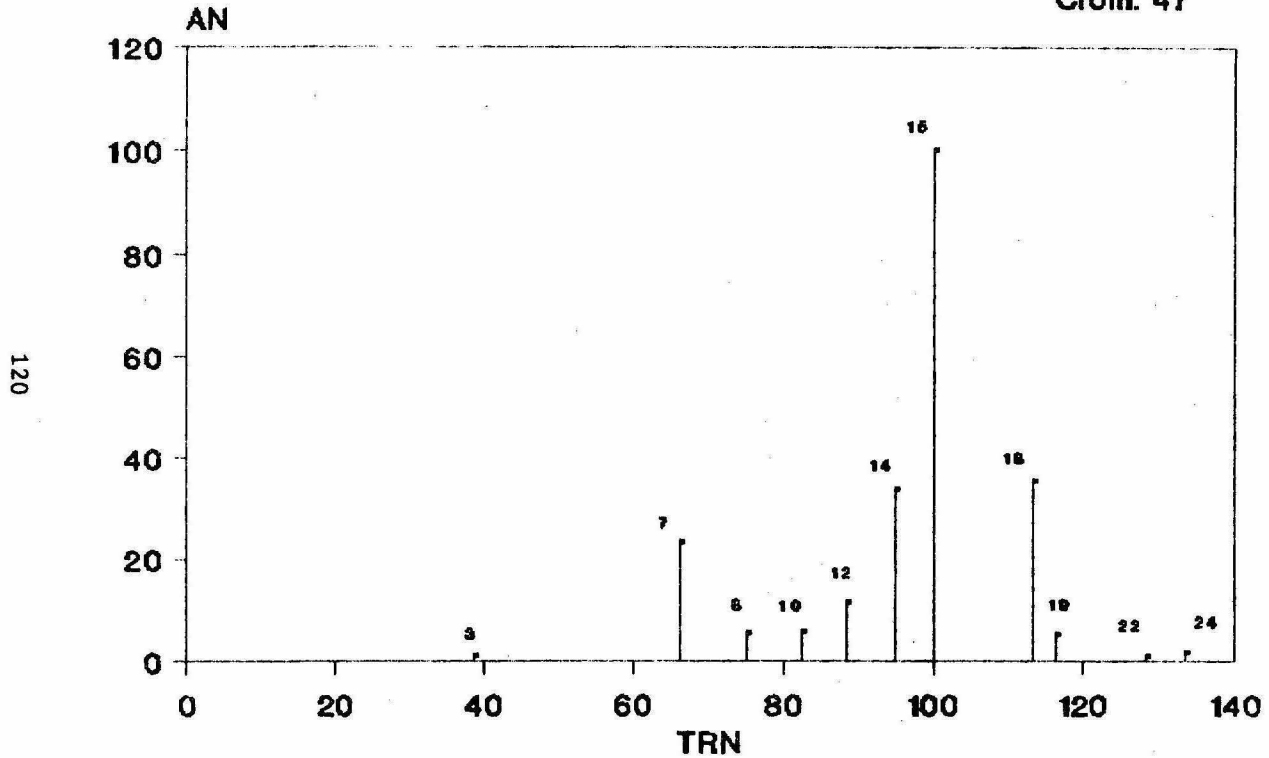
TRN - TIEMPO DE RETENCION NORMALIZADO  
AN - AREA NORMALIZADA

Nov. 26 1987

# Cromatograma Normalizado

*Klebsiella pneumoniae*

Crom. 47



TRN - TIEMPO DE RETENCION NORMALIZADO  
AN - AREA NORMALIZADA

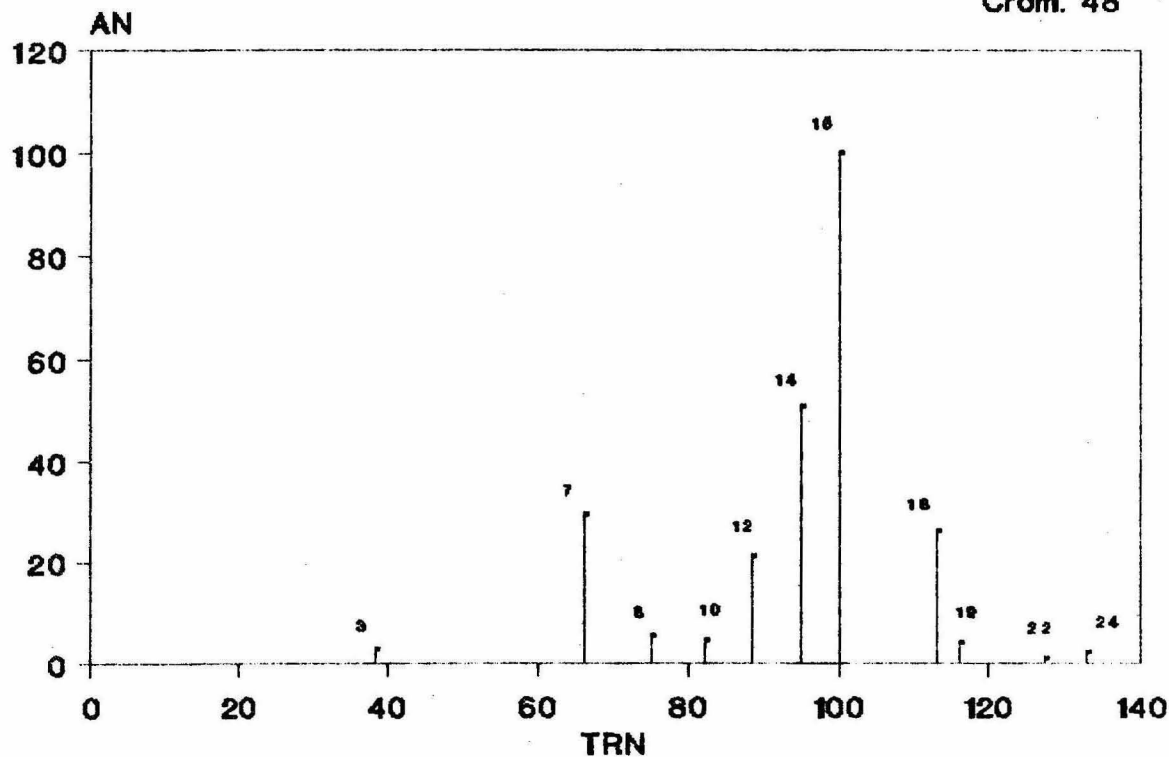
Octubre 7 1987



# Cromatograma Normalizado

*Klebsiella pneumoniae*

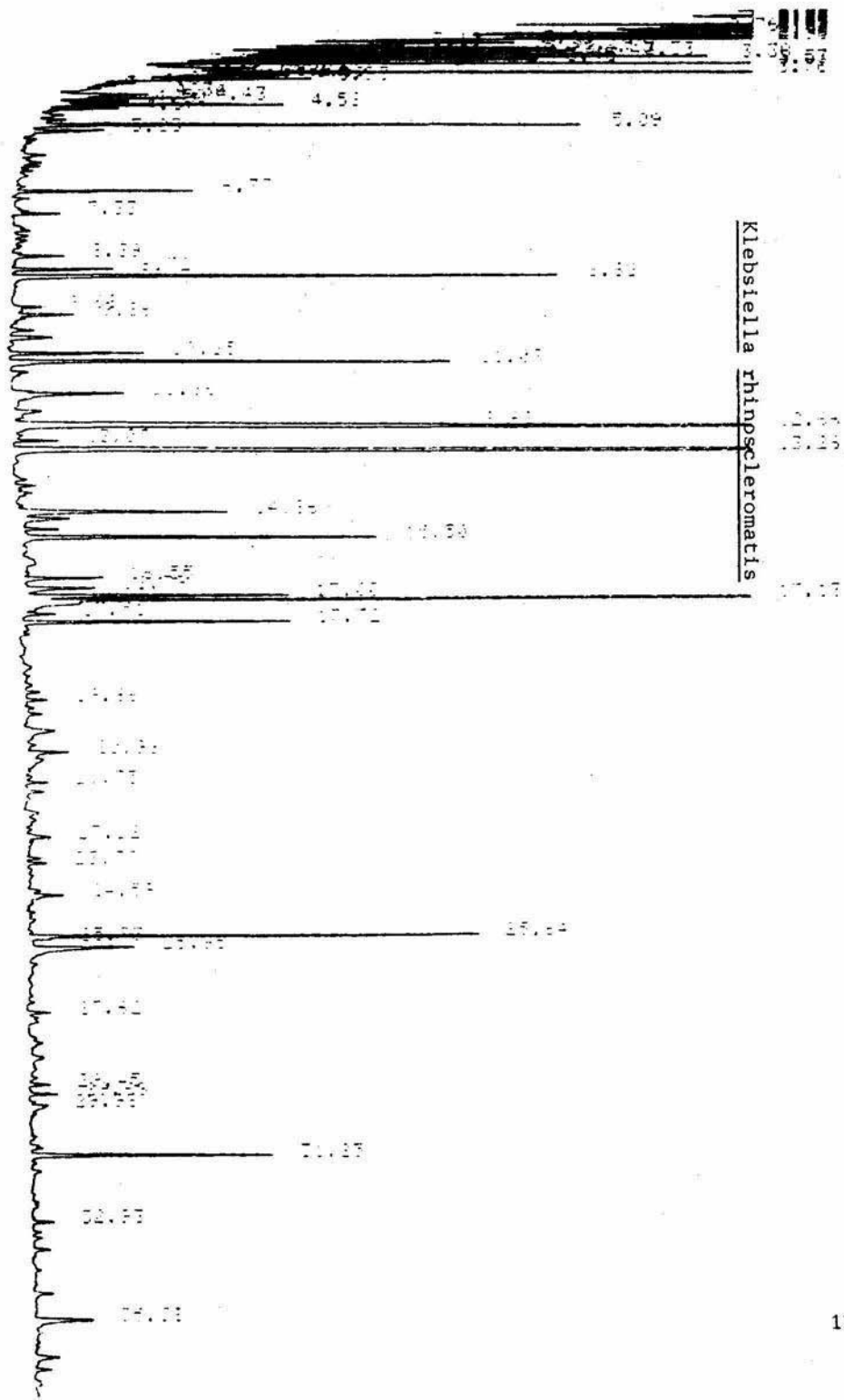
Crom. 48



TRN - TIEMPO DE RETENCIÓN NORMALIZADO  
AN - ARCA NORMALIZADA

Octubre 7 1987

121



## klebsiella rhinoscleromatis

CROM 52 14-10-87		
N	AN	TN
1	5.00	32.61
7	18.62	71.00
10	2.87	85.23
12	9.9	90.40
14	53.8	96.16
15	100.00	100.00
17	2.9	112.00
23	55.13	123.6
24	4.39	126.5

