



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA**

Klebsiella ozaenae :
**PERFIL DE ACIDOS GRASOS DEFINIDOS POR LA
TECNICA DE CROMATOGRAFIA DE GASES**

T E S I S
**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
BIOLOGO**

P R E S E N T A
MARIA DE GUADALUPE SAINZ MORALES

1993



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.

Klebsiella ozaenae:

PERFIL DE ACIDOS GRASOS DEFINIDOS POR LA TECNICA
DE CROMATOGRAFIA DE GASES

Dedicatoria

A mis padres, con infinito amor y respeto por todo lo que he recibido, su amor, su espíritu de lucha y trabajo, su ejemplo.

A mis hermanos, primos y cuñados, por su gran cariño y amistad que logran nuestra maravillosa unión.

A mis padrinos, por su cariño y apoyo de siempre.

A mis sobrinos, por su amor y alegría.

A mis abuelas, tíos y a todos y cada uno de los miembros de mi círculo familiar, a los que están y a los que se han ido, por su cariño y enseñanzas.

A la familia Urrutia Zamudio, y a la familia Escobar Urrutia, por su confianza, gran amistad y afecto.

A mis maestros, por sus enseñanzas y ejemplo.

A mis compañeros y amigos, que en las diferentes etapas de mi preparación profesional, me dieron su apoyo y entusiasmo para salir adelante.

Y sobre todo a Gracias a Dios

Y a la Virgen de Guadalupe.....

Agradecimientos

A la QFB Esperanza Robles Valderrama, por la dirección de la presente tesis y por el gran apoyo y amistad que me ha concedido desde mi ingreso al Proyecto CyMA.

Al M. en C. Pedro Ramírez García, por su asesoría, sugerencias y apoyo durante todo el proyecto de cromatografía de gases.

Al Dr. Víctor Rivera Aguilar, por su ayuda y sugerencias durante la realización de este trabajo.

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

A los Biól. Blanca Martínez, Emelia Campoy, Isaura Yañez, Adriana Cerecero y Juan Carlos Estrada, por su compañerismo y amistad.

A la P. de Biól. Gabriela Oliver, por su gran ayuda y amistad.

Al Honorable jurado por su participación y sugerencias, principalmente a la QFB Irma Delfín Alcalá y a la M. en C. Patricia Bonilla Lemus.

Al Dr. Fermín Rivera Agüero, jefe del Proyecto CyMA y a sus integrantes, por su apoyo y compañerismo.

A los profesores Rodolfo Cazares Pérez Alva y Glorinela López Pérez, por su consideración y amistad.

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

ESTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE BACTERIOLOGIA Y
CROMATOGRAFIA DEL PROYECTO DE CONSERVACION Y MEJORAMIENTO DEL
AMBIENTE (CyMA), EN LA UNIDAD DE INVESTIGACION INTERDISCIPLINARIA
EN CIENCIAS DE LA SALUD Y EDUCACION (UIICSE) DE LA ENEP IZTACALA,
U N A M

INDICE

1	RESUMEN.....	1
2	INTRODUCCION.....	2
3	ANTECEDENTES.....	7
4	GENERALIDADES DE <u>Klebsiella ozaenae</u>	9
5	FUNDAMENTOS TEORICOS.....	13
5.1	Conceptos Básicos de Cromatografía de Gases.....	13
5.2	Generalidades de Acidos Grasos.....	15
5.3	Reacciones en la Esterificación.....	17
6	OBJETIVOS.....	19
7	MATERIAL Y METODO.	20
8	RESULTADOS.....	24
9	DISCUSION.....	37
10	CONCLUSIONES.....	43
11	SUGERENCIAS Y RECOMENDACIONES.....	44
12	BIBLIOGRAFIA.....	45
	APENDICE.....	50

1 RESUMEN

La cromatografía de gases, en especial la de ácidos grasos celulares, es una herramienta muy útil y eficaz que cada día es más usada entre los taxónomos bacterianos para resolver los problemas de identificación y clasificación de las especies microbiológicas. Esta técnica provee mayor información que las bioquímicas tradicionales, se realiza en menor tiempo y a menor costo, reduce el número de personal del laboratorio, cantidad de materiales, reactivos y sobre todo reduce el error humano.

Para aplicar dicha técnica a los campos de la ecología ambiental, microbiología, ingeniería sanitaria, industria alimentaria, clínica, etc., y resolver los problemas de identificación bacteriana, es necesario contar con un banco de datos con los perfiles cromatográficos de los ácidos grasos celulares del mayor número posible de especies provenientes de diversas fuentes y áreas

La familia Enterobacteriaceae está formada por varios de géneros de importancia médica y económica. A pesar de ello y de los estudios de homología de ADN, existe gran controversia para la ubicación y subdivisión taxonómica de las enterobacterias.

El análisis cromatográfico de lípidos bacterianos podría representar una alternativa, para establecer relaciones y diferencias taxonómicas que ayuden a resolver éstos problemas.

El presente trabajo es una aportación a este banco de datos, cuyo objetivo fué establecer el perfil cromatográfico de los ácidos grasos de Klebsiella ozaenae, enterobacteria patógena oportunista, que provoca en el ser humano infecciones graves como rinitis crónica, atrófica y fétida. Ocurre también en enfermedades respiratorias, urinarias, bacteremias, meningitis, lepra, septicemia, infecciones del colon y sangre, que pueden ser mortales.

El perfil cromatográfico quedó establecido por 13 ácidos grasos cuya presencia y concentraciones son características para esta especie.

2 INTRODUCCION

La cromatografía es un método de separación de mezclas y sustancias. Este método tal como se practica actualmente fué establecido por Michael Tswett (1872-1919) botánico ruso quien publicó en 1906 el uso de ésta técnica para la separación y aislamiento de los pigmentos clorofílicos, verdes y amarillos, gran parte de la nomenclatura cromatográfica se debe a él (53) (58).

Desde entonces la cromatografía ha sufrido un sinnúmero de modificaciones, que aunadas al desarrollo tecnológico y comercial, nos permite contar con una herramienta de gran utilidad, en una amplia gama de aplicaciones, que para algunos autores es casi ilimitada, (58) (22) (54).

En la clasificación más general de la cromatografía tenemos 2 divisiones, 1) La cromatografía de gas y 2) La cromatografía de líquido o solución, pero la combinación de estas dos divisiones y tomando en consideración los tipos de fase estacionaria, dan como resultado la cromatografía: gas líquido, gas sólido, líquido líquido y líquido sólido. Existen otras subdivisiones en función al tipo de columna, tipo de separación, etc.(58) (57) (47).

La cromatografía gas líquido, es un campo tan activo como prometedor para la investigación en diferentes áreas. En laboratorios tanto científicos como industriales y comerciales se presentan y desarrollan constantemente nuevos avances en el diseño y construcción del cromatógrafo y sus elementos, así como de sus aplicaciones. (53) (24) (32) (41).

La quimiotaxonomía es una disciplina que se apoya en diferentes métodos como la espectrofotometría de masas, la espectrometría en el infrarrojo, la electroforesis, la cromatografía de gases, la cromatografía de líquidos, etc, para resolver uno de los problemas más complejos de la microbiología moderna: la identificación y clasificación de los microorganismos. Para ello el taxónomo

bacteriano tradicionalmente necesita realizar gran número de pruebas bioquímicas, serológicas y genéticas, además de considerar morfología, fisiología y cultivo del microorganismo; proceso que consume mucho tiempo de trabajo en el laboratorio, material, presupuesto, etc. y produce un cúmulo de información que no siempre puede ser procesada en su totalidad por falta de tiempo y de aplicación práctica (22) (26) (25) (2) (23).

Existen en el mercado algunos métodos por micropruebas como el API 20E que es un sistema de identificación comercial, que se basa también en las propiedades bioquímicas de los microorganismos. La identificación por esta técnica sigue siendo complicada, ya que es necesario realizar pruebas complementarias a este sistema (30).

Los métodos quimiotaxonómicos permiten obtener información cualitativa y cuantitativa de los microorganismos, de su composición química, metabolitos y estructura celular y no sólo información binaria como la de los métodos tradicionales (15) (14).

Todas las células bacterianas tienen una composición química muy similar, el agua representa el 90% de la biomasa (52) (54) y sus componentes principales son el carbono, hidrógeno, nitrógeno, fósforo, azufre, calcio, cloro, manganeso, magnesio, potasio, sodio y zinc. La detección de componentes únicos y la medición de la concentración relativa de sustancias comunes, se usa cada vez más en la identificación y clasificación de bacterias, amibas, hongos y algas (10) (41) (8).

La cromatografía gas líquido ofrece varias ventajas en comparación con los métodos tradicionales de análisis pues permite separar mezclas complejas de gran variedad de sustancias, como aminoácidos, carbohidratos, ácidos grasos, etc, reduce el tiempo de proceso total y proporciona información que sí puede procesarse numéricamente. A través de ella se obtienen los patrones cromatográficos, patrones que usualmente son específicos para géneros y especies (34) (15). También se reduce el error humano que implica una técnica manual (19) (2) (32).

En las áreas de clínica, calidad del agua, industria alimentaria e ingeniería sanitaria, se busca simplificar y acelerar la identificación, pues el tiempo de obtención de resultados es importante para decidir la acción a tomar.

La técnica de cromatografía de gases utilizada en este trabajo se basa precisamente en el análisis de un componente: los lípidos. Los lípidos (principalmente los fosfolípidos) forman parte de las paredes y membranas celulares. Los ácidos grasos son pozos de energía y propagadores de energía, de importancia taxonómica. Son insolubles en agua y solubles en solventes orgánicos como el cloroformo, acetona, alcohol, hexano o benceno (14) (6).

Los lípidos y los ácidos grasos celulares están presentes en todas las bacterias, su análisis por cromatografía de gas-líquido en especial de los ácidos grasos y sus ésteres metílicos ha sido estudiado más que cualquier otro tipo de componente químico (11) (5) (10) (49) (42) y es considerado por diversos autores como una herramienta eficaz y con gran futuro en la taxonomía bacteriana (22) (5) (10) (41) (15) debido a las siguientes consideraciones:

- Están presentes en todos los microorganismos con excepción de cierto tipo de virus.
- La composición de los ácidos grasos celulares es muy estable genéticamente y su análisis cromatográfico es comparable en resultados al de homología de ADN.
- Las mutaciones simples no alteran la composición de los ácidos grasos celulares.
- Las clases de lípidos han sido aisladas y analizadas por separado. Han sido objeto de análisis en estudios metabólicos.
- Se usan con fines taxonómicos de identificación y clasificación rápida, pues cada perfil cromatográfico es como una huella digital específica para géneros y especies (4) (17) (34). Las características de los lípidos y del método cromatográfico nos promete un análisis seguro, exacto, reproducible, cualitativo, cuantitativo y rápido (19).