CROM 54 14-10-87		
N	AN	TN
1	6.30	32.69
7	15.3	71.32
10	5.5	84.38
12	8.71	90.50
14	51.09	96.21
15	100.00	100.00
17	3.48	112.29
23	55.45	123.83
24	5.30	128.86

CROM 56 4-11-87		
N	AN	TN
1	3.30	33.22
7	16.20	71.37
10	3.15	85.60
12	8.13	90.65
14	47.44	96.30
15	100.00	100.00
17	2.48	109.75
23	42.42	123.98
24	6.83	126.00

CROM 58 26-11-87		
N	AN	TN
1	3.64	32.60
7	9.86	71.01
10	4.40	85.00
12	8.71	90.29
14	53.24	96.11
15	100.00	100.00
17	9.00	110.24
23	27.99	129.53
24	5.20	134.60

CROM 26 3-03-89		
N	AN	TN
1	3.47	29.03
7	16.00	66.97
10	3.96	81.82
12	4.09	89.44
14	54.00	95.48
15	100.00	100.00
17	8.30	112.07
23	50.64	129.19
24	9.40	133.63

CROM 27 3-03-89		
N	AN	TN
1	3.30	33.22
7	16.20	71.37
10	3.15	85.60
12	8.13	90.65
14	47.44	96.30
15	100.00	100.00
17	2.48	109.75
23	42.42	123.98
24	6.83	126.00

N= Formula del ester acido graso/ AN=Area normalizada/ TN=Tiempo normalizado

Klebsiella rhinoscleromatis

ANALISIS	1	7	10	12	14	15	17	23	24
26 03/03/89	3.47	16.80	3.96	4.09	54.00	100.00	8.38	50.64	9.40
27 03/03/89	5.30	16.90	3.97	4.24	54.07	100.00	8.19	51.58	9.65
52 14/10/87	5.00	18.62	2.87	9.90	53.80	100.00	2.90	55.13	4.39
54 14/10/87	6.30	15.30	5.50	8.71	51.09	100.00	3.48	55.45	5.38
56 04/11/87	3.30	16.20	3.15	8.13	47.44	100.00	2.48	42.42	6.83
58 26/11/87	3.64	9.86	4.40	8.71	53.24	100.00	9.08	27.99	5.20
$\Sigma$	27.01	93.68	23.85	43.78	313.64	600.00	34.51	283.16	40.85
$X^{-}$	4.50	15.61	3.97	7.29	52.27	100.00	5.75	47.19	6.80
R	3.00	8.76	2.63	5.81	6.63	000.00	6.60	27.51	5.26
s	1.18	3.45	1.03	2.29	2.61	000.00	2.60	10.85	2.07
V	0.26	0.22	0.25	0.31	0.04	000.00	0.54	0.23	0.30
n;u.m. 2	1.39	11.90	1.06	5.24	6.81	000.00	6.76	117.72	4.28
n;u.m. 3	0.61	5.29	0.47	2.33	3.02	000.00	3.00	52.32	1.90
n;u.m. 4	0.34	2.97	0.26	1.31	1.70	000.00	1.69	29.43	1.07
n;u.m. 5	0.22	1.90	0.17	0.83	1.08	000.00	1.08	18.83	0.68

$\Sigma$  = Sumatoria      R = Rango      V = Varianza       $X^{-}$  = Media

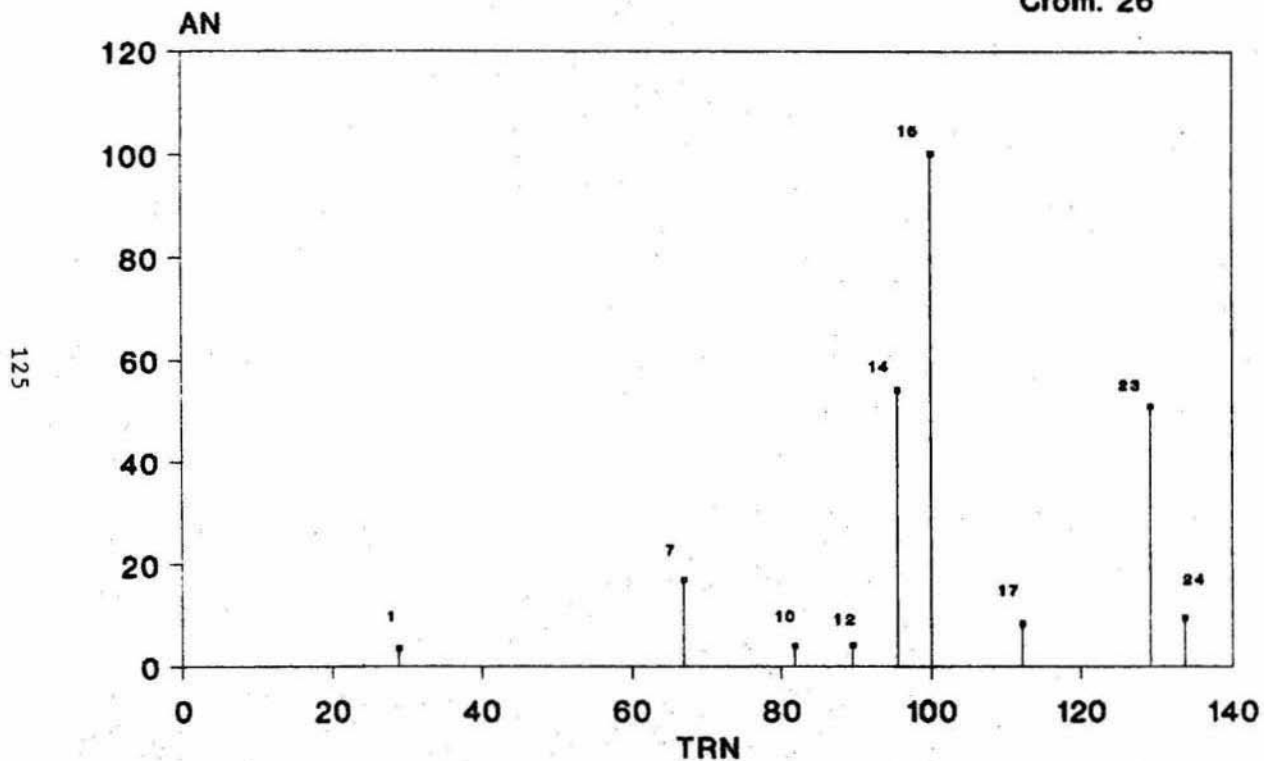
s = Desviación Estándar      n = número de repeticiones