En la actualidad, no existe un método estandarizado y reconocido mundialmente para la extracción de lípidos bacterianos, se aplican una gran variedad de técnicas (17) (10).

Generalmente los métodos liberan los ácidos grasos de los lípidos saponificables y son los ésteres metílicos de estos ácidos grasos los que sirven para indicar la presencia de dichos lípidos (6) (40) (45) (35).

En México la aplicación de la cromatografía de gases como técnica para la identificación de enterobacterias por análisis de sus ácidos grasos, es muy reciente (46) (48) (28) (29).

En la ENEP-Iztacala de la UNAM, a través del Proyecto de Conservación y Mejoramiento del Ambiente (CyMA), se viene desarrollando desde 1985 la implementación y estandarización de una técnica cromatográfica para la elaboración de un banco de datos que favorezca la identificación más expedita de algunas bacterias responsables de la calidad del agua, utilizando el perfil cromatográfico de sus ácidos grasos. El proyecto fué apoyado en su primera fase por el "CONACyT" y se mantiene un convenio de asesoría con el Instituto de Investigaciones del Agua en Praga, Checoslovaquia, a través de los Doctores Häusler y Richter, especialistas a nivel mundial en el tema. Por otro lado en México se cuenta con el asesoramiento de los M. en C. Santiago Capella, Francisco Rojo y Carmen Labastida especialistas en cromatografía de gases en la División de Posgrado de la Facultad de Química de la UNAM.

Para utilizar esta técnica como método de identificación es indispensable contar, en primer término, con los perfiles cromatográficos de bacterias tipificadas. De ahí la importancia del presente trabajo, que se propuso obtener el perfil cromatográfico de Klebsiella ozaenae. Esta bacteria pertenece a la familia Enterobacteriaceae (Abel, 1893) y es considerada no como una especie, sino como subespecie de K. pneumoniae por los estudios de su ADN que demostraron que ambas junto con

K. rhinoscleromatis pertenecen al mismo grupo (33) (18).

Este microorganismo es de interés clínico, ya que causa enfermedades del tracto urinario, neumonías, atrofia fétida de las mucosas nasales, produce daño irreversible de tejido, es patógeno oportunista y de actividad variable (44) (33).

Es importante el diagnóstico clínico temprano de neumonías producidas por bacilos Gram negativos oportunistas, para administrar una terapia preventiva y efectiva, pero los "métodos rápidos de diagnóstico" que se basan en pruebas bioquímicas y serológicas tardan varios días (1 ó 2, para el aislamiento e identificación, o para su detección por inmunoelectroforesis) (9) (44). El método de cromatografía de gases puede dar resultados en unas horas.

3 ANTECEDENTES

La cromatografía de gases se considera en la actualidad una de las herramientas más importantes en el campo de la investigación científica y tecnológica.

La utilización de la forma gas líquido, tiene su inicio en 1952 cuando Martín y James, obtienen por primera vez la separación de algunos ácidos grasos volátiles, (53) (25) (24).

En 1954 N.H. Ray, demuestra la posibilidad de extender el campo de aplicación de esta técnica, a la investigación de muchas especies orgánicas e inorgánicas. A partir de 1955, se observa un avance vertiginoso de la cromatografía de gases, ampliándose constantemente sus aplicaciones, aumentando la investigación teórica, técnica y de aparatos nuevos para su instrumentación, (53).

En 1963, K, Abel y colaboradores encontraron mediante la cromatografía de gases, diferencias entre las diversas familias de microorganismos, y similitudes entre las especies de la familia Enterobacteriaceae. A partir de entonces se han realizado numerosos trabajos de identificación y diferenciación de bacterias por medio del análisis de su composición química, y de la composición química de sus productos metabólicos y de degradación celular ya sea (química o térmica), utilizando la cromatografía de gases (4) (39) (12):

- 1968 Ceccini y O'brien, trataron de identificar Escherichia coli por medio de la cromatografía de gases, sin tener éxito.
- 1967-1980 Moss y colaboradores lograron avances en microbiología clínica de diagnóstico.
- 1971 Lechevalier; Blaschy y Zimmerman; MitruKa y colaboradores, analizaron los ácidos grasos de algunos microorganismos para su identificación.
- 1973 Machtiger y O'leary, diferenciaron los géneros Arizona, Citrobacter y Providencia a partir de sus ácidos grasos celulares.
- 1977 Vasjurenko y colaboradores, confirmaron la división en dos

especies de Erwinia aroideae y E. carotovora.

- 1982 Vasjurenko y colaboradores diferenciaron entre Providencia alcalifaciens y P. stuartii.

- 1983 Cernjaukaja y Vasjurenko, determinaron que el género Salmonella posee el ácido 2-Hidroxitetradecanoico, no así Escherichia y Shigella y establecieron la filogenia de éstos géneros de acuerdo al contenido de dicho ácido.

- 1984 Cernjaukaja y Vasjurenko, mostraron la relación filogenética entre Proteus mirabilis, P. vulgaris y P. rettgeri y la confirmación de P. morgani.

- 1985 Athalye, Noble y Minnikin, utilizaron la cromatografía de gases para analizar los ácidos grasos de bacterias Coryneformes presentes en osteomielitis, linfadenitis, meningitis, pneumonia, obteniendo datos importantes para la identificación y clasificación de este grupo.

- 1988 Eerola y Lehtonen, aplicaron la cromatografía de gas líquido de ácidos grasos bacterianos como una herramienta de identificación automática en muestras clínicas.

- 1990 Brooks y colaboradores, demostraron la alta especificidad y sensibilidad de la cromatografía gas líquido con pulsador de electrones para el diagnóstico rápido de meningitis tuberculosa, (13) (14) (39) (42) (5) (19) (11).

La amplia aceptación y éxito de la cromatografía de gas líquido se debe a su simplicidad, rapidez de análisis, alta sensibilidad de los sistemas detectores, eficiencia de las separaciones, variedad de aplicaciones, seguridad, reproducibilidad, posibilidad de procesar muestras muy pequeñas y a su relativo bajo costo, (24) (4) (32) (12) (2).

4 GENERALIDADES DE Klebsiella ozaenae

La familia Enterobacteriaceae está constituida por una variedad de géneros que tienen importancia médica y económica (52). Unos están presentes en la "flora intestinal" normal de los vertebrados incluyendo al hombre, otros son patógenos reconocidos como: Escherichia, Shigella y Salmonella, y algunos más que son saprófitos. Esta familia es uno de los grupos más estudiados e importantes, sobre todo en microbiología médica, diagnóstica y clínica, pues algunos de sus miembros son la causa de enfermedades severas, crónicas y epidémicas que afectan principalmente los aparatos gastrointestinal y urinario, pero que también se pueden aislar de infecciones de cualquier otra parte del cuerpo (1) (36) (52).

Las enterobacterias son bacilos Gram negativos, aerobios o anaerobios, no esporulados, con o sin flagelos periféricos, con algunas variantes no móviles de especies móviles, pueden crecer en medios simples, fermentan la glucosa con formación de ácidos y/o gases, reducen los nitratos a nitritos y son oxidasa negativos.

Los organismos del género Klebsiella son inmóviles, con diámetro de 0.3 a 1.0 μm y 0.6-6. μm de largo, pueden formar cadenas cortas, son anaerobios facultativos, su cápsula está formada de polisacáridos, por ello las colonias son mucosas, además de ser brillantes y viscosas. Son oxidasa negativos, usan citrato y glucosa como única fuente de carbono, la prueba Voges-Proskauer es positiva, fermentan inositol, hidrolizan urea y hay pérdida de ornitina descarboxilasa. Su hábitat es amplio: suelo, agua, granos, vegetales, intestino de vertebrados y particularmente de pacientes clínicos.

Las klebsiellas aisladas de infecciones hospitalarias contienen factores R, que las hacen resistentes a antibióticos como B-lactámicos, cefalosporinas, aminoglicósidos, tetraciclinas, cloranfenicoles, sulfonamidas y trimetropim (52) (33).

En el manual de Bergey's (33) se menciona que todas las especies

de Klebsiella son resistentes a la ampicilina, sin embargo Murray et al 1981 establecieron que no lo son en un 100%, lo que indica que estos microorganismos tienen un amplio grado de variabilidad, resultando responsables de serias epidemias hospitalarias (52) (43).

Estas bacterias son patógenos oportunistas primarios que ocasionan bacteremias, neumonías, infecciones urinarias y otras infecciones graves en el hombre. Las principales fuentes de contaminación son el tracto gastrointestinal, material de laboratorio clínico y las manos del personal hospitalario (16) (52). Los brotes generalmente ocurren en pacientes de urología, recién nacidos y unidades de cuidado intensivo. Es entonces en los hospitales donde se han encontrado la mayor incidencia de estas infecciones en los últimos 25 años (43) (36).

Esto se debe, al menos en los países desarrollados, al uso generalizado de antibióticos, agentes inmunosupresores y citotóxicos que han eliminado a otros microorganismos dejando nuevos nichos ecológicos a microorganismos entéricos no fermentadores y anaerobios, antes considerados de baja virulencia o sin ella (Klebsiella, Escherichia coli, Enterobacter, Serratia, Pseudomonas y Bacteroidáceas), (16) (43).

Los enfermos con respuestas inmunitarias alteradas, con problemas crónicos, debilitamiento, heridas y edad avanzada, son presas potenciales de estos organismos, principalmente en los países occidentales donde han ido desapareciendo las infecciones estafilocócicas, estreptocócicas y neumocócicas (16) (52).

Klebsiella ozaenae es una enterobacteria arginina dihidrolasa positiva, que está muy relacionada con K. rinoescleromatis y K. pneumoniae por su composición de ADN; K. ozaenae solo puede distinguirse con facilidad de K. pneumoniae por su serotipo, (33) (7). Produce una enfermedad llamada ozena, que es una rinitis crónica, atrófica y fétida (52). Ocurre también en enfermedades respiratorias, urinarias, entéricas, bacteremias, meningitis, lepra, septicemia, infecciones del colon y sangre, algunas de ellas pueden en ocasiones, llegar a ser mortales (1) (36). Se han

reportado muertes por infecciones intrahospitalarias con cuadros por enfermedades, como la lepra y septicemia, complicadas con la presencia K. ozaenae en los que se administró previamente dosis fuertes de antibióticos (43). Ello crea un debilitamiento del paciente que es presa fácil de estos microorganismos oportunistas.

Cabe señalar que la presencia de esta bacteria en el ambiente está relacionada con vegetales, es común encontrarla en aguas de desecho, efluentes industriales de productos de madera (con densidades 10^5 - 10^7 cel/ml), textiles terminados, lagunas, depósitos en plantas de tratamiento de agua y molinos de caña de azúcar. Se han aislado también del aserrín, vegetales frescos del mercado, ensaladas servidas en escuelas, cantinas y hospitales. Lo que podría ser la razón de su presencia gastrointestinal en el hombre. Klebsiella también se relaciona con enfermedades animales, como la mastitis en el ganado vacuno y caballo (52).

Las enfermedades en el hombre son difíciles de tratar debido a la resistencia de estos microorganismos a los antibióticos y a la existencia de infecciones crónicas subyacentes en los pacientes (33) (43). El laboratorio de diagnóstico de estas infecciones requiere de técnicas y criterios establecidos para interpretar adecuadamente los resultados y determinar al agente casual. La diferenciación hasta género y especie es necesaria para aplicar una terapéutica idónea (1) (43).

La clasificación de las enterobacterias se basa inicialmente en la presencia o ausencia de enzimas que actúan sobre sustratos en cultivos "in vitro" y un sistema indicador de degradación del sustrato o la presencia de un metabolito específico (37).

La identificación a nivel de especie se basa en la estructura antigénica, sin embargo ciertas cepas con la misma actividad, tienen reacciones metabólicas, distintas. Por ello, la clasificación e identificación por medio únicamente de pruebas bioquímicas, serológicas y fagotípicas puede conducir a errores y controversias en los sistemas taxonómicos para esta familia.

Aunque los estudios de ADN aportan información que permite distinguir actualmente a diversos grupos, aún existe gran controversia para la ubicación y subdivisión taxonómica de las enterobacterias (47) (52) (18). Por consiguiente el análisis cromatográfico de lípidos bacterianos representa un recurso importante, para establecer relaciones y diferencias taxonómicas que ayudan a resolver estos problemas.

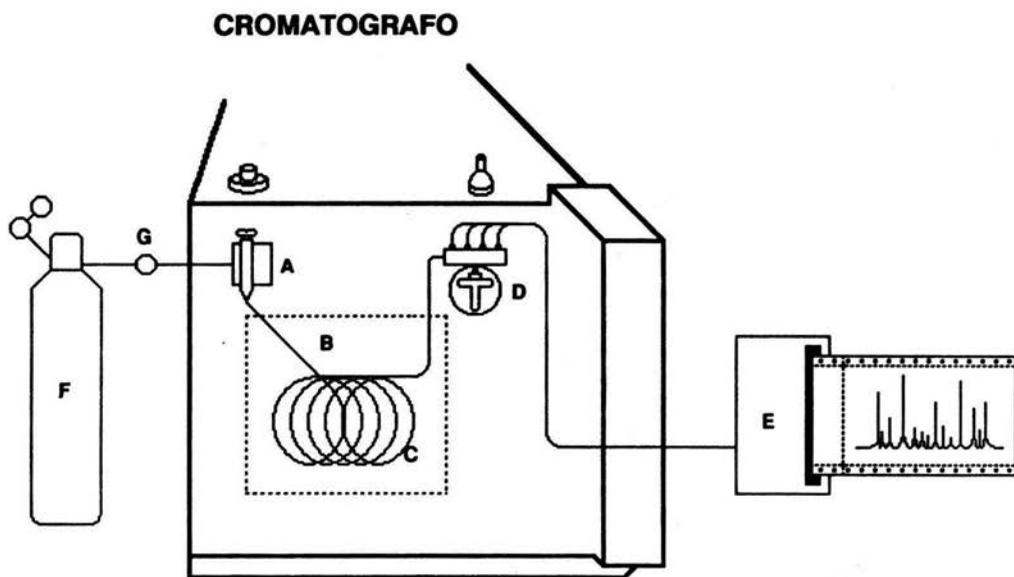
5 FUNDAMENTOS TEORICOS

A continuación se resumen algunos conceptos generales con el objeto de entender mejor los pasos que se realizan en el método.

5.1 CONCEPTOS BASICOS DE CROMATOGRAFIA DE GASES

El cromatógrafo está constituido esencialmente por las siguientes partes y consumibles, integrados como se muestra en este esquema:

- A) Inyector
- B) Horno
- C) Columna
- D) Detector
- E) Registrador
- F) Gas de arrastre.
- G) Controlador de flujo



La cromatografía gas líquido tiene por objeto separar mezclas más o menos complejas en sus componentes volátiles, por medio de una columna de separación por donde se eluyen éstos por el arrastre de una fase móvil sobre una fase estacionaria (38).

Para cualificar y cuantificar los ácidos grasos de *K. ozaenae* por cromatografía de gas líquido, éstos son convertidos en su forma más volátil, sus ésteres metílicos. Como fase móvil para la partición de la mezcla vaporizada de los ésteres se utiliza un gas inerte, nitrógeno. La fase líquida estacionaria está constituida por polidimetilsiloxano sobre la superficie interior de un tubo capilar de 30 m, que se calienta en un horno hasta 250°C. Los ésteres metílicos se distribuyen entre las dos fases de acuerdo a su polaridad y peso molecular característicos, después de ser inyectados al cromatógrafo; el flujo de nitrógeno (30 ml/s) que sale por la columna arrastra a los componentes separados que se hallan en él hacia un detector de ionización de flama, donde se mezclan con un flujo de hidrógeno (30 ml/s) y de aire (100 ml/s), y se queman en un campo eléctrico. El flujo de fragmentos ionizados de los ésteres metílicos, produce una señal eléctrica que capta automáticamente un registrador ó integrador como gráfica de una serie de picos bien delimitados, que corresponden a un determinado ácido graso. El área bajo el pico es proporcional a su concentración (13) (38) (55).

En la gráfica ó cromatograma se registran el tiempo de retención en que eluye cada componente de la mezcla y los milivolts que determinan la altura del pico. La identificación de la muestra se hace por comparación de los tiempos de retención del componente problema con los valores de un estándar ó control, analizado bajo las mismas condiciones constantes de presión, flujo y temperatura. Los tiempos de retención son específicos para cada sustancia determinada.

5.2 GENERALIDADES DE ACIDOS GRASOS

Los ácidos grasos pertenecen principalmente a 3 grupos; los saturados como el laúrico, mirístico, palmítico y esteárico son monocarboxílicos, de cadena lineal saturada, con 12, 14, 16 y 18 carbonos respectivamente, son los más simples, ya que no poseen modificaciones, ramificaciones ó sustituciones estructurales, ni configuracionales.

Los hidroxiaácidos mirístico: 2-OH y 3-OH que tienen un grupo hidroxilo en su cadena y que por esto presentan reacciones del grupo alcohol y del grupo ácido. La más común es la formación de ésteres (45).

Y los ácidos grasos insaturados que poseen dobles enlaces generalmente entre los carbonos 9 y 10 (35). Todos tienen configuración "cis", excepto el ácido C 18:1⁹ y ¹¹ trans-cis que puede cambiar su isomería geométrica de trans a cis por giro de 30° de sus radicales -H y desplazamiento del doble enlace al carbono con posición 11 de la cadena. El ácido C 17:0 Δ posee además 2 radicales metilo en los carbonos 9 y 10 y el ácido C 18:2^{9,11}, es dicarboxílico y el único con 2 dobles enlaces.

La estabilidad química de los ácidos grasos está en función al grado de saturación de los mismos, lo que le confiere inestabilidad a todos los ácidos insaturados, pues cuentan con diversas modificaciones estructurales y configuracionales.

En seguida se enlistan algunas características físicas de varios de estos compuestos (35).

ACIDOS GRASOS SATURADOS

NOMBRE COMUN	SIMBOLO	P.F (°C)	P.E (°C)	SOLUBILIDAD (g/100g H ₂ O a 20°C)
Laúrico	12:0	44.2	299	0.0055
Mirístico	14:0	53.9	326	0.002
Palmítico	16:0	63.1	352	0.0007
Esteárico	18:0	69.6	376	0.0003

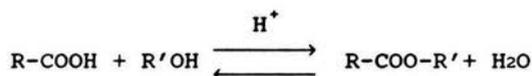
ACIDOS GRASOS INSATURADOS

Palmitoleíco	16:1 ^{Δ⁹}	-0.5		
Oleíco	18:1 ^{Δ⁹}	13.4	223/10mm	insoluble
Linoleíco	18:2 ^{Δ^{9,12}}	-5	230/16mm	insoluble
Elaídico	18:1 ^{9 trans}			
Cis-Vaccénico	18:1 ¹¹			

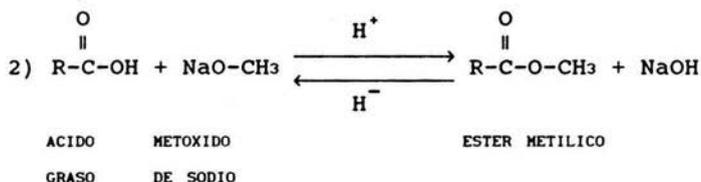
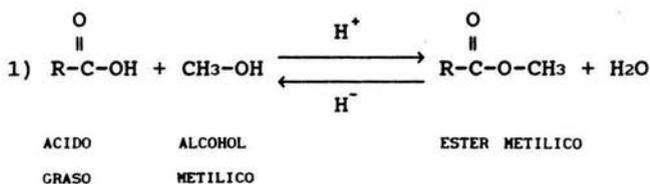
5.3 REACCIONES EN LA ESTERIFICACION

El proceso de esterificación de los ácidos grasos consiste en la reacción de un ácido con un alcohol, usando como catalizador generalmente un ácido fuerte, (HCl ó H₂SO₄).