u.m. = unidad de medición

# Cromatograma Normalizado

*Klebsiella rhinoscleromatis*

Crom. 26



TRN - TIEMPO DE RETENCION NORMALIZADO  
AN - AREA NORMALIZADA

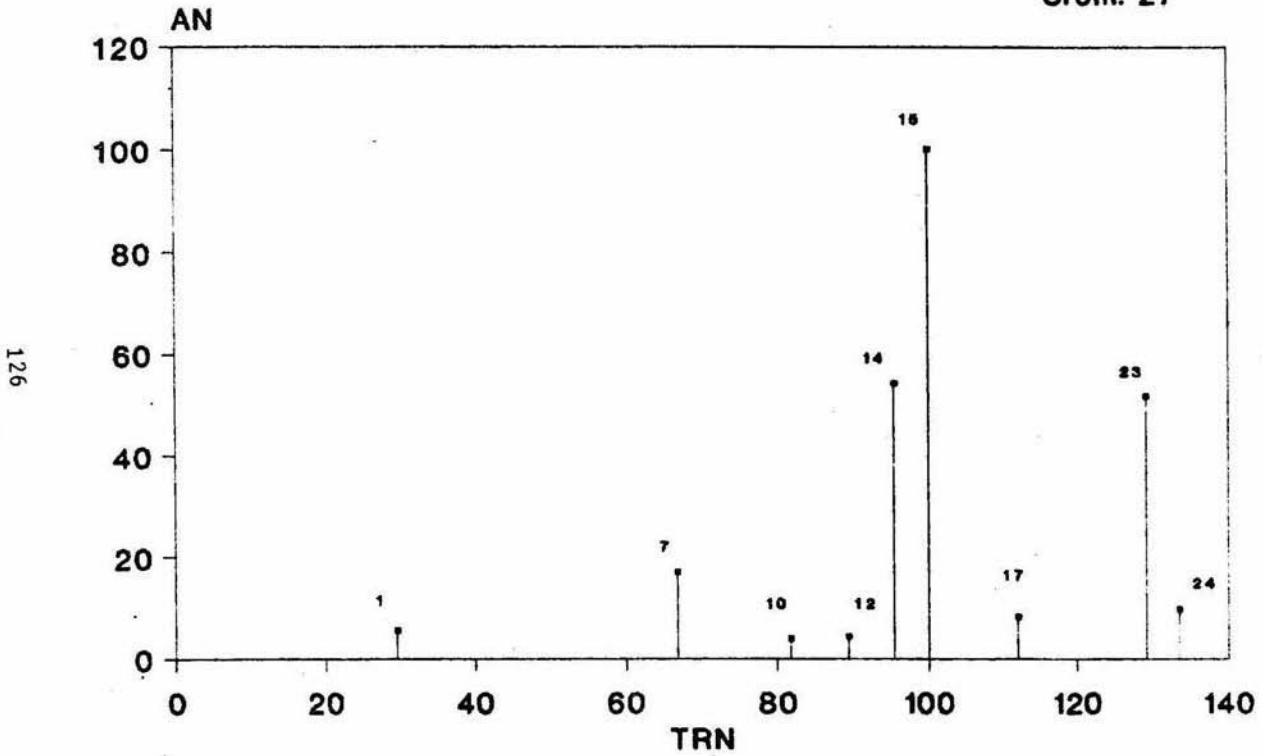
Marzo 3 1989

125

# Cromatograma Normalizado

*Klebsiella rhinoscleromatis*

Crom. 27



126

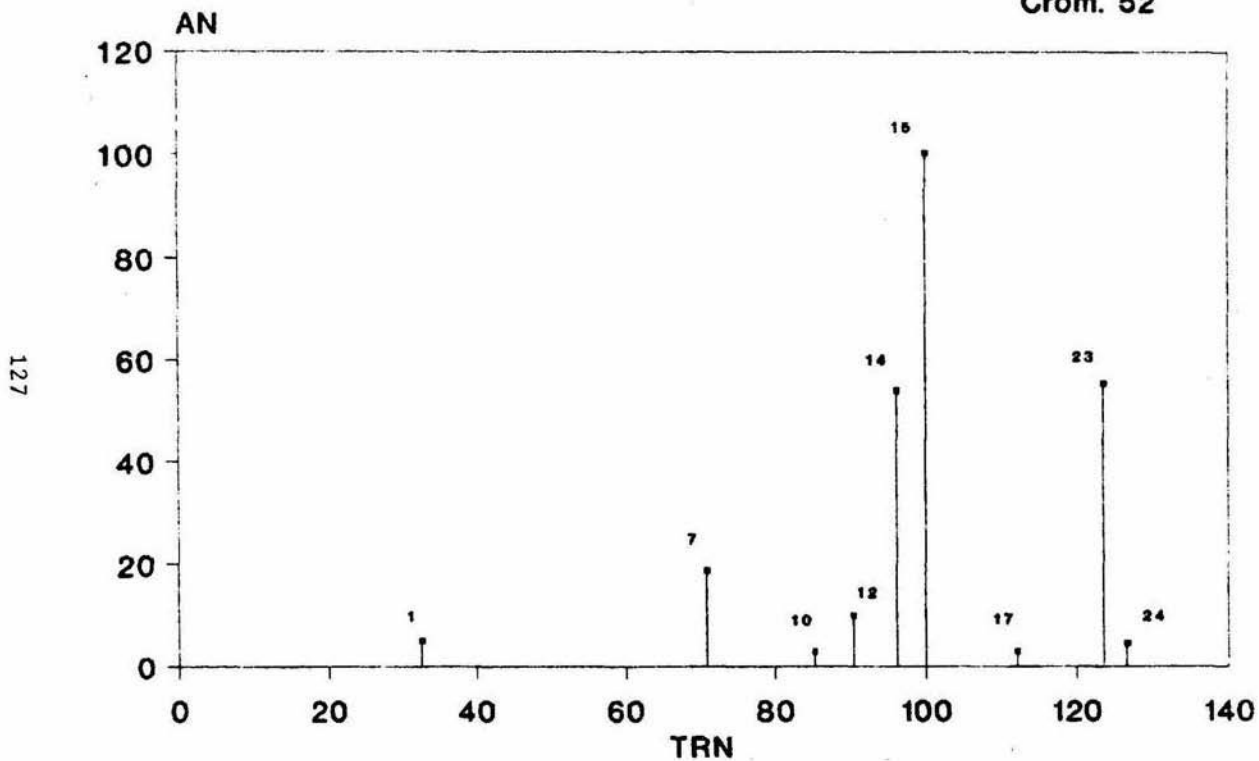
TRN - TIEMPO DE RETENCION NORMALIZADO  
AN - AREA NORMALIZADA

Marzo 3 1989

# Cromatograma Normalizado

*Klebsiella rhinoscleromatis*

Crom. 52



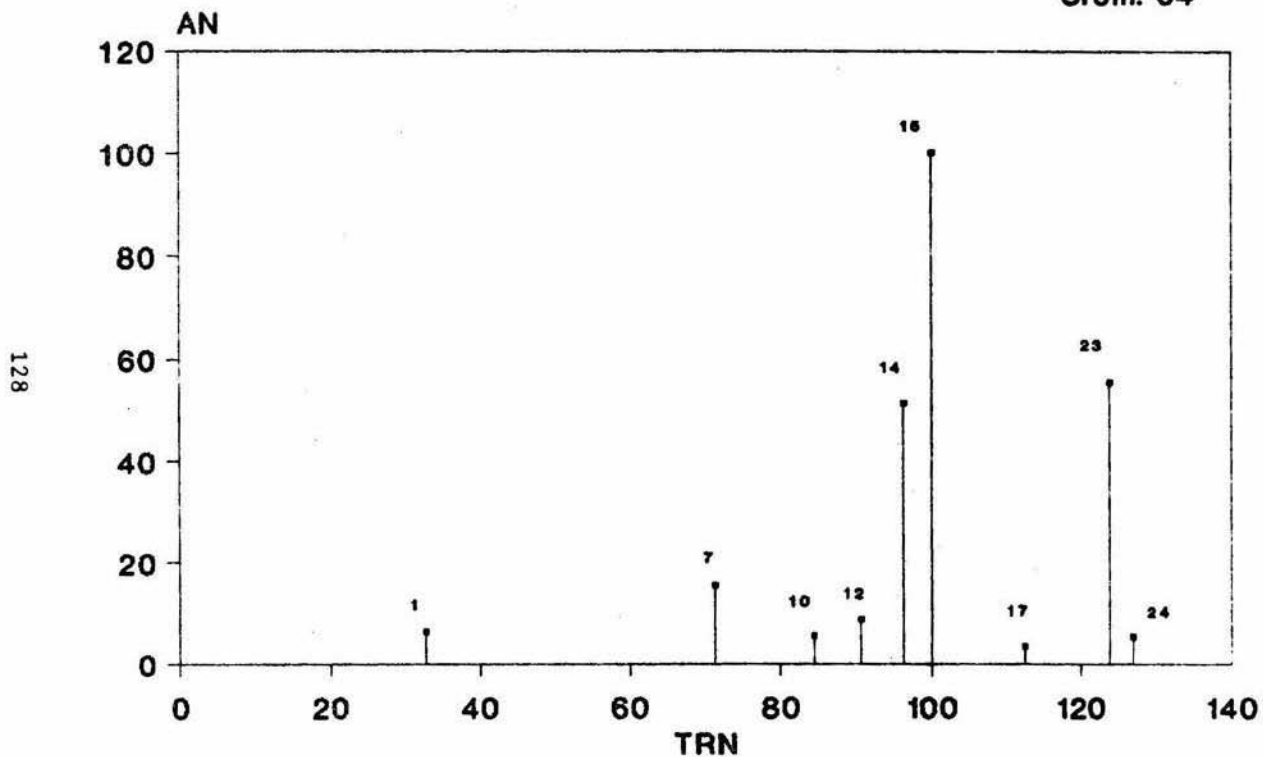
TRN - TIEMPO DE RETENCION NORMALIZADO  
AN - AREA NORMALIZADA

Oct. 14 1987

# Cromatograma Normalizado

*Klebsiella rhinoscleromatis*

Crom. 54



TRN - TIEMPO DE RETENCION NORMALIZADO  
AN - AREA NORMALIZADA

Oct. 14 1987

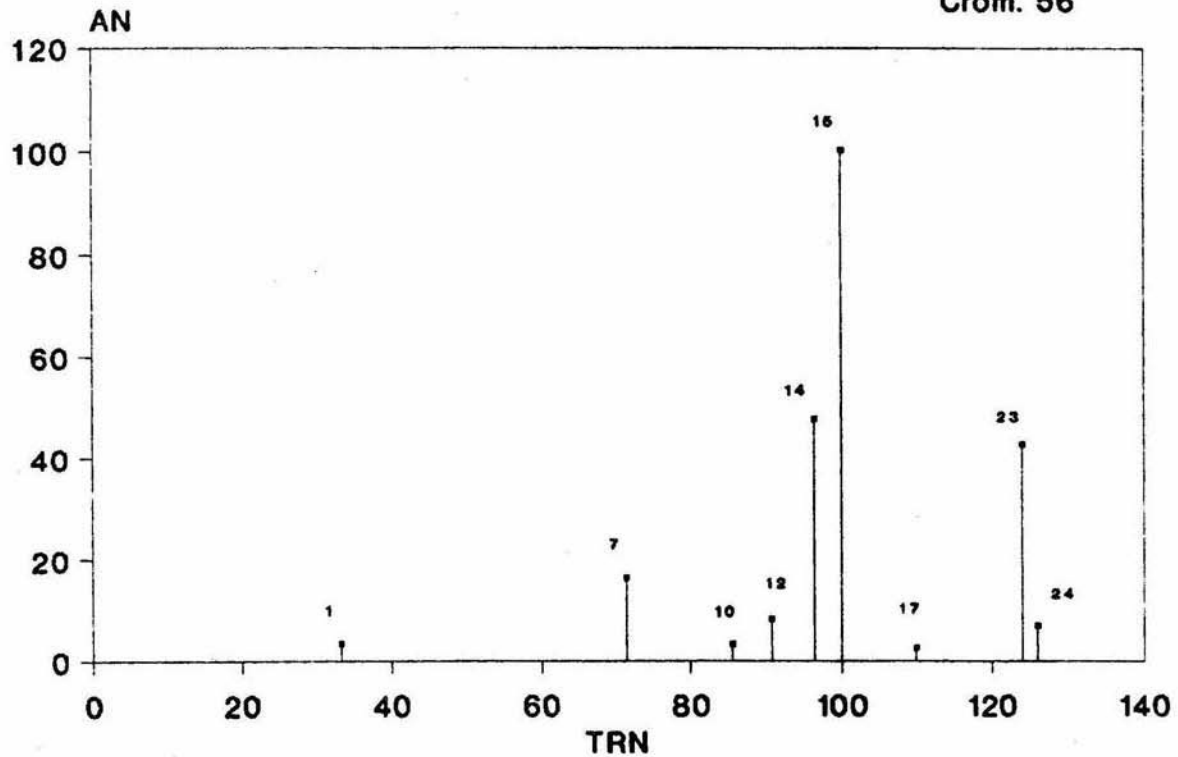


# Cromatograma Normalizado

*Klebsiella rhinoescleromatis*

Crom. 56

129



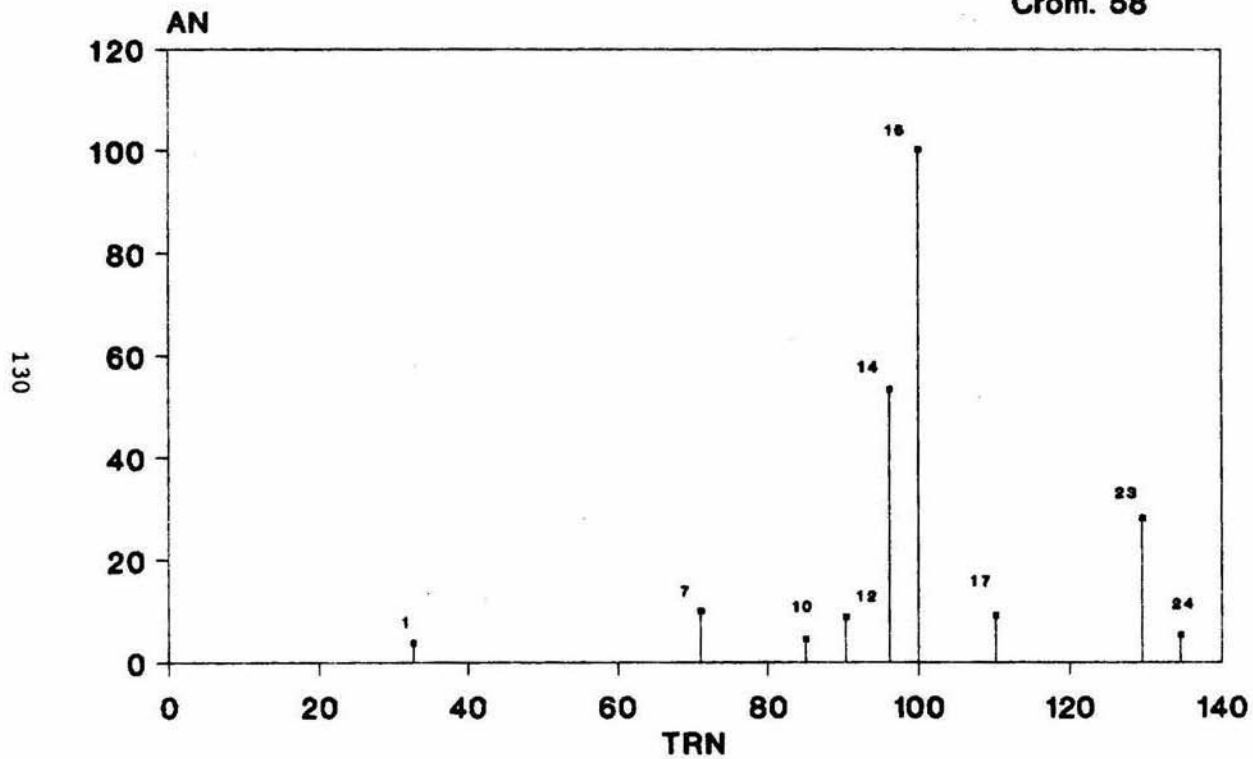
TRN - TIEMPO DE RETENCION NORMALIZADO  
AN - AREA NORMALIZADA

Nov. 4 1987

# Cromatograma Normalizado

*Klebsiella rhinoescleromatis*

Crom. 58



TRN - TIEMPO DE RETENCION NORMALIZADO  
AN - AREA NORMALIZADA

Nov.26 1987

## 9 ANALISIS DE RESULTADOS.

Durante el desarrollo de este trabajo se utilizó un estándar de Esteres Metílicos de los ácidos grasos, consistente en 27 ácidos, contra el cual se compararon los resultados proporcionados por los cromatogramas de las diferentes cepas bacterianas analizadas, obteniéndose los siguientes resultados; haciendo constar que las anotaciones dentro del paréntesis corresponden al número de carbonos del ácido y el porcentaje de éste, tomando como 100% el ácido Palmítico.

### Citrobacter amalonaticus

Presentó 11 ácidos característicos para su identificación, los cuales corresponden a los siguientes: Dodecanoato (12:0; 4%), Tetradecanoato (14:0; 20%), Pentadecanoato (15:0; 4%), 3-Hidroxitetradecanoato (3-OH 14:0; 5%), Cis-9-Hexadecanoato (16:1<sup>9</sup>; 23%), Hexadecanoato (16:0; 100%), Cis-9-10-Metilhexadecanoato (17:0<sup>^</sup>; 41%), Heptadecanoato (17:0; 2%), Cis-9-Octadecanoato (18:1<sup>9</sup>; 3%), Trans-9-Octadecanoato y Cis-11-Octadecanoato (18:1<sup>9</sup>, 18:1<sup>11</sup>; 28%) y Octadecanoato (18:0; 5%).

Citrobacter amalonaticus difiere químicamente de Enterobacter agglomerans por la presencia en esta última del Iso-13-Metil-tetradecanoato (i-15:0) y del Cis-9-10-Metiloctadecanoato (19:0<sup>^</sup>); de Enterobacter aerogenes por la presencia en Citrobacter amalonaticus del Cis-9-Octadecanoato (18:1<sup>9</sup>); de Enterobacter cloacae por la ausencia en esta del 3-Hidroxitetradecanoato (3-OH 14:0) de Escherichia coli por la presencia en esta del Undecanoato (11:0); de Citrobacter freundii por la ausencia en esta del 3-Hidroxitetradecanoato (3-OH 14:0); de Klebsiella oxytoca por la presencia en esta del Cis-9-10-Metiloctadecanoato (19:0<sup>^</sup>); de Klebsiella rhinoscleromatis por la ausencia en esta del Dodecanoato (12:0), Cis-9-10-Metilhexadecanoato (17:0<sup>^</sup>), Heptadecanoato (17:0) y Cis-9-Octadecanoato (18:1<sup>9</sup>); de Klebsiella ozaenae por la ausencia en esta del Dodecanoato (12:0), 3-Hidroxitetradecanoato (3-OH 14:0) y

y Cis-9-10-Metilhexadecanoato (17:0<sup>^</sup>) y por último de Klebsiella pneumoniae por la ausencia en esta del Trans-9-Octadecanoato y Cis-11-Octadecanoato (18:1<sup>9</sup> y 18:1<sup>11</sup>).

De acuerdo al método aplicado de la "precisión relativa" se tiene que es conveniente realizar 32 repeticiones para obtener el 100% de reproducibilidad; y para alcanzar el 80% es conveniente realizar 25 repeticiones con una "precisión deseada" de 4 u.m.

#### Citrobacter freundii

Presentó los siguientes 12 ácidos característicos en su constitución química: Undecanoato (11:0; 7%), Dodecanoato (12:0; 4%), Tetradecanoato (14:0; 13%), Pentadecanoato (15:0; 5%), Cis-9-Hexadecanoato (16:1<sup>9</sup>; 32%), Hexadecanoato (16:0; 100%), Cis-9-10-Metilhexadecanoato (17:0<sup>^</sup>; 41%), Heptadecanoato (17:0; 4%), Cis-9-Octadecanoato (18:1<sup>9</sup>; 6%), Trans-9-Octadecanoato y Cis-11-Octadecanoato (18:1<sup>9</sup> y 18:1<sup>11</sup>; 38%), Octadecanoato (18:0; 8%) y Cis-9,10-Metiloctadecanoato (19:0<sup>^</sup>; 4%).

Citrobacter freundii difiere químicamente de Escherichia coli por la ausencia en esta del Cis-9,10-Metiloctadecanoato (19:0<sup>^</sup>); de Enterobacter cloacae por la ausencia en esta del Undecanoato (11:0), Trans-9-Octadecanoato y Cis-11-Octadecanoato (18:1<sup>9</sup> y 18:1<sup>11</sup>) y Cis-9,10-Metiloctadecanoato (19:0<sup>^</sup>); de Enterobacter agglomerans por la ausencia en esta del Undecanoato (11:0), Pentadecanoato (15:0), Heptadecanoato (17:0) y Cis-9-Octadecanoato (18:1<sup>9</sup>); de Enterobacter aerogenes por la ausencia en esta del Undecanoato (11:0), Dodecanoato (12:0), Cis-9-Octadecanoato (18:1<sup>9</sup>) y Cis-9,10-Metiloctadecanoato (19:0<sup>^</sup>); de Citrobacter amaloniticus por la ausencia en esta del Undecanoato (11:0) y Cis-9,10-Metiloctadecanoato; de Klebsiella pneumoniae por la ausencia en esta del Undecanoato (11:0), Trans-9-Octadecanoato y Cis-11-Octadecanoato (18:1<sup>9</sup> y 18:1<sup>11</sup>) y Cis-9,10-Metiloctadecanoato (19:0<sup>^</sup>); de Klebsiella rhinoscleromatis por la ausen-

cia en esta del Dodecanoato (12:0), Cis-9,10-Metilhexadecanoato (17:0<sup>^</sup>), Heptadecanoato (17:0), Cis-9-Octadecanoato (18:1<sup>9</sup>) y Cis-9,10-Metiloctadecanoato (19:0<sup>^</sup>); de Klebsiella oxytoca por la ausencia en esta del Undecanoato (11:0); de Klebsiella ozaenae por la ausencia en esta del Undecanoato (11:0), Dodecanoato (12:0) Cis-9,10-Metilhexadecanoato (17:0<sup>^</sup>) y Cis-9,10-Metiloctadecanoato (19:0<sup>^</sup>).

Se estableció que el número de repeticiones convenientes para alcanzar el 100% de reproducibilidad es de 33 y para el 80% es de 26 repeticiones, con una precisión deseada de 4 u.m.

#### Enterobacter aerogenes

Presentó 9 ácidos característicos para su identificación química: Tetradecanoato (14:0; 21%), Pentadecanoato (15:0; 14%), 3-Hidroxitetradecanoato (3-OH 14:0; 8%), Cis-9-Hexadecanoato (16:1<sup>9</sup>; 35%), Hexadecanoato (16:0; 100%), Cis-9,10-Metilhexadecanoato (17:0<sup>^</sup>; 46%), Heptadecanoato (17:0; 8%), Trans-9-Octadecanoato y Cis-11-Octadecanoato (18:1<sup>9</sup> y 18:1<sup>11</sup>; 40%) y Octadecanoato (18:0; 5%).

Enterobacter aerogenes difiere químicamente de Citrobacter amalonaticus por la presencia en la primera del Dodecanoato(12:0) de Klebsiella pneumoniae por la presencia en esta del Dodecanoato (12:0), Iso-13-Metiltetradecanoato (i-15:0) y Cis-9-Octadecanoato (18:1<sup>9</sup>); de Klebsiella ozaenae por la ausencia en esta del 3-Hidroxitetradecanoato (3-OH 14:0) y Cis-9,10-Metilhexadecanoato (17:0<sup>^</sup>); de Klebsiella rhinoscleromatis por la ausencia en esta del Cis-9,10-Metilhexadecanoato (17:0<sup>^</sup>); de Klebsiella oxytoca por la presencia en esta del Dodecanoato (12:0), Cis-9-Octadecanoato (18:1<sup>9</sup>) y Cis-9,10-Metiloctadecanoato (19:0<sup>^</sup>); de Citrobacterfreundii por la ausencia en esta del 3-Hidroxitetradecanoato (3-OH 14:0); de Escherichia coli por la presencia en esta del Undecanoato (11:0), Dodecanoato (12:0) y Cis-9-Octadecanoato(18:1<sup>9</sup>)

de Enterobacter cloacae por la ausencia en esta del 3-Hidroxitetradecanoato (3-OH 14:0) y del Cis-11-Octadecanoato y Trans-9-Octadecanoato (18:1<sup>11</sup> y 18:1<sup>9</sup>) y de Enterobacter agglomerans por la ausencia en esta del Pentadecanoato (15:0) y Heptadecanoato (17:0).