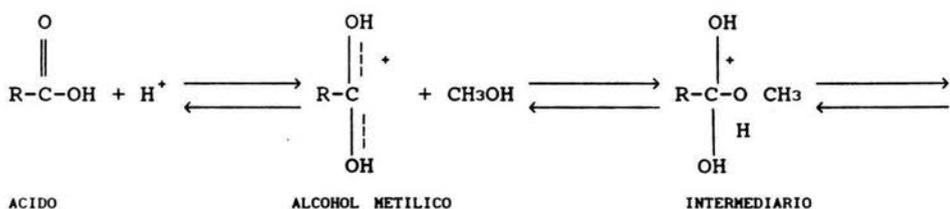
La reacción puede alcanzar el equilibrio, cuando sólo se han transformado las 2/3 partes del ácido ó del alcohol en el éster. Un exceso de cualquiera de los reactivos desplaza el equilibrio en dirección a la formación del éster y se logra una reacción más completa (40) (6).



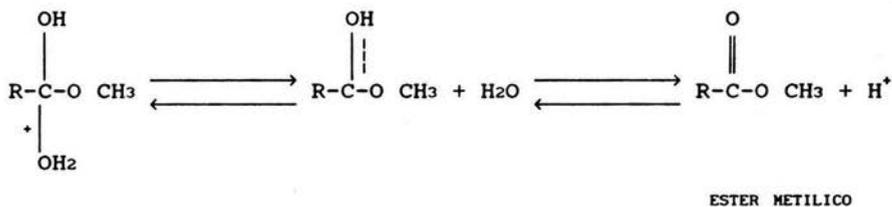
La esterificación es una sustitución nucleofílica en la que los ácidos grasos reaccionan con el alcohol metílico (CH₃OH)¹ ó con un reactivo semejante como el metóxido de sodio (CH₃ONa)² para lograr la metilación de los ácidos grasos.



La reacción es reversible correspondiendo entonces a una hidrólisis ácida. En ella pueden formarse uno ó varios intermediarios, mecanismo que fué comprobado por M. L. Bender en 1951, utilizando isótopos marcadores (40) (21).



El ácido catalizador acelera ambos procesos (la esterificación y la hidrólisis) por protonación del oxígeno carbonilo y hace al carbono de este radical más susceptible al ataque nucleofílico (40) (21).



6 OBJETIVOS

- 1) Determinar el perfil de los ácidos grasos de Klebsiella ozaenae con base en su composición e identificarlos por medio de la técnica de cromatografía de gases.
- 2) Valorar la reproducibilidad del método para la identificación de Klebsiella ozaenae.

a) PREPARACION DEL CULTIVO PURO.

La técnica bacteriológica para preparar y cultivar al microorganismo puro, no varía con respecto a las técnicas convencionales; solamente difiere en que la preparación del cultivo puro debe realizarse en un medio de agar inclinado, con la finalidad de obtener un crecimiento abundante de la cepa pura de K. ozaenae. Se utilizó agar nutritivo marca "Difco" y la cepa de referencia K. ozaenae de la American Type Culture Collection, U.S.A., (ATCC-11296).

b) PREPARACION DE LA BIOMASA.

Para la obtención de la biomasa, se prepararon 2 cajas de Petri con agar nutritivo marca "Difco" (solución estéril de 23 g/L), cada una con 25 ml de solución, se inocularon a partir del cultivo puro en agar inclinado y se incubaron a $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Para la posterior definición fueron suficientes 5 mg de biomasa por muestra, pero por razones prácticas y la posibilidad de repetición, es recomendable contar con 20 mg.

c) COSECHA DE LA BACTERIA.

Antes de iniciar la cosecha se preparó solución de formaldehído al 0.5% , varillas de vidrio en forma de "L" , embudos de vidrio, pipetas de 10 ml, y tubos para centrifuga, todo el material de vidrio se esterilizó en estufa a 180°C por 2 horas. Una vez obtenido un crecimiento abundante en cada caja Petri, se adicionaron 5 ml de la solución de formaldehído, con el propósito de fijar y colectar la bacteria de la superficie del medio, frotando suavemente con una varilla de vidrio.

La suspensión de la biomasa obtenida de las dos cajas de Petri (10 ml) se vació en un tubo para centrifuga. Todo el proceso anterior se realizó en condiciones de esterilidad.

d) CENTRIFUGACION.

El contenido del tubo obtenido en la cosecha, se centrifugó a 15,000 rpm durante 10 min a 4°C en una unidad refrigerada. En este caso una ultracentrífuga Sorvall modelo RC-5B (20).

El sobrenadante se desechó cuidadosamente, y al residuo se le agregaron 5 ml de solución fisiológica de NaCl (0.85%) para realizar un primer lavado, y se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones. Este procedimiento se repitió una vez más para el segundo lavado. El paquete celular obtenido, se transfirió con ayuda de una cucharilla a viales lavados con hexano ó metanol y secados con anterioridad. La biomasa se repartió perfectamente sobre las paredes de los viales con la finalidad de obtener un secado más rápido y eficiente durante la liofilización. Los viales permanecieron cerrados con el fin de evitar cualquier contaminación proveniente del medio.

e) LIOFILIZACION DEL PAQUETE CELULAR

Inmediatamente después de la Centrifugación, el paquete celular fué directamente procesado durante 3 horas aproximadamente, en un liofilizador Lyph-Lock 4.5 litros, Freeze Dry System Modelo 77510; 77510-01, acondicionado a -50°C y con vacío. Para un secado más rápido fué necesario congelar previamente las muestras en dióxido de carbono sólido ó adaptar un dispositivo en el liofilizador. La materia seca resultante se sometió a esterificación.

f) ESTERIFICACION DE ACUERDO A GLASS (1971).

Reactivos:

I. Solución A (metóxido de sodio).

A 37 ml de metanol absoluto, añadir 23 ml de metóxido de sodio y aforar a 100 ml con benceno.

II. Solución B (metanol saturado con cloro gaseoso).

En un dispositivo apropiado y con las debidas precauciones

gotear 30 ml de ácido sulfúrico en 30 ml de ácido clorhídrico y coleccionar el cloro gaseoso que se produce en 20 a 25 ml de metanol absoluto.

III. Solución C (solución fisiológica de NaCl al 0.85%).

IV. Sulfato de sodio anhidro.

V. Hexano grado cromatográfico ó espectrofotométrico.

Se pesaron 20 mg de materia liofilizada, se le agregó 1 ml de solución A y se agitó vigorosamente durante 5 min a velocidad constante. Posteriormente se agregó suficiente solución B hasta alcanzar un pH de 1 ó 2, se agitó nuevamente durante 30 min, se le añadieron 2 ml de solución C y se volvió a agitar por 7 min.

El proceso de extracción de los ésteres metílicos se realizó agregando 1 ml de hexano, se agitó la muestra por 5 min a velocidad constante y se dejó separar la capa de hexano que contiene los ésteres metílicos, (capa superior transparente), y con una pipeta Pasteur se pasó a un tubo de ensaye conteniendo una cantidad suficiente de sulfato de sodio anhidro (1.0 a 1.5 grs aproximadamente) para extraer el agua que estuviera presente. Este procedimiento de extracción de ésteres metílicos con hexano se repitió 2 veces más para cada una de las muestras.

Al final se obtiene un volumen de hexano con ésteres metílicos, para cada muestra. El hexano se evapora con nitrógeno gaseoso hasta que quede un volumen de 10 μ l aproximadamente, de este volumen se toma 1 μ l con una microjeringa y se inyecta en el cromatógrafo donde se realiza la separación y determinación de los ésteres metílicos (26) (27) (28) (29).

g) OBTENCION DEL CROMATOGRAMA.

Se utilizó un cromatógrafo de gases con detector de ionización de flama modelo 5890 A/3396 A. Hewlett Packard, con columna capilar de las siguientes características; 30 m x 0.25 mm bonded fsot, RSL-150 polydimethylsiloxane, 0.25 μ m MAOT: 330^oC. Serial 4-3441, Alltech A, Inc. bajo las siguientes condiciones de operación:

temperatura del inyector y detector 250 C; temperatura de la columna programada de 120 a 250°C con incremento de 4°C/min; el flujo del gas acarreador fué de 30 ml/min. Una vez realizada la separación cromatográfica de los ésteres metílicos, sus áreas y tiempos de retención fueron registrados y graficados por un integrador modelo; HP-3396 A, Hewlett Packard.

El cromatograma obtenido de la muestra, se comparó con otro de una mezcla estándar de referencia (Bacterial Acid Methyl Esters CP Mix, No. Cat. 4-7080), que contiene un total de 10 mg/ml de metil ésteres para la identificación de los ácidos grasos, presentes en ella (10) (15) (54) (19) (57).

h) ANALISIS ESTADISTICO.

Una vez identificados los ácidos grasos de la muestra, sus tiempos y áreas de retención se expresaron en porcentajes normalizados, para su análisis y comparación, tomando como 100% al pico o área más alto, es decir el más abundante.

La reproducibilidad de la técnica cromatográfica se determinó por la repetición de 50 muestras idénticas, tanto de la mezcla de ésteres metílicos, como de la cepa pura de K. ozaenae cultivada bajo las mismas condiciones. Para lo cual fué necesario calcular media, desviación estándar, coeficiente de variación, valor máximo y mínimo, e intervalo de confianza, $(\bar{x} \pm 2s)$, (2) (19) (51).

8 RESULTADOS

Se procesaron un total de 50 muestras de una cepa pura de Klebsiella ozaenae con el objeto de extraer los ésteres metílicos totales de esta especie y determinar su perfil de ácidos grasos por cromatografía de gases.

Los picos cromatográficos se identificaron por comparación de sus tiempos de retención con un estándar de ésteres metílicos de ácidos grasos para enterobacterias, analizado simultáneamente y bajo las mismas condiciones que las muestras bacterianas.

La figura 1 muestra un cromatograma del estándar inyectado y la figura 2, el cromatograma teórico que viene adjunto con dicho estándar y con el que se pueden identificar los picos del estándar inyectado.

La figura 3 es ejemplo de un cromatograma de una muestra, el cual puede identificarse mediante comparación de sus picos con los del cromatograma del estándar inyectado (Fig 1) . De esta forma se analizaron cada uno de las 50 muestras, encontrando que en los cromatogramas siempre se presentaron 13 de los 26 ácidos grasos presentes en el estándar.

En orden de elución los 13 ácidos grasos identificados fueron:

C 12:0 dodecanoico, C 14:0 tetradecanoico, C 15:0 pentadecanoico, 2-OH C 14:0 2-hidroxitetradecanoico, 3-OH C 14:0 3-hidroxitetradecanoico, C 16:1⁹ cis-9 hexadecenoico, C 16:0 hexadecanoico, C 17:0 cis cis-9,10 metilen hexadecanoico, C 17:0 heptadecanoico, C 18:2^{9,12} cis-9,12 octadecanoico, C 18:1⁹ cis 9 octadecenoico, C 18:1^{9 y 11} Trans-9 Y Cis-11 octadecenoico y C 18:0 octadecanoico (31), (Tabla 1).