Para obtener el 100% de reproducibilidad es conveniente realizar 28 repeticiones y para alcanzar el 80% es conveniente realizar 22 repeticiones con una "precisión deseada" de 4 u.m.

#### Enterobacter agglomerans

Presentó los siguientes 10 ácidos en su codificación química: Dodecanoato (12:0; 7%), Tetradecanoato (14:0; 26%), Iso-13-Metiltetradecanoato (i-15:0; 3%), 3-Hidroxitetradecanoato (3-OH 14:0; 5%), Cis-9-Hexadecanoato (16:1<sup>9</sup>; 6%), Hexadecanoato (16:0; 100%), Cis-9,10-Metilhexadecanoato (17:0<sup>^</sup>; 58%), Trans-9-Octadecanoato y Cis-11-Octadecanoato (18:1<sup>9</sup> y 18:1<sup>11</sup>; 14%), Octadecanoato (18:0; 9%) y Cis-9,10-Metiloctadecanoato (19:0<sup>^</sup>; 35%).

Enterobacter agglomerans difiere químicamente de Klebsiella ozaenae por la ausencia en esta del Dodecanoato (12:0), Iso-13-Metiltetradecanoato (i-15:0), 3-Hidroxitetradecanoato (3-OH 14:0), Cis-9,10-Metilhexadecanoato (17:0<sup>^</sup>) y Cis-9,10-Metiloctadecanoato (19:0<sup>^</sup>); de Klebsiella rhinoscleromatis por la ausencia en esta del Dodecanoato (12:0), Iso-13-Metiltetradecanoato (i-15:0), Cis-9,10-Metilhexadecanoato (17:0<sup>^</sup>) y Cis-9,10-Metiloctadecanoato (19:0<sup>^</sup>); de Enterobacter aerogenes por la ausencia en esta del Dodecanoato (12:0), Iso-13-Metiltetradecanoato (i-15:0) y Cis-9,10-Metiloctadecanoato (19:0<sup>^</sup>); de Klebsiella oxytoca por la ausencia en esta del Iso-13-Metiltetradecanoato (i-15:0); de Citrobacter amalonaticus por la presencia en esta del Pentadecanoato (15:0), Heptadecanoato (17:0) y Cis-9,10-Metiloctadecanoato (18:1<sup>9</sup>); de Klebsiella pneumoniae por la ausencia en esta del Trans-9-Octadecanoato (18:1<sup>11</sup>) y del Cis-9,10-Metiloctadecanoato (19:0<sup>^</sup>); de Citrobacter freundii por la ausencia en

esta del Iso-13-Tetradecanoato (i-15:0) y 3-Hidroxitetradecanoato (3-OH 14:0); de Escherichia coli por la ausencia en esta del Iso-13-Tetradecanoato (i-15:0) y del Cis-9,10-Metiloctadecanoato (19:0<sup>^</sup>); de Enterobacter cloacae difiere por la ausencia en esta del Iso-13-Metiltetradecanoato (i-15:0), 3-Hidroxitetradecanoato (3-OH 14:0), Cis-11-Octadecanoato y Trans-9-Octadecanoato (18:1<sup>9</sup> y 18:1<sup>11</sup>) y Cis-9,10-Metiloctadecanoato (19:0<sup>^</sup>).

Para este análisis es conveniente realizar 49 repeticiones para obtener el 100% de reproducibilidad y para obtener el 80% es conveniente realizar 39 repeticiones con una "precisión deseada" de 4 u.m.

#### Enterobacter cloacae

Presentó 9 ácidos característicos para su identificación: Dodecanoato (12:0; 2%), Tetradecanoato (14:0; 12%), Pentadecanoato (15:0; 3%), Cis-9-Hexadecanoato (16:1<sup>9</sup>; 35%), Hexadecanoato (16:0; 100%), Cis-9,10-Metilhexadecanoato (17:0<sup>^</sup>; 43%), Heptadecanoato (17:0; 4%), Cis-9-Octadecanoato (18:1<sup>9</sup>; 4%) y Octadecanoato (18:0; 7%).

Enterobacter cloacae difiere químicamente de Klebsiella ozaenae por la ausencia en esta del Dodecanoato (12:0) y Cis-9,10-Metilhexadecanoato (17:0<sup>^</sup>); de Klebsiella oxytoca por la presencia en esta del 3-Hidroxitetradecanoato (3-OH 14:0), Trans-9-Octadecanoato y Cis-11-Octadecanoato (18:1<sup>9</sup> y 18:1<sup>11</sup>) y Cis-9,10-Metiloctadecanoato (19:0<sup>^</sup>); de Enterobacter aerogenes por la ausencia en esta del Dodecanoato (12:0) y Cis-9-Octadecanoato (18:1<sup>9</sup>); de Enterobacter agglomerans por la ausencia en esta del Pentadecanoato (15:0), Heptadecanoato (17:0) y Cis-9-Octadecanoato (18:1<sup>9</sup>); de Citrobacter amalonaticus por la ausencia en esta del Cis-11-Octadecanoato y Trans-9-Octadecanoato (18:1<sup>11</sup> y 18:1<sup>9</sup>) de Klebsiella pneumoniae por la presencia en esta del Iso-13-Metiltetradecanoato (i-15:0) y 3-Hidroxitetradecanoato (3-OH 14:0);

de Citrobacter freundii por la presencia en esta del Undecanoato (11:0), Cis-11-Octadecanoato y Trans-9-Octadecanoato (18:1<sup>11</sup> y 18:1<sup>9</sup>) y Cis-9,10-Metiloctadecanoato (19:0<sup>^</sup>); de Escherichia coli por la presencia en esta del Undecanoato (11:0), 3-Hidroxite tradecanoato (3-OH 14:0) y Trans-9-Octadecanoato y Cis-11-Octadecanoato (18:1<sup>9</sup> y 18:1<sup>11</sup>); Klebsiella rhinoscleromatis por la ausencia en esta del Dodecanoato (12:0), Cis-9,10-Metilhexadecanoato (17:0<sup>^</sup>), Heptadecanoato (17:0) y Cis-9-Octadecanoato (18:1<sup>9</sup>).

Con una "precisión deseada" de 3 u.m. es conveniente realizar 49 repeticiones para obtener el 100% de reproducibilidad y 39 repeticiones para alcanzar el 80%.

#### Escherichia coli ATCC 25922

Presentó los siguientes 12 ácidos en su constitución química: Undecanoato (11:0; 3%), Dodecanoato (12:0; 5%), Tetradecanoato (14:0; 17%), Pentadecanoato (15:0; 26%), 3-Hidroxitetradecanoato (3-OH 14:0; 13%), Cis-9-Hexadecanoato (16:1<sup>9</sup>; 61%), Hexadecanoato (16:0; 100%), Cis-9,10-Metilhexadecanoato (17:0<sup>^</sup>; 18%), Heptadecanoato (17:0; 17%), Cis-9-Octadecanoato (18:1<sup>9</sup>; 5%), Trans-9-Octadecanoato y Cis-11-Octadecanoato (18:1<sup>9</sup> y 18:1<sup>11</sup>; 54%) y Octadecanoato (18:1; 7%).

Escherichia coli difiere químicamente de Klebsiella ozaenae por la ausencia en esta del Undecanoato (11:0), Dodecanoato (12:0), 3-Hidroxitetradecanoato (3-OH 14:0) y Cis-9,10-Metilhexadecanoato (17:0<sup>^</sup>); de Enterobacter cloacae por la ausencia en esta del Undecanoato (11:0), 3-Hidroxite tradecanoato (3-OH 14:0); de Enterobacter agglomerans por la ausencia en esta del Undecanoato (11:0), Pentadecanoato (15:0), Heptadecanoato (17:0) y Cis-9-Octadecanoato (18:1<sup>9</sup>); de Citrobacter freundii por la ausencia en esta del Undecanoato (11:0); de Enterobacter aerogenes por la ausencia en esta del Undecanoato (11:0), Dodecanoato (12:0) y Cis-9-Octadecanoato (18:1<sup>9</sup>); de Klebsiella pneumoniae por la ausencia en esta del Undecanoato (11:0), Dodecanoato (12:0), 3-Hidroxitetradecanoato (3-OH 14:0) y Cis-9,10-Metilhexadecanoato (17:0<sup>^</sup>).



sencia en esta del undecanoato (11:0), Trans-9-Octadecanoato y Cis-11-Octadecanoato (18:1<sup>9</sup> y 18:1<sup>11</sup>); de Klebsiella rhinoscleromatis por la ausencia en esta del Dodecanoato (12:0), Cis-9,10-Metilhexadecanoato (17:0<sup>^</sup>), Heptadecanoato (17:0) y Cis-9-Octadecanoato (18:1<sup>9</sup>), de Citrobacter freundii por la ausencia en esta del 3-Hidroxitetradecanoico (3-OH 14:0) y de Klebsiella oxytoca por la ausencia del Undecanoato (11:0).

Para alcanzar el 100% de reproducibilidad es conveniente realizar 35 repeticiones y para alcanzar el 80% es conveniente realizar 28 repeticiones con una "precisión deseada" de 2u.m..

#### Klebsiella oxytoca

Presentó los siguientes 12 ácidos necesarios para su identificación: Dodecanoato (12:0; 2%), Tetradecanoato (14:0; 13%), Pentadecanoato (15:0; 15%), 3-Hidroxitetradecanoato (3-OH 14:0; 3%), Cis-9-Hexadecanoato (16:1<sup>9</sup>; 19%), Hexadecanoato (16:0; 100%), Cis-9,10-Metilhexadecanoato (17:0<sup>^</sup>; 59%), Heptadecanoato (17:0; 12%), Cis-9-Octadecanoato (18:1<sup>9</sup>; 5%), Trans-9-Octadecanoato y Cis-11-Octadecanoato (18:1<sup>9</sup> y 18:1<sup>11</sup>; 51%), Octadecanoato (18:0; 9%) y Cis-9,10-Metiloctadecanoato (19:0<sup>^</sup>; 7%).

Klebsiella oxytoca difiere químicamente de Escherichia coli por la ausencia en esta del Cis-9,10-Metiloctadecanoato (19:0<sup>^</sup>); de Citrobacter freundii por la ausencia en esta 3-Hidroxitetradecanoato (3-OH 14:0), de Klebsiella rhinoscleromatis por la ausencia en esta del Dodecanoato (12:0), Cis-9,10-Metilhexadecanoato (17:0<sup>^</sup>), Heptadecanoato (17:0), Cis-9-Octadecanoato (18:1<sup>9</sup>) y del Cis-9,10-Metiloctadecanoato (19:0<sup>^</sup>); de Klebsiella pneumoniae por la ausencia en esta del Trans-9-Octadecanoato y Cis-11-Octadecanoato (18:1<sup>9</sup> y 18:1<sup>11</sup>) y Cis-9,10-Metiloctadecanoato (19:0<sup>^</sup>); de Citrobacter amalonaticus por la ausencia en esta del Cis-9,10-Metiloctadecanoico (19:0<sup>^</sup>); de Enterobacter

aerogenes por la ausencia en esta del Dodecanoato (12:0), Cis-9-Octadecanoato (18:1<sup>9</sup>) y del Cis-9,10-Metiloctadecanoato (19:0<sup>^</sup>); de Enterobacter agglomerans por la ausencia en esta del Pentadecanoato (15:0), Heptadecanoato (17:0) y del Cis-9-Octadecanoato (18:1<sup>9</sup>), de Enterobacter cloacae por la ausencia en esta del 3-Hidroxitetradecanoato (3-OH 14:0), Cis-11-Octadecanoato y Trans-9-Octadecanoato (18:1<sup>11</sup> y 18:1<sup>9</sup>) y Cis-9,10-Metiloctadecanoato (19:0<sup>^</sup>) y de Klebsiella ozaenae por la ausencia en esta del Dodecanoato (12:0), 3-Hidroxitetradecanoato (3-OH 14:0), Cis-9,10-Metilhexadecanoato (17:0<sup>^</sup>) y Cis-9,10-Metiloctadecanoato (19:0<sup>^</sup>).

Con una "precisión deseada" de 2 u.m. es conveniente realizar 33 repeticiones para alcanzar el 100% de reproducibilidad y para alcanzar el 80% es conveniente realizar 26 repeticiones.

#### Klebsiella ozaenae

Presentó los siguientes 8 ácidos necesarios para su identificación: Tetradecanoato (14:0; 17%), Pentadecanoato (15:0; 8%), Cis-9-Hexadecanoato (16:1<sup>9</sup>; 34%), Hexadecanoato (16:0; 100%), Heptadecanoato (17:0; 6%), Cis-9-Octadecanoato (18:1<sup>9</sup>; 11%), Trans-9-Octadecanoato y Cis-11-Octadecanoato (18:1<sup>9</sup> y 18:1<sup>11</sup>; 35%) y Octadecanoato (18:0; 23%).

Klebsiella ozaenae difiere químicamente de Klebsiella oxytoca por la presencia en esta del Dodecanoato (12:0), 3-Hidroxitetradecanoato (3-OH 14:0), Cis-9,10-Metilhexadecanoato (17:0<sup>^</sup>) y del Cis-9,10-Metiloctadecanoato (19:0<sup>^</sup>); de Citrobacter freundii por la ausencia en esta del Undecanoato (11:0), Dodecanoato (12:0), Cis-9,10-Metilhexadecanoato (17:0<sup>^</sup>) y Cis-9,10-Metiloctadecanoato (19:0<sup>^</sup>); de Klebsiella rhinoscleromatis por la ausencia en esta del Heptadecanoato (17:0) y del Cis-9-Octadecanoato (18:1<sup>9</sup>); de Klebsiella pneumoniae por la ausencia

en esta del Cis-11-Octadecanoato y Trans-9-Octadecanoato (18:1<sup>9</sup> y 18:1<sup>11</sup>); de Citrobacter amalonaticus por la presencia en esta del Dodecanoato (12:0), 3-Hidroxitetradecanoato (3-OH 14:0) y del Cis-9,10-Metilhexadecanoato (17:0<sup>^</sup>); de Enterobacter aerogenes por la ausencia en esta del Cis-9-Octadecanoato (18:1<sup>9</sup>); de Enterobacter agglomerans por la ausencia en esta del Heptadecanoato (17:0) y del Cis-9-Octadecanoato (18:1<sup>9</sup>); de Enterobacter cloacae por la ausencia en esta del Trans-9-Octadecanoato y Cis-11-Octadecanoato (18:1<sup>9</sup> y 18:1<sup>11</sup>) y de Escherichia coli por la presencia en esta del Undecanoato (11:0), Dodecanoato (12:0), 3-Hidroxitetradecanoato (3-OH 14:0) y Cis-9,10-Metilhexadecanoato (17:0<sup>^</sup>).

Para alcanzar el 100% de reproducibilidad es conveniente realizar 52 repeticiones y para alcanzar el 80% es conveniente realizar 42 repeticiones con una "precisión deseada" de 5 u.m.

Klebsiella pneumoniae ATCC 10031

Presentó los siguientes 11 ácidos característicos para su identificación: Dodecanoato (12:0; 8%), Tetradecanoato (14:0; 31%), Iso-13-Metiltetradecanoato (i-15:0; 7%), Pentadecanoato (15:0; 9%), Cis-9-Hexadecanoato (16:1<sup>9</sup>; 32%), Hexadecanoato (16:0; 100%), Cis-9,10-Metilhexadecanoato (17:0<sup>^</sup>; 32%), Heptadecanoato (17:0; 8%), Cis-9-Octadecanoato (18:1<sup>9</sup>; 9%) y Octadecanoato (18:0; 11%).

Klebsiella pneumoniae difiere químicamente de Enterobacter agglomerans por la ausencia en esta del Pentadecanoato (15:0), Heptadecanoato (17:0) y Cis-9-Octadecanoato (18:1<sup>9</sup>); de Enterobacter cloacae por la ausencia en esta del Iso-13-Metiltetradecanoato (i-15:0) y del 3-Hidroxitetradecanoato (3-OH 14:0); de Citrobacter freundii por la ausencia en esta del Iso-13-Metiltetradecanoato (i-15:0) y del 3-Hidroxitetradecanoato (3-OH 14:0); de Escherichia coli por la ausencia en esta del Iso-13-Metilte -

tridecanoato (i-15:0); de Citrobacter amalonaticus por la ausencia en esta del Iso-13-Metiltetradecanoato (i-15:0); de Enterobacter aerogenes por la ausencia en esta del Dodecanoato (12:0), Iso-13-Metiltetradecanoato (i-15:0) y Cis-9-Octadecanoato (18:1<sup>9</sup>); de Klebsiella oxytoca por la ausencia en esta del Iso-13-Metiltetradecanoato (i-15:0); de Klebsiella rhinoscleromatis por la ausencia en esta del Dodecanoato (12:0), Iso-13-Metiltetradecanoato (i-15:0), Cis-9-Metilhexadecanoato (17:0<sup>^</sup>), Heptadecanoato (17:0) y Cis-9-Octadecanoato (18:1<sup>9</sup>); de Klebsiella ozaenae por la ausencia en esta del Dodecanoato (12:0), Iso-13-Metiltetradecanoato (i-15:0), 3-Hidroxitetradecanoato (3-OH 14:0) y Cis-9,10-Metilhexadecanoato (17:0<sup>^</sup>).

Con una "precisión deseada" de 4 u.m. es conveniente realizar 47 repeticiones para alcanzar el 100% de reproducibilidad y 37 repeticiones para alcanzar el 80%.

#### Klebsiella rhinoscleromatis

Presentó 9 ácidos característicos para su identificación: Undecanoato (11:0; 4%), Tetradecanoato (14:0; 15%), Pentadecanoato (15:0; 4%), 3-Hidroxitetradecanoato (3-OH 14:0; 7%), Cis-9-Hexadecanoato (16:1<sup>9</sup>; 52%), Hexadecanoato (16:0; 100%), Anteiso-14-Metilhexadecanoato (a-17:0; 6%), Trans-9-Octadecanoato y Cis-11-Octadecanoato (18:1<sup>9</sup> y 18:1<sup>11</sup>; 47%) y Octadecanoato (18:0; 7%).

Klebsiella rhinoscleromatis difiere químicamente de Enterobacter cloacae por la ausencia en esta del Undecanoato (11:0), 3-Hidroxitetradecanoato (3-OH 14:0), Anteiso-14-Metilhexadecanoato (a-17:0), Trans-9-Octadecanoato y Cis-11-Octadecanoato (18:1<sup>9</sup> y 18:1<sup>11</sup>); de Escherichia coli por la ausencia en esta del Anteiso-17-Metilhexadecanoato (a-17:0); de Citrobacter freundii por

la ausencia en esta del 3-Hidroxitetradecanoato (3-OH 14:0) y Anteiso-14-Metilhexadecanoato (a-17:0); de Klebsiella pneumoniae por la ausencia en esta del Undecanoato (11:0), Anteiso-14-Metilhexadecanoato (a-17:0), Cis-11-Octadecanoato y Trans-9-Octadecanoato (18:1<sup>11</sup> y 18:1<sup>9</sup>); de Citrobacter amalonaticus por la ausencia en esta del Undecanoato (11:0) y Anteiso-14-Metilhexadecanoato (a-17:0); de Enterobacter aerogenes por la ausencia en esta del Undecanoato (11:0) y el Anteiso-14-Metilhexadecanoato (a-17:0); de Enterobacter agglomerans por la ausencia en esta del Undecanoato (11:0) y el Anteiso-14-Metilhexadecanoato (a-17:0); de Klebsiella oxytoca por la ausencia en esta del Undecanoato (11:0) y del Anteiso-14-Metilhexadecanoato (a-17:0) y por último de Klebsiella ozaenae por la ausencia en esta del Undecanoato (11:0), 3-Hidroxitetradecanoato (3-OH 14:0) y el Anteiso-14-Metilhexadecanoato (a-17:0).

Para obtener el 100% de reproducibilidad es conveniente realizar 52 repeticiones y para obtener el 80% es conveniente realizar 42 repeticiones con una "precisión deseada" de 3 u.m.

El tratamiento estadístico utilizado para el análisis de todas las cepas, nos da un intervalo de confianza del 95% (Kramer y Twigg, 1970).

## 10 CONCLUSIONES.

El presente estudio ha dado la pauta para desarrollar esta técnica cromatográfica, como una técnica rápida y precisa.

Analizados los resultados arrojados por esta metodología, se aprecia de una manera muy clara la diferente composición química existente entre las cepas bacterianas estudiadas, afirmando de manera categórica que cada microorganismo posee su propia "huella química" que la hace diferente a los demás microorganismos de su reino, de esta manera se puede establecer el contenido de ácidos grasos como perfil taxonómico, para la identificación de Enterobacterias.