En la tabla 2 del apéndice se presentan los valores obtenidos de las áreas (A) y tiempos de retención (TR) normalizados para cada uno de los ácidos grasos presentes en todas las muestras. En la normalización se consideró como el 100% al ácido graso que

CROMATOGRAMA DE UNA MEZCLA ESTANDAR DE ESTERES METILICOS BACTERIANOS

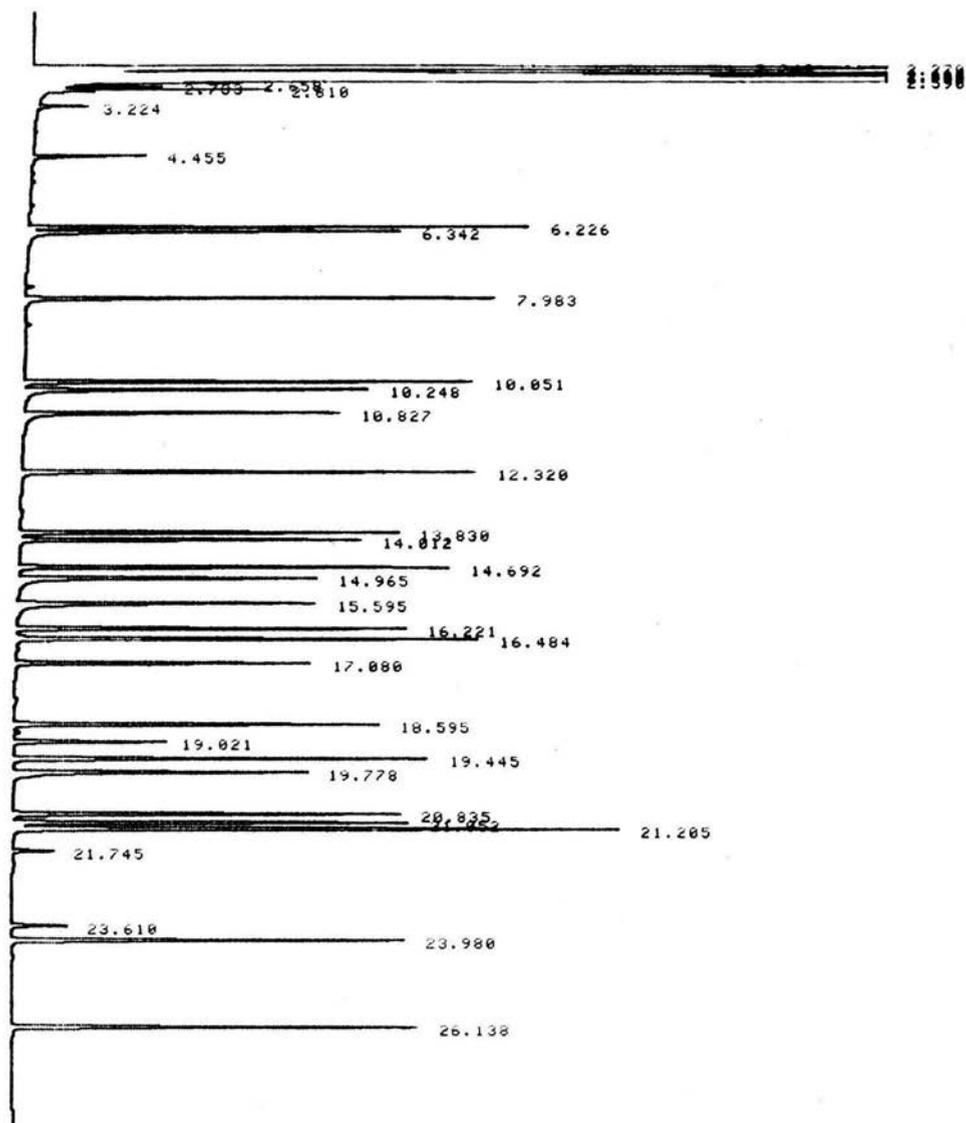
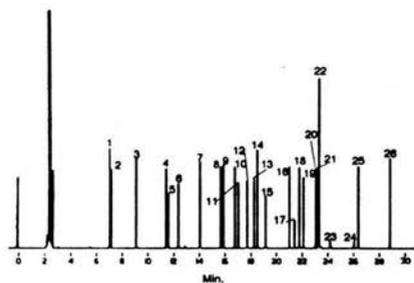


Figura 1

CROMATOGRAMA TEORICO DE UNA MEZCLA ESTANDAR DE ESTERES METILICOS BACTERIANOS



1.	11:0	Me. undecanoico
2.	2-OH 10:0	Me. 2-hidroxi decanoico
3.	12:0	Me. dodecanoico
4.	13:0	Me. tridecanoico
5.	2-OH 12:0	Me. 2-hidroxi dodecanoico
6.	3-OH 12:0	Me. 3-hidroxi dodecanoico
7.	14:0	Me. tetradecanoico
8.	i-15:0	Me. 13-metil tetradecanoico
9.	a-15:0	Me. 12-metil tetradecanoico
10.	15:0	Me. pentadecanoico
11.	2-OH 14:0	Me. 2-hidroxi tetradecanoico
12.	3-OH 14:0	Me. 3-hidroxi tetradecanoico
13.	i-16:0	Me. 14-metil pentadecanoico
14.	16:1 ⁹	Me. cis-9-hexadecenoico
15.	16:0	Me. hexadecanoico
16.	i-17:0	Me. 15-metil hexadecanoico
17.	17:0	Me. cis-9,10-metil hexadecanoico
18.	17:0	Me. heptadecanoico
19.	2-OH 16:0	Me. 2-hidroxi hexadecanoico
20.	18:2 ^{9, 12}	Me. cis-9, 12-octadecadienoico
21.	18:1 ⁹	Me. cis-9-octadecenoico
22.	18:1 ⁹	Me. trans-9-octadecenoico &
	18:1 ¹¹	Me. cis-11-octadecenoico
23.	18:0	Me. octadecanoico
24.	19:0	Me. cis-9, 10-metil octadecanoico
25.	19:0	Me. nonadecanoico
26.	20:0	Me. eicosanoico

Figura 2

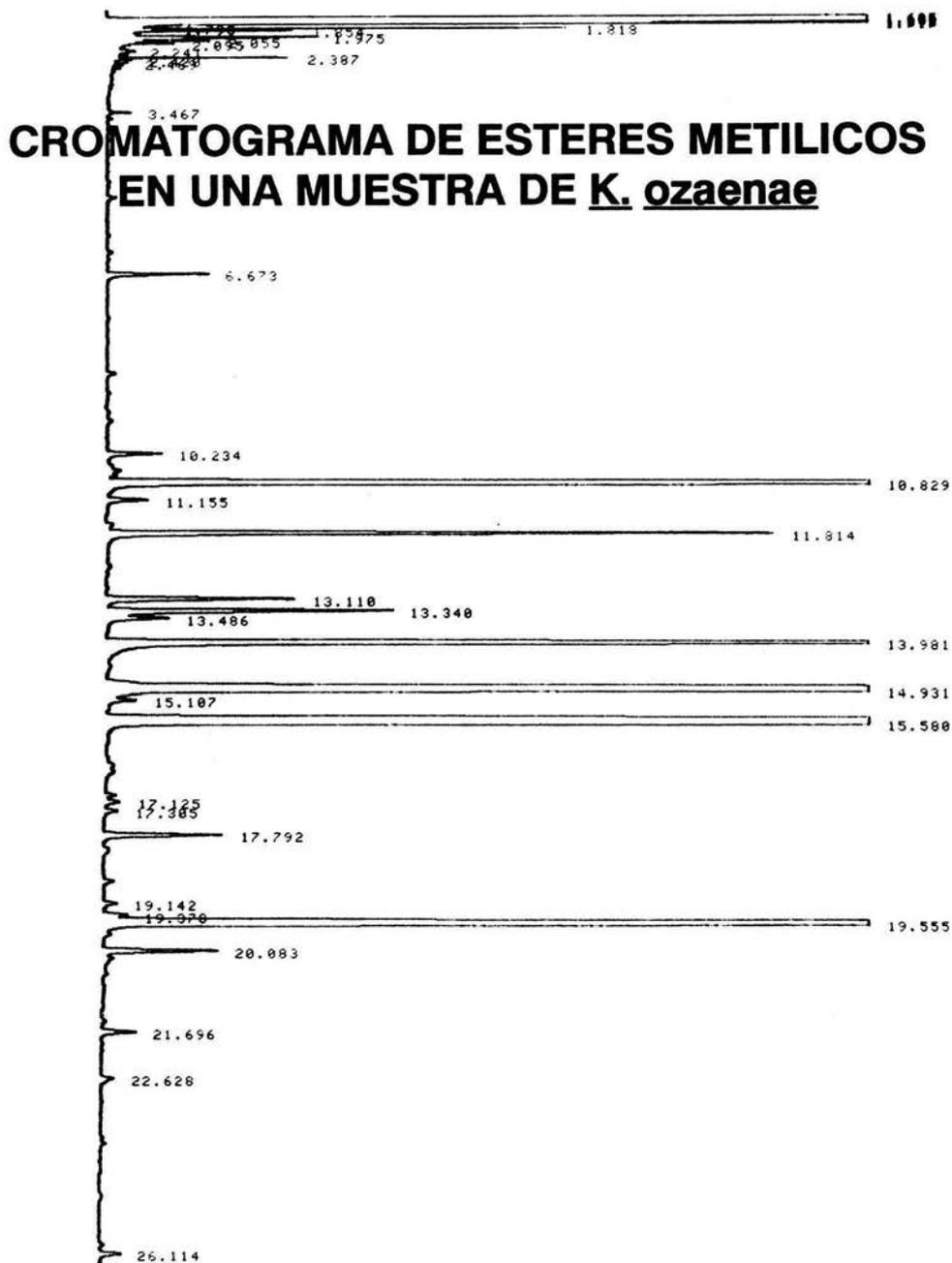


Figura 3

T A B L A 1

ACIDOS GRASOS IDENTIFICADOS EN *Klebsiella ozaenae*

PICO No.	SIMBOLO	NOMBRE QUIMICO	NOMBRE COMUN
3	12:0	DODECANOICO	LAURICO
7	14:0	TETRADECANOICO	MIRISTICO
10	15:0	PENTADECANOICO	PENTADECILICO
11	14:0 2-OH	2-OH TETRADECANOICO	2-HIDROXIMIRISTICO
12	14:0 3-OH	3-OH TETRADECANOICO	3-HIDROXIMIRISTICO
14	16:1 ⁹	CIS-9 HEXADECENOICO	PALMITOLEICO
15	16:0	HEXADECANOICO	PALMITICO
17	17:0 CIS	CIS-9,10 METILENHEXADECANOICO	-----
18	17:0	HEPTADECANOICO	MARGARICO
20	18:2 ^{9,12}	CIS-9,12 OCTADECADINOICO	LINOLEICO
21	18:1 ⁹	CIS-9 OCTADECENOICO	OLEICO
22	18:1 ^{9 y 11}	TRANS-9-CIS-11 OCTADECENOICO	ELAIDICO
23	18:0	OCTADECANOICO	ESTEARICO

* EL NUMERO DE PICO CORRESPONDE AL DEL ESTANDAR UTILIZADO PARA LA IDENTIFICACION DEL ORDEN DE ELUCION DE LA COLUMNA (FIGURA 2).

presentaba el área mayor, para obtener así las proporciones en términos de porcentaje de los 12 ácidos restantes, siendo en este caso el C 16:0 el de mayor área.