Es importante tomar en cuenta que para mantener una reproducibilidad alta en los resultados, se debe de considerar la temperatura de crecimiento (Mc Garrity y Armstrong, 1981; Kaneda, 1972), el tiempo de incubación y los recursos en forma de carbohidratos y aminoácidos (O'Donnell et al, 1985; Kaneda, 1971; Ielleva y Bragintseva, 1984).

Estandarizando estas variables podemos esperar resultados confiables y precisos. Siempre con la alteración de alguno de estos factores se presentarán resultados erróneos, pues varía de forma considerable la concentración de un ácido ó ácidos. También es importante mantener las siguientes condiciones de análisis cromatográfico constantes: flujo de gas acarreador, las temperaturas de inyector y detector, el programa de temperatura del horno, la velocidad de papel y el volumen de muestra inyectado.

Se deben de considerar las repeticiones necesarias para cada cepa analizada, tomando los resultados proporcionados por el-

"Método de la Precisión Relativa" en este trabajo y poder establecer en próximos estudios un banco de datos más completo y preciso.

Las cepas pueden liofilizarse y mantenerse almacenadas sin alterar su constitución química (Kuplestaya, 1985).

El desarrollo para la estandarización de esta técnica ha dado los resultados esperados, así aseguramos que las bases en las que se fundamenta esta metodología son sólidas y sirven como firme precursor para análisis posteriores.

## 11 ALTERNATIVAS PARA EL EMPLEO DE ESTA METODOLOGIA.

El campo donde se puede desarrollar esta metodología es tan amplio como el interesado quiera realizarlo, tomando en cuenta los recursos económicos con que se cuenten.

Por mencionar solo dos áreas de gran importancia, como son la clínica y la alimenticia, en donde por ejemplo Pseudomona aeruginosa acarrea graves problemas de salud; esta relacionada con infecciones de Otitis Externa, que afecta en un número muy alto a nadadores, sin que el cloro que se adiciona como desinfectante logre eliminarla, debido a la resistencia que ha adquirido contra este y otros desinfectantes (Seyfried y Cook, 1984; Seyfried y Fraser, 1980). También ha sido aislada de pacientes con fibrosis quística, encontrándose esta bacteria relacionada con otros microorganismos como Streptococcus sanguis y Streptococcus mitis (Komiya et al, 1986; Komiya et al; 1987).

Pasando a la industria alimenticia suele encontrarse Pseudomona aeruginosa en refrescos embotellados (Hernández y Duquino, 1986).

Las infecciones por estafilococos también revisten gran importancia sanitaria, debido a que estos se encuentran en el ambiente y afectan directamente a humanos y animales (Brown et al, 1984).

La aplicación de esta técnica ayudaría a identificar rápidamente microorganismos causantes de infecciones; contaminación de alimentos, fármacos, cosméticos, etc., además de que se puede dirigir el estudio a los hongos, en donde se analizan los ácidos grasos del micelio y conidios (Evans et al, 1986).



## 12 BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Abel, K., Schmertzing, H. & Paterson, J. J. (1963) Classification of Microorganisms by Analysis of Chemical Composition. I Feasibility of Utilizing Gas Chromatography. *Journal of Bacteriology*. 85( ): 1014 - 1039.
- 2.- Alshamaony, L., Goodfellow, M., Minnikin, D. E., Bowden, H. & Hardie, M. J. (1977) Fatty and Mycolic Acid Composition of Bacterionema matruchotti and Related Organisms. *Journal of General Microbiology*. 98( ): 205 - 213.
- 3.- Alvin, Ch., Larsson, L., Magnusson, M., Mardh, P. A., Odham G. & Westerdahl, G. (1983) Determination of Fatty Acids and Carbohydrate Monomers in Microorganisms by Means of Glass Capillary Gas Chromatography: Analysis of Mycobacterium gordonae and Mycobacterium scrofulaceum. *Journal of General Microbiology*. 129( ): 401 - 405.
- 4.- Amstein, F. Ch. & Hartman, A.P. (1973) Differentiation of some Enterococci by Gas Chromatography. *Journal of Bacteriology*. 113 (1): 38 - 41.
- 5.- Athayle, M., Noble, W. C., Mallet, A. I. & Minnikin, D. E. (1984) Gas Chromatography - Mass Spectrometry of Mycolic Acids as a Tool in the Identification of Medically Important Coryneform Bacteria. *Journal of General Microbiology* 129( ): 375 - 394.
- 6.- Austen, R. A. & Trust, T. J. (1981) Plasmid Specification of resistance to Antibacterial compounds in Environmental Citrobacter freundii. *Canadian Journal of Microbiology* 27( ): 343 - 349.
- 7.- Bae, B. H. C. (1981) Enteric Group 15 (Enterobacteriaceae) associated with pneumonia. *Journal of Clinical Microbiology* 1(5): 596 - 597.

- 8.- Boe, B. & Gjerde, J. (1980) Fatty Acids Patterns in the Classification of some Representatives of the Families Enterobacteriaceae and Vibrionaceae. *Journal of General Microbiology*. 116( ): 41 - 49.
- 9.- Bousfield, J. I., Smith, L. S., Danelo, R.T. & Hobbs, G. (1983) Numerical Analysis of Total Fatty Acid Profiles in the Identification on Coryneform, Nocardiform and some other Bacteria. *Journal of General Microbiology*. 129( ): 375 - 394.
- 10.- Brown, E. N., Seyfried, P. L., Brian, H. S., Hum, S. N. & Desjardins, M. R. (1984) Aquatic and Clinical Staphylococcal Characterization and Associated Antibiotic, Heavy Metal and Chlorine Sensitivities. *Canadian Journal of Public Health*. 75( ): 32 - 42.
- 11.- Brown, W. H. (1978) Introduction to Organic and Biochemistry. Second Edition. Willard Grant Press. U.S.A.
- 12.- Brown, W. H. (1978) Introduction to Organic Chemistry. Second Edition. Wodsworth Student Edition. U.S.A.
- 13.- Brooks, J. B., Moss, W. C. & Dowell, V. R. (1969) Differentiation Between Clostridium sordelii and Clostridium bifermentans by Gas Chromatography. *Journal of Bacteriology*. 100(1): 528 - 530.
- 14.- Brooks, J. B., Kellogg, D. S., Thacker, L. & Turner, E. M. (1971) Analysis by Gas Chromatography of Fatty Acids Found in Whole Cultural Extracts of Neisseria Species. *Canadian Journal of Microbiology*. 17( ): 537 - 543.
- 15.- Burrows, W. (1974) Tratado de Microbiología. Vigésima Edición. Nueva Editorial Interamericana. México. pg. 415.
- 16.- Burchfield, P. H. & Storrs, E. E. (1970) Biochemical Applications of Gas Chromatography. Academic Press. U.S.A.

- 17.- Cecchini, G. L. & O'Brien, R. T. (1968) Detection of Escherichia coli by Gas Chromatography. *Journal of Bacteriology*. 95(3): 1205 - 1206.
- 18.- Cho, K. Y. & Salton, M. R. (1966) Fatty Acid Composition of Bacterial Membrane and Wall Lipids. *Biochemica Et Biophysica Acta*. 116( ): 73 - 79.
- 19.- Christie, W. W. (1982) *Lipid Analysis*. Second Edition. Pergamon Press. England.
- 20.- Clark, A. J., Burger, A. C. & Sabatinos, E. L. (1982) Characterization of Indicator Bacteria in Municipal Raw Water, Drinking Water and New Main Water Samples. *Canadian Journal Microbiology*. 28( ): 1002 - 1013.
- 21.- Dabrio, M. V. (1973) *Cromatografía de Gases II*. Primera Edición. Ed. Alhambra. España.
- 22.- Dees, B. J., Hollis, D. G., Weaver, R. E. & Moss, W. C. (1981) Cellular Fatty Acids of Brucella canis and Brucella suis. *Journal of Clinical Microbiology*. 14(1): 111 - 112.
- 23.- Dees, B. J., Powell, J., Moss, W. C., Hollis, D. G. & Weaver, R. E. (1981) Cellular Fatty Acid Composition of Organisms Frequently Associated With Human Infections Resulting from Dog Bites: Pasteurella multocida and Groups EF-4, 11-J, M-5 and DF-2. *Journal of Clinical Microbiology*. 14(6): 612 - 616.
- 24.- Dees, B. J., Karr, D. E., Hollis, D. G. & Moos, W. C. (1982) Cellular Fatty Acids of Capnocytophaga Species. *Journal of Clinical Microbiology*. 16(5): 779 - 783.
- 25.- De Simón Serra, M., Ferrer, E. D., Pericos, B. E. & Fernández, P. F. (1986) Study of Microbiological Contamination of Cacao derived and Products. *Annals Bromatology*. 37(2): 341 - 349.

- 26.- Domenico, P., Diedrich, D. L. & Straus, D. C. (1985) Extracellular Polysaccharide Production by Klebsiella pneumoniae and its Relationship to Virulence. Canadian Journal Microbiology. 31( ): 472 - 478.
- 27.- Drucker, B. D. & Veazey, J. F. (1977) Fatty Acids Fingerprints of Streptococcus mutans NCTC 10832 Grown at various Temperatures. Applied and Environmental Microbiology. 33(2): 221 - 226.
- 28.- Evans, J. L., Moclock, M. A. & Gealt, M. A. (1986) The Fatty Acids Composition of the Conidia and Mycelia of the Fungus Aspergillus nidulans. Canadian Journal Microbiology 32( ): 179 - 181.
- 29.- Fontaine, A. E., Bryant, N. T., Taylor-Robinson, D., Borrielo, P. S. & Davies, A. H. (1986) A Numerical Taxonomic Study of Anaerobic Gram-Negative Bacilli Classified as Bacteroides ureolyticus Isolated from Patients with Non Gonococcal Urethritis. Journal of General Microbiology 132( ): 3137 - 3146.
- 30.- Gas Chromatography ( ) Handbook of Chromatography. U.S.A. pg. 7 - 23.
- 31.- Geldreich, E. E. (1972) Water Pollution Microbiology. John Wiley and Sons. Inc. U.S.A. pg. 207 - 221.
- 32.- Glass, R. L. (1971) Alkohlisis, Saponification and Preparation of Fatty Acids Methyl Esters. Lipids. 6( ): 919.
- 33.- González, A. M. (1987) Fundamentos Teóricos y Principios de la Cromatografía en Fase de Vapor. Proyecto de Conservación y Mejoramiento del Ambiente (CyMA). ENEP IZTACALA. UNAM. México.
- 34.- Gottschalk, G. (1979) Bacterial Metabolism. Springer-Verlog Edition. U.S.A.