Con los datos normalizados se procedió a calcular la media, la desviación estándar, los valores mínimo y máximo, el intervalo de confianza, porcentaje de los datos dentro de éste y el coeficiente de variación para los tiempos de retención y áreas normalizadas de cada uno de los ácidos grasos identificados, con el objeto de hacer un análisis cualitativo y cuantitativo. Dichos parámetros se pueden visualizar en las tablas 3 a 6.

Los tiempos de retención normalizados para todos los ácidos grasos muestran desviaciones estándar muy pequeñas en un rango de 0.0 a 1.02 y por tanto los coeficientes de variación también son pequeños, van desde 0.0 a 0.90%, lo que significa que la variación de los datos con respecto a la media (\bar{x}), fueron menores al 1%. Para todos los ácidos los valores dentro del intervalo de confianza son del 90 al 98%, excepto el ácido hexadecanoico C 16:0, considerado como el 100%.

La gráfica 1 representa los valores promedio para los tiempos de retención normalizados de 50 cromatogramas.

La cuantificación de los ácidos grasos de *K. ozaenae* se obtuvo del área de los picos en el cromatograma, que es proporcional a su concentración.

En orden de abundancia, el ácido graso hexadecanoico (C 16:0) resultó tener el valor más alto con una media de 100.0, le siguieron el cis-9 hexadecanoico (C 16:1⁹) con 66.29, el Trans-9 octadecanoico y cis-11 octadecanoico (C 18:1^{9 y 11}) con 40.01, tetradecanoico (C 14:0) con 28.86, 3-hidroxitetradecanoico (3-OH C 14:0) con 10.77, pentadecanoico (C 15:0) con 3.4076, heptadecanoico (C 17:0) con 2.29, 2-hidroxitetradecanoico (2-OH C 14:0) con 1.95, octadecanoico (C 18:0) con 1.48, dodecanoico (C 12:0) con 0.61, cis-9,10-metilenhexadecanoico (C 17:0 cis) con 0.42, cis-9-octadecanoico (C 18:1⁹) con 0.42 y el cis-9,12-octadecanoico (C 18:2^{9,12}) con 0.21, (Gráfica 2).

TABLA 3

**MEDIDAS ESTADISTICAS DE LOS TIEMPOS
DE RETENCION NORMALIZADOS.**

NUM. PICO	AC. GRASO	N	MEDIA	DESVIACION ESTANDAR (\bar{x})	COEF. DE VARIACION ($\frac{s}{\bar{x}}$)	VALOR MINIMO	VALOR MAXIMO
3	12:0	50	42.64	0.21	0.50	42.19	43.18
7	14:0	50	69.37	0.15	0.22	69.07	69.71
10	15:0	50	83.90	0.29	0.35	83.23	84.56
11	14:0 -2OH	50	85.39	0.31	0.36	84.69	86.19
12	14:0 -3OH	50	89.47	0.24	0.27	88.97	90.01
14	16:1 ⁹	50	95.76	0.14	0.14	95.37	95.96
15	16:0	50	100.00	0.00	0.00	100.00	100.00
17	17:0 cis	50	110.76	0.40	0.36	109.82	111.63
18	17:0	50	114.02	1.02	0.90	113.00	120.67
20	18:2 ^{9,12}	50	122.48	0.41	0.34	121.42	123.27
21	18:1 ⁹ cis	50	124.01	0.38	0.31	123.01	124.69
22	18:1 ^{9,11} trans-cis	50	125.35	0.21	0.17	124.79	125.68
23	18:0	50	128.55	0.41	0.32	127.50	129.33

N = NUMERO DE CROMATOGRAMAS

TABLA 4
MEDIDAS ESTADISTICAS DE LAS AREAS
NORMALIZADAS.

NUM. PICO	AC. GRASO	N	MEDIA	DESVIACION ESTANDAR (Σ)	COEF. DE VARIACION (Σ)	VALOR MINIMO	VALOR MAXIMO
3	12:0	50	0.61	0.22	36.23	0.38	1.60
7	14:0	50	28.86	7.30	25.31	20.03	63.67
10	15:0	50	3.41	1.07	31.36	1.63	5.89
11	14:0 -2OH	50	1.95	0.90	45.87	0.66	4.72
12	14:0 -3OH	50	10.77	4.67	43.37	3.03	24.62
14	16:1 ⁹	50	66.29	13.40	20.22	33.96	98.86
15	16:0	50	100.00	0.00	0.00	100.00	100.00
17	17:0 cis	50	0.42	0.30	71.14	0.10	2.02
18	17:0	50	2.29	0.70	30.63	1.15	3.66
20	18:2 ^{9,12}	50	0.21	0.08	35.86	0.06	0.51
21	18:1 ⁹ cis	50	0.42	0.18	43.67	0.15	1.02
22	18:1 ^{9,11} trans-cis	50	40.01	10.42	26.05	24.08	97.34
23	18:0	50	1.48	0.42	28.20	0.93	3.33

N = NUMERO DE CROMATOGRAMAS

TABLA 5
INTERVALOS DE CONFIANZA PARA LOS TIEMPOS
DE RETENCION NORMALIZADOS.

NUM. PICO	AC. GRASO	LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR	% DENTRO DEL INTERVALO
3	12:0	42.22	43.06	90
7	14:0	69.07	69.67	94
10	15:0	83.32	84.48	94
11	14:0 -20H	84.77	86.00	94
12	14:0 -30H	88.99	90.45	92
14	16:1 ⁹	95.49	96.04	92
15	16:0	100.00	100.00	100
17	17:0 cis	109.96	111.55	94
18	17:0	111.97	116.07	98
20	18:2 ^{9,12}	121.65	123.30	96
21	18:1 ⁹ cis	123.24	124.77	96
22	18:1 ^{9y11} trans-cis	124.93	125.77	96
23	18:0	127.73	129.36	96

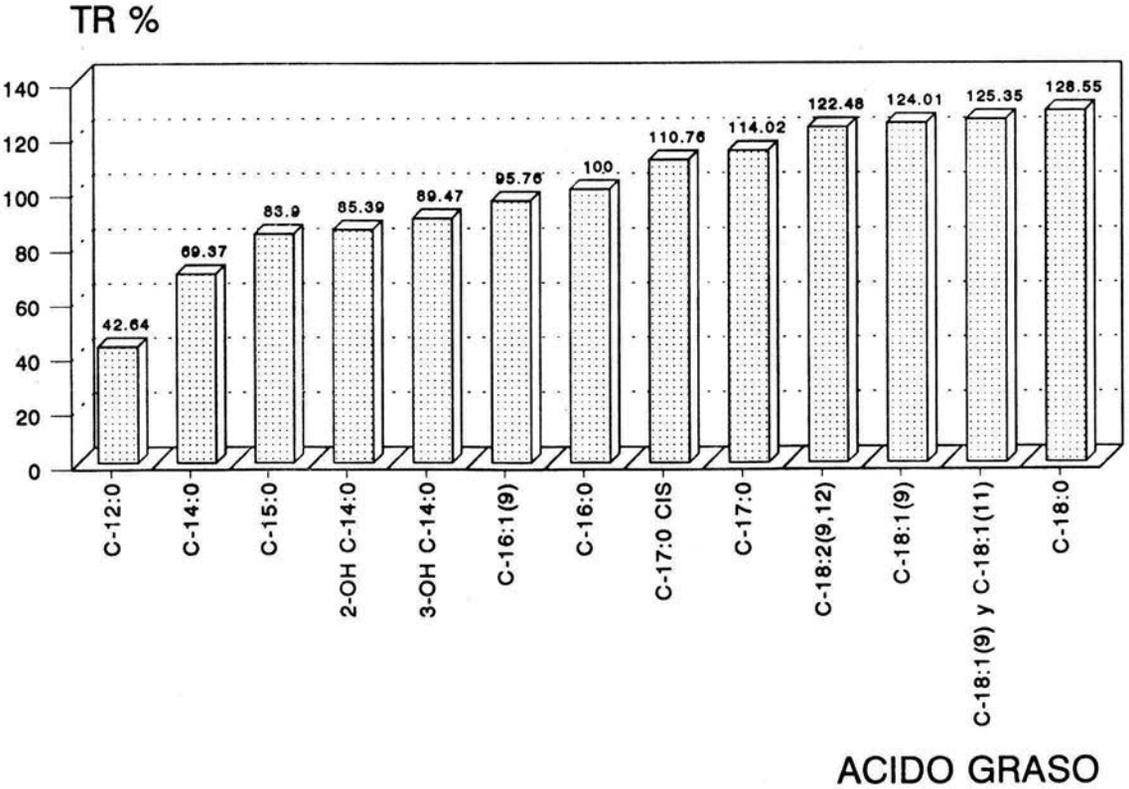
INTERVALOS CONSTRUIDOS DENTRO $\bar{x} \pm 2s$

TABLA 6
INTERVALOS DE CONFIANZA PARA LAS AREAS
NORMALIZADAS.

MUM. PICO	AC. GRASO	LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR	% DENTRO DEL INTERVALO
3	12:0	0.17	1.06	94
7	14:0	14.25	43.47	96
10	15:0	1.27	5.55	98
11	14:0 -2OH	0.16	3.75	96
12	14:0 -3OH	1.43	20.11	96
14	16:1 ⁹	39.49	93.09	92
15	16:0	100.00	100.00	100
17	17:0 cis	0.00	1.03	96
18	17:0	0.89	3.69	100
20	18:2 ^{9,12}	0.06	0.37	96
21	18:1 ⁹ cis	0.05	0.78	96
22	18:1 ^{9,11} trans-cis	19.16	60.85	98
23	18:0	0.64	2.31	96

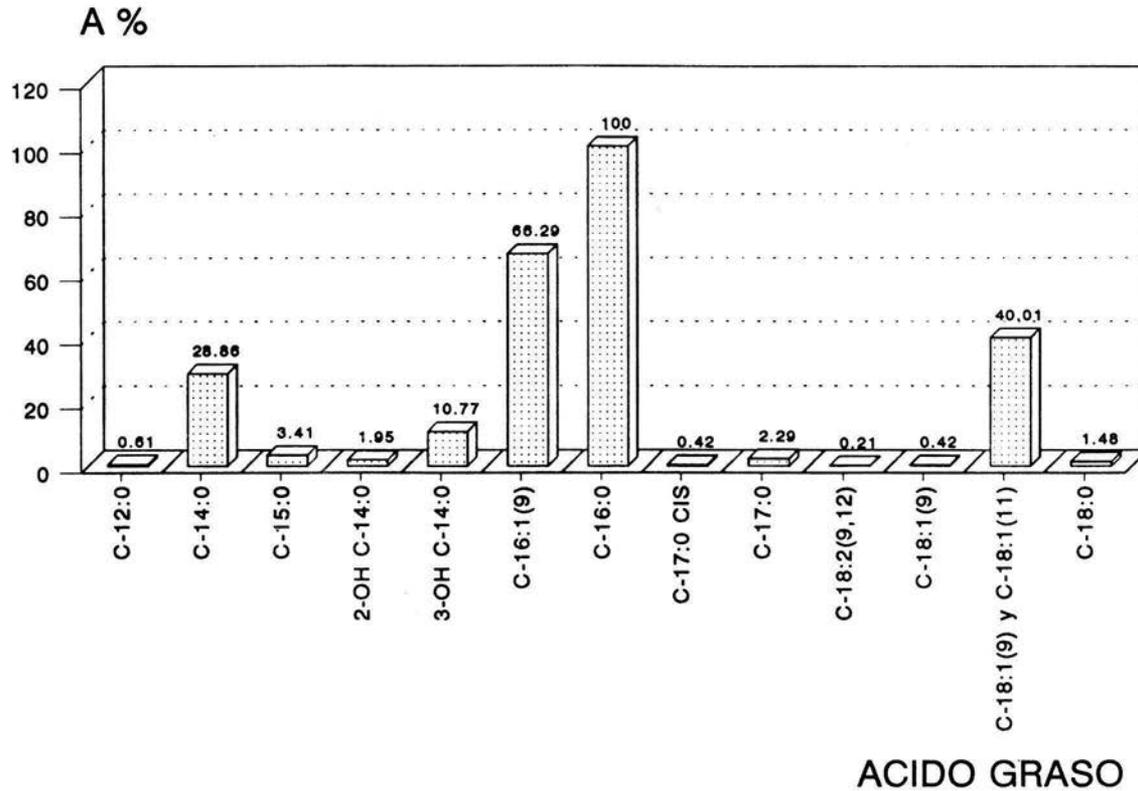
INTERVALOS CONSTRUIDOS DENTRO $\bar{x} \pm 2S$

PROMEDIOS DEL TIEMPO DE RETENCION DE LOS ACIDOS GRASOS DE Klebsiella ozaenae



GRAFICA 1

PROMEDIOS DE LAS AREAS DE LOS ACIDOS GRASOS DE *Klebsiella ozaenae*



GRAFICA 2

Las áreas normalizadas de los 13 ácidos grasos muestran desviaciones estándar de 0.0 a 13.40, coeficientes de variación de 20.22 a 71.14% , lo que demuestra una variabilidad importante en los resultados, a pesar de ello el 96.46% de los datos normalizados cayeron dentro de los intervalos de confianza (Tabla 6). En 11 de los 13 ácidos grasos, los porcentajes fueron de 96 a 100% , exceptuando a los picos 3 y 14 con valores de 94 y 92% respectivamente.

El análisis cromatográfico fué complementado con las siguientes pruebas adicionales:

- Bioquímicas tradicionales efectuadas al inicio y final de este trabajo, comprobándose la autenticidad y viabilidad de la bacteria.
- API 20E, se realizó al finalizar el estudio, estas micropruebas bioquímicas solo nos llevaron a resultados "probables" en la identificación a escoger entre 2 especies K. ozaenae y K. pneumoniae, lo que hizo necesario realizar pruebas adicionales de manera tradicional para dilucidar la determinación, la cuál se prolongó y la hizo más tardía.

9 DISCUSION

Se identificaron 13 ácidos grasos que caracterizan a K. ozaenae, en comparación con los 26 que contiene el estándar empleado, (Tabla 7).

Las áreas y tiempos de retención se normalizaron con objeto de eliminar la variación que pudo existir en la medición de la muestra. El ácido graso C 16:0 fué el que siempre presentó las áreas más altas en relación con los demás, confirmándose lo reportado en la literatura (26) (14), que este ácido es característico de la familia Enterobacteriaceae, y por lo tanto de K. ozaenae.

El hecho de que el 94.77% de los tiempos de retención normalizados para los 13 ácidos grasos obtenidos, cayeran dentro de los intervalos de confianza y gracias a sus bajos coeficientes de variación (menor al 1%) nos permitió identificar claramente los ácidos grasos presentes en K. ozaenae, mostrando que no hubo solapamiento de picos, debido a la buena separación de la columna y las condiciones idóneas en la programación del detector e integrador (55) (38).

La abundancia de ácidos grasos en orden creciente por número de pico fué: 20, 21, 17, 3, 23, 11, 18, 10, 12, 7, 22, 14 y 15. El porcentaje de variación con respecto a la media, que se observa en los datos de áreas normalizadas, depende no sólo de la técnica empleada, de los métodos de detección e integración ó de la concentración y cantidad de la muestra, sino también de las características físicas y químicas de los ácidos grasos y sus ésteres metílicos (55). Las cadenas de carbonos de los ácidos grasos con número de pico 3, 7, 10, 15, 18 y 23 (Tablas 5 y 6), son saturadas, no tienen ramificaciones, ni dobles ligaduras, hidroxilaciones, ni metilaciones que pudieran hacerlos inestables químicamente. Los picos 11, 12, 14, 17, 20, 21 y 22 representan a los ácidos grasos que por ser insaturados, pueden sufrir modificaciones estructurales y configuracionales como las ya

T A B L A 7

AUSENCIA PRESENCIA DE LOS ACIDOS GRASOS DE Klebsiella ozaenae CON RESPECTO A UNA MEZCLA ESTANDAR DE ESTERES METILICOS BACTERIANOS

ESTANDAR (PICO No.)	<u>K. ozaenae</u> (0=AUSENCIA X=PRESENCIA)
1	0
2	0
3	X
4	0
5	0
6	0
7	X
8	0
9	0
10	X
11	X
12	X
13	0
14	X
15	X
16	0
17	X
18	X
19	0
20	X
21	X
22	X
23	X
24	0
25	0
26	0

mencionadas. Los picos 14, 21 y 22 tienen una doble ligadura; el 11 y el 12 son hidroxiácidos, el pico 17 es un ácido graso metilado, además de tener una doble ligadura; el pico 20 corresponde a una cadena de 18 carbonos con 2 dobles enlaces, es decir con un mayor grado de insaturación.

Estas características les confieren inestabilidad, lo cuál se ve remarcado por el incremento de la polaridad debido a la metilación en el proceso de esterificación (21). La mayor polaridad de los ácidos grasos los hace más afines a la fase estacionaria de la columna cromatográfica, y su acarreo por la fase móvil pudo ser afectado. El tipo de columna empleado para el análisis y su tiempo de uso, también pudo influir en los resultados, debe tenerse entonces especial cuidado en considerar su vida media (58) (55).

Los resultados establecen una variabilidad del 20 al 28% para los picos 7, 14, 22 y 23; del 30 al 36% para los picos 3, 10, 18 y 20; del 40 al 46% para los picos 11, 12 y 21. De 0% para el pico 15 y de 71% para el pico 17. El pico 15 fué el más abundante y de variación no significativa, por lo que se consideró como el 100% para normalizar los valores de los otros 12 ácidos grasos determinados en este estudio. La alta variabilidad no se debió a una dispersión general de los datos sino a casos aislados en algunos cromatogramas, con valores extremos por arriba ó debajo de la media, como sucedió con el pico 17, con 2 áreas normalizadas extremas, 2.02 y 1.28 de las 50 obtenidas. Este pico tuvo el coeficiente de variación mayor (71%).

También debemos considerar que los valores de las medias para las áreas de retención normalizadas, fueron pequeñas para la mayoría de los ácidos grasos de K. ozaenae, 8 de ellos tienen valores entre 0.21 y 3.41, los 4 restantes con resultados que van desde 10.77 hasta 66.29 y con frecuencias de tan solo uno para cada valor. Cantidades pequeñas pudieron incrementar el grado de variación de los resultados, debido a la cantidad y concentración de la muestra inyectada, aspecto determinante para un buen

análisis. La inyección y medición manual de la muestra debe estandarizarse y hacerse con rapidez para que no influya considerablemente en los resultados (38) (55).

Sin embargo el 96.46% de los resultados cayeron dentro de los intervalos de confianza, determinando así su validez. Es posible que exista además una isomería de algunos de los ácidos grasos, que no fué resuelta por la columna de separación utilizada y que puede haber incrementado la variabilidad de los resultados, denotando que dentro de la misma especie existe una diferenciación importante que nos lleva a pensar en un perfil más detallado y preciso que conduzca a una identificación a nivel de subespecies ó biotipos (28).

Los resultados de los tiempos de retención normalizados concuerdan con lo reportado por Yañez (1992),(56) para los ácidos grasos correspondientes.