- 35.- Guarino, A., Capano, G., Malamisura, B., Allesio, M. & Guanlaeim, S. (1987) Production of Escherichia coli Sta - Like Heast - Stable Enterotoxin by Citrobacter freundii Isolated from Humans. Journal Clinical of Microbiology. 25(1): 110 - 114.
- 36.- Häusler, J. & Richter, V. (1983) A Process of Identification Microorganisms Using Chromatography. UK Patent Appli cation GB. 2 121 434 A.
- 37.- Häusler, J. & Richter a, V. (1985) Identification of Bac- teria of the Family Enterobacteriaceae by Gas Chromatogra- phy. Separatum. Publishing House of the Hungarian Academy of Sciences. pg. 179 - 183.
- 38.- Häusler, J. & Richter b, V. (1985) Vyzkum Novych Metod Identifikase Mikroorjanismu. Vyzkumny Ustav Vodohospodar- sky. Praha, Czechoslovakia.
- 39.- Häusler, J. & Richter, V. (1987) Identification of Indica- tors of Fecal Pollution by Enterobacteriaceae. V Curso Simposio Internacional sobre Biología de la Contaminación UNAM, ENEP IZTACALA, SEDUE, UPN. México.
- 40.- Häusler, J. & Richter, V. (1987) Identification of Pseudo- monads Isolated from Water by Gas Chromatography. V Curso Simposio Internacional sobre Biología de la Contaminación UNAM, ENEP IZTACALA, SEDUE, UPN. México.
- 41.- Hofstad, T. & Jantzen, E. (1982) Fatty Acids of Leptotrichia buccalis: Taxonomic Implications. Journal of General Microbiology. 128( ): 151 - 153.
- 42.- Hernández, D. Q. & Rosenberg, F. A. (1987) Antibiotic- Resistant in Bottled Drinking Water. Canadian Journal of Microbiology. 33( ): 286 - 289.

- 43.- Holum, J. R. (1978) Organic and Biological Chemistry. John Wiley and Sons. Inc. U.S.A.
- 44.- Ieleva, N. R. & Bragintseva, L. M. (1984) Composition of the Lipids in Fusarium sambucinum Grown in a Fermenter on Media with various Sources of Carbon. Mikrobiologiya. 53(4): 628 - 632.
- 45.- Kabat, A. E. & Mayer, M. M. (1968) Inmunoquímica Experimental. La Prensa Médica Mexicana. México. pg. 694 - 696.
- 46.- Kaneda, T. (1962) Biosynthesis of Branched Chain Fatty Acids: Isolation and Identification of Fatty Acids from Bacillus subtilis ATCC 7059. The Journal of Biological Chemistry. 238(4): 1222 - 1228.
- 47.- Kaneda, T. (1971) Factors Affecting the Relative Ratio of Fatty Acids in Bacillus cereus. Canadian Journal of Microbiology. 17( ): 269 - 275.
- 48.- Kaneda, T. (1972) Positional Preference of Fatty Acids in Phospholipids of Bacillus cereus and its Relation to Growth Temperature. Biochimica Et Biophysica Acta. 280( ): 297 - 305.
- 49.- Komiyama, K., Habbick, B. F., Martin, T. & Tumber, S. K. (1987) Characterization by Pyocine and Serotyping of Oral and Sputum Strains of Pseudomonas aeruginosa Isolated from Cystic Fibrosis Patients. Canadian Journal of Microbiology. 33( ): 221 - 225.
- 50.- Komiyama. K., Habbick, B. F. & Gibbons, R. J. (1986) Interbacterial Adhesion Between Pseudomonas aeruginosa and Indigenous Oral Bacteria Isolated from Patients with Cystic Fibrosis. Canadian Journal of Microbiology. 33( ): 27 - 32.

- 51.- Kramer, T. & Nickerson, W. K. (1984) Prevalence of Extreme detergent Resistance Among the Enterobacteriaceae. Canadian Journal of Microbiology. 30( ): 711 - 713.
- 52.- Kramer, A. & Twigg, B. O. (1970) Quality Control for the Food Industry. Third Edition. Vol 1. AVI Edition. U.S.A. pg. 165 - 457.
- 53.- Kupletskaya, M. B. (1985) Results of Storing Lyophilized Cultures of Microorganisms. Mikrobiologiya. 56(3): 628 - 632.
- 54.- Lapage, S. P., Rowe, B., Holmes, B. & Gross, R. J. (1979) Biochemical Identification of Enterobacteriaceae. Edit. by Skinner, F. A. & Lovelock, D. W. in Identification for Microbiologist. Academic Press Inc. London. pg. 123 - 141
- 55.- Lehninger, A. L. (1979) Bioquímica. Segunda Edición. Editorial Omega. España.
- 56.- Lorraine, S. A. (1980) Fundamentos de Microbiología. Editorial EUNSA. España. pg. 449.
- 57.- Mc Garrity, T. J. & Armstrong, B. J. (1981) The Effect of Temperature and other Growth Conditions on the Fatty Acid Composition of Escherichia coli. Canadian Journal of Microbiology. 27( ): 835 - 840.
- 58.- Mc Nair, H. M. & Bonelli, E. J. (1968) Basic Gas Chromatography. Varian Co. Consolidated Printers, Berkeley, California U.S.A. pg. 123 - 125.
- 58.- Minnikin, D. E., Dobson, G. & Droper, P. (1985) The Free-Lipids of Mycobacterium leprae Harvested from Experimentally Infected Nine-Banded Armadillos. Journal of General Microbiology. 131( ): 2007 - 2011.
- 59.- Minnikin, D. E., Dobson, G., Goodfellow, M., Droper, P. & Magnusson, N. (1985) Quantitative Comparison of the Mycolic and Fatty Acid Compositions of Mycobacterium leprae

- and Mycobacterium gordonae. Journal of General Microbiology. 131( ): 2013 - 2021.
- 60.- Monson, S. R. & Shelton, C. F. (1974) Fundamentals of Organic Chemistry. Mc Graw Hill. Kogakusha, Japan. pg. 300.
- 61.- Morbes, S. et al. (1977) Rate of Microbial Transformation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: A Chromatographic Procedure. Applied and Environmental Microbiology. 34(2): 244 - 246.
- 62.- Moss, W. C. & Dunkelberg, W. E. (1969) Volatile and Cellular Fatty Acids of Haemophilus vaginalis. Journal of Bacteriology. 100(1): 544 - 546.
- 63.- Murray, A. K., Clemens, H. C. & Keas, E. S. (1981) Klebsiella ozaenae Septicemia Associated with Hansen's Disease. Journal of Clinical Microbiology. 14(6): 703 - 705.
- 64.- O'Donell, G., Nahale, R. H., Goodfellow, M., Minnikin, D. E. & Hajek, V. (1985) Numerical Analysis of Fatty Acid Profiles in the Identification of Staphylococci. Journal of General Microbiology. 131( ): 2023 - 2033.
- 65.- O'Leary, W. W. (1962) The Fatty Acids of Bacteria. Journal of Bacteriology. 26( ): 421 - 447.
- 66.- Osipov, A. G., Shabanova, A. E., Morozov, V. O., El'-Registon, P. G., Koslova, N. A. & Zhilina, N. T. (1984) Lipids of Methanosarcina Vacuolata and Methanococcus halophilus. Mikrobiologiya. 54(2): 633 - 638.
- 67.- Portaels, F., Asselineau, C., Baess, J., Daffé, M., Dobson, G., Droper, P., Gregory, D., Hall, M. R., Imaeda, T., Jenkins, A., Laneelle, A. M., Larsson, L., Magnusson, M., Minnikin, D. E., Pattyn, R. S., Wieten, G. & Wheller, R. P. (1986) A Comparative Taxonomic Study of Mycobacte -



- ria Isolated from Armadillos Infected with Mycobacterium leprae. Journal of General Microbiology. 132( ): 2693 - 2707.
- 68.- Portaels, F., Larsson, L., Jiménez, J. and Cierkens, C. (1987) Biochemical Characteristics and Fatty and Compositions of some Armadillo Derived Mycobacteria and their Relation to Mycobacterium gordonae. Journal of General Microbiology. 133( ): 739-744.
- 69.- Rasoamanjara, D., Peladan, F., Turlot, C. J., Monteil, H. and Richard, C. (1986) Characterization of Flavobacterium Species by Analisis of Volatile Fatty Acids Production. Journal of General Microbiology. 132( ): 2723-2732.
- 70.- Robertson, J. W. (1984) Pollution Indicators and Potential Pathogenic Microorganisms in Estuarine Recreational Waters. Canadian Journal of Public Health. 75( ): 19 - 24.
- 71.- Rose, A. H. (1976) Chemical Microbiology: An Introduction to Microbial Physiology. Third Edition. Ed. Butterworths. England.
- 72.- Sénez, J. C. (1976) Microbiología General. Primera Edición. Ed. Alhambra. España. 111.
- 73.- Seyfried. P. L. and Cook, J. R. (1984) Otitis Externa Infections Related to Pseudomonas aeruginosa Levels in Five Ontario Lakes. Canadian Journal of Public Health. 75( ): 83-91.
- 74.- Seyfried. P. L. and Fraser, D. J. (1980) Persistence of Pseudomonas aeruginosa in Chlorinated Swimming Pools. Canadian Journal of Microbiology. 26( ): 350-355.

- 75.- Stock, R. and Rice, C. B. (1974) Chromatographic Methods. Third Edition. Ed. Healsted Press. U.S.A. 157-158.
- 76.- Storch de Gracia, J. M. (1975) Fundamentos de la Cromatografía de Gases. Segunda Edición. Ed. Alhambra. España.
- 77.- Tisdall, A. P., De Young, R. D., Roberts, D. S. and Anhalt, P. J. (1982) Identification of Clinical Isolates of Mycobacteria with Gas-Liquid Chromatography: a 10-Month - Follow-Up Study. Journal of Clinical Microbiology. 16(2): 400-402.
- 78.- Tobin, S. R. and Ward, M. W. (1984) Guidelines for Canadian Recreational Water Quality. American Journal of Public Health. 75( ): 15-18.
- 79.- Vasjurenko, P. Z., Chernyaskaya, N. E. and Open'ko, V. L. (1982) Peculiarities of the Fatty Acids Composition of Lipids in Providencia alcalifaciens and Providencia stuartii. Mikrobiologiya. 51(1): 54-59.
- 80.- Verhulst, A., Van Hespén, H., Symons, F. and Eyssen, H. (1987) Systematic Analysis of the Long-Chain Components of Eubacterium lentum. Journal of General Microbiology. 133( ): 275-286.