El análisis cromatográfico de una muestra, bajo las condiciones mencionadas en el método, se llevó a cabo en aproximadamente 35 minutos, el proceso total desde el cultivo bacteriano hasta la extracción de los ésteres metílicos se hizo en aproximadamente 48 hrs. Esto quiere decir que la cromatografía gas líquido fué un método rápido y eficaz, con una reproducibilidad mayor al 95%, en relación con las pruebas bioquímicas tradicionales que consumen más tiempo, material y trabajo de laboratorio (19). Recientemente han aparecido en el mercado métodos de identificación, que pretenden minimizar estos inconvenientes, tal es el caso del sistema API que provee una serie de micropruebas bioquímicas, que prometen resultados en una identificación ideal entre 24 a 48 hrs aproximadamente. Pero si le agregamos 24 a 48 hrs extras para realizar ciertas pruebas adicionales, tendríamos un mínimo total de 48 hrs, aunado al hecho de que en ocasiones es difícil considerar positiva ó negativa una microprueba a causa de las variaciones en los vires de color y al resultado de códigos inexistentes que complican la identificación.

La cromatografía gas líquido es una alternativa muy utilizada en

identificación y taxonomía bacteriana (39) incluyendo a las enterobacterias (26). Las bacterias son responsables de una gran cantidad y diversidad de enfermedades que dañan al hombre. Un diagnóstico rápido y preciso es determinante para su prevención, tratamiento y erradicación.

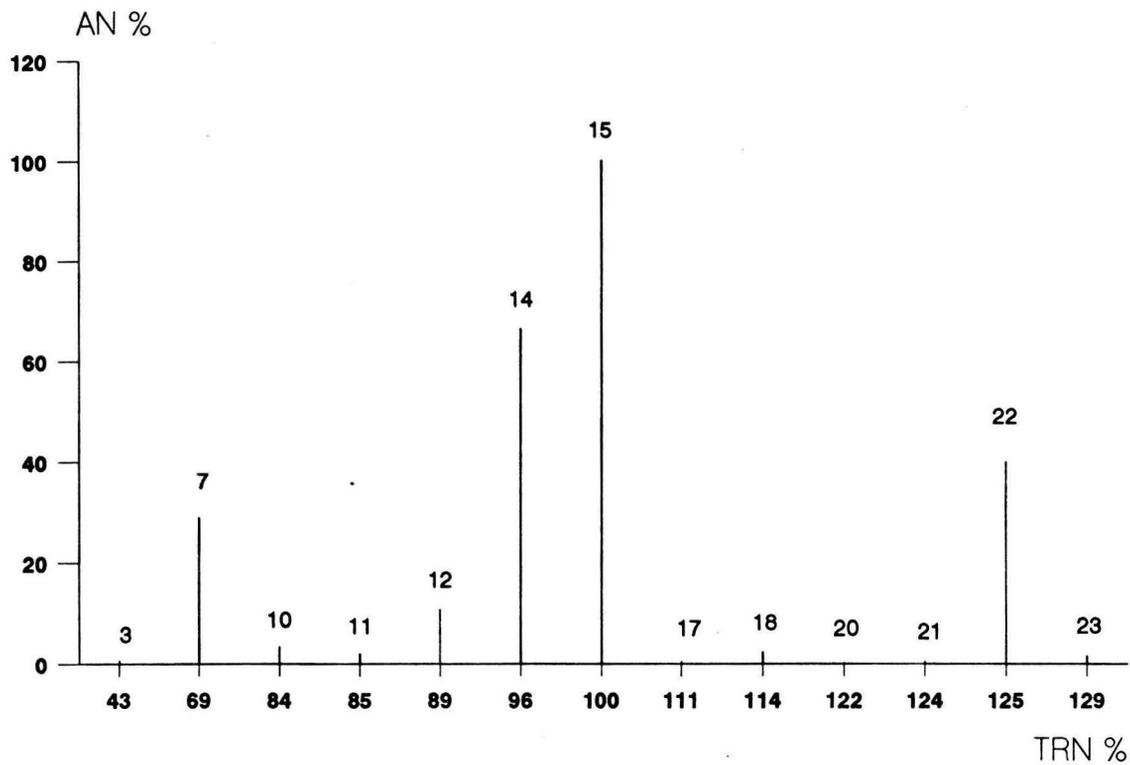
Por lo tanto esta técnica alternativa puede ser de mucha utilidad en áreas como medicina y clínica donde se necesita contar con un diagnóstico y prescripción rápidos con un bajo costo. Otra ventaja de la técnica es que se pueden manejar un gran número de muestras, se utilizan pequeñas cantidades de biomasa y se pueden detectar concentraciones nanogramáticas.

El análisis cromatográfico de los ácidos grasos de K. ozaenae permitió determinar su perfil y aportar información de la composición química de sus lípidos totales (50).

La composición de los ácidos grasos que se obtuvo de un total de 50 repeticiones se compone de 13 ácidos grasos; saturados, insaturados, metilados e hidroxilados, característicos de enterobacterias como lo menciona la literatura (26) (10) (14).

Estos 13 ácidos grasos con sus tiempos de retención normalizados y con sus áreas normalizadas respectivamente, representan el perfil cromatográfico de los ácidos grasos de K. ozaenae, que es característico solo para esta especie. (Figura 4)

PERFIL DE ACIDOS GRASOS DE Klebsiella ozaenae



* EL NUMERO DEL PICO CORRESPONDE AL DEL ESTANDAR TEORICO

FIGURA 4

10 CONCLUSIONES

- Se obtuvo el perfil de los ácidos grasos de Klebsiella ozaenae a partir de 50 cromatogramas. Consta de 13 picos representativos de dichas sustancias aisladas e identificadas por Cromatografía de gases.
- La precisión del método fué de 95.6% considerando los tiempos de retención y las áreas de retención normalizadas; es decir que es reproducible en más del 95%.
- La técnica es rápida, de resultados confiables y de bajo costo en análisis rutinarios.
- En un futuro inmediato puede emplearse en clínica, ingeniería sanitaria, industria alimentaria, etc., para identificar microorganismos del ambiente causantes de enfermedades y fuentes de contaminación, así como en quimiotaxonomía. Para lo que es necesario contar con un banco de datos con los perfiles de estos organismos, el presente trabajo es una pequeña aportación que puede ser utilizado en México a resolver este tipo de problemas.
- La técnica aún puede optimizarse, o variar en sus resultados, acorde a las condiciones en que se lleve a cabo en diferentes laboratorios, por lo que es necesario estandarizarla perfectamente para que pueda ser utilizada en otros lugares.

11 SUGERENCIAS Y RECOMENDACIONES

- Probar la técnica con muestras del ambiente y demás áreas mencionadas, para poder a futuro implementarla como una alternativa de identificación.
- Seguir incrementando el banco de datos mediante el análisis de ácidos grasos de otras especies, para enriquecerlo y tener mayor posibilidad de identificar una muestra al comparar su cromatograma con los perfiles almacenados.
- Poner especial cuidado en los procesos de esterificación y extracción de los ésteres metílicos, pues son críticos en la aplicación de la técnica cromatográfica.

1. ACADEMIA DE PROFESORES DEL LABORATORIO DE BACTERIOLOGIA MEDICA ENCB-IPN. (1983). Manual de laboratorio de bacteriología médica. 4a. ed. México.
2. ALVIN, CH., LARSSON, L., MAGNUSSON, M., MARDH, P., ODHAM, G., and WESTERDAHL, G. (1983). Determination of fatty acids and capillary gas chromatography: Analysis of *Mycobacterium gordonae* and *M. scrofulaceum* J. Gen. Microbiol. 129:401-405.
3. AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION ATCC (1982). Catalogue of strains. Rockville Md.
4. AMSTEIN, CH., and HARTMAN, P. (1973). Differentiation of some Enterococci by gas chromatography. J. Bacteriol. 113:38-41.
5. ATHALYE, M., NOBLE, W.C. and MINNIKIN, D.E (1985). Analysis of cellular fatty acids by gas chromatography as a tool in the identification of medically important Coryneform bacteria. J. appl. Bacteriol. 58:507-512.
6. BARKER, R. (1971). Organic chemistry of biological compounds. 2a. ed. Prentice-Hall, Inc, Englewood Cliffs, New Jersey. USA.
7. BENEDI, V.J., CIURANA, B. and TOMAS, J.M. (1989). Isolation and characterization of *Klebsiella pneumoniae* unencapsulated mutants. J. Clin. Microbiol. 27:82-87.
8. BERGAN, T. (1984). Methods in Microbiology. Academic Press. Inc. N.Y.
9. BERNARD, D., DAVIS, M.D. (1973). Microbiology. Including Immunology and Molecular Genetic. 2a. ed. Harper International Edition.
10. BOE, B., and GJERDE, J. (1980). Fatty acid patterns in the classification of some representatives of the families *Enterobacteriaceae* and *Vibrionaceae*. J. Gen. Microbiol. 116:41-49.
11. BROOKS, J.B., DANESHVAR, M.I., HABERBERGER, R.L. and MIKHAIL, I.A. (1990). Rapid diagnostic of tuberculosis meningitis by frequency-pulsed electron-capture gas-liquid chromatography detection of carboxylic acids in cerebrospinal fluid. J. Clin. Microbiol. 28:989-997.
12. BROOKS, J.B., MOSS, C.W., and DOWELL, V.R. (1969). Differentiation between *Clostridium sordellii* and *C. bifermentans* by gas chromatography. J. Bacteriol. 100:528-530.
13. BURCHFIELD, H.P. and STORRS, E.E. (1970). Biochemical applications of gas chromatography. 4a. ed. Academic Press. USA.

14. CECCHINI,G.L., and O'BRIEN,R.T. (1968) Detection of *Escherichia coli* by gas chromatography. J. Bacteriol. 95:1205-1206.
15. COOKSON,B., TALSANIA,H., CHINN,S., PHILLIPS,I. (1989). A Qualitative and quantitative study of the cellular fatty acids of *Streptococcus milleri* with capillary gas chromatography. J. Gen. Microbiol. 135:831-838.
16. DAVIS,B.D., DALBECO,R., EISEN,H.N., GINBERG,H.S. (1985). Tratado de Microbiología. Salvat. México.
17. DRUCKER,D.B. (1981). Microbiological applications of gas chromatography. Cambridge Univ. Press.
18. EDWARDS,P.R., and EWING,W.H. (1972). Identification of *Enterobacteriaceae*. 3a. ed. Burgess Publishing, Co. Mineapolis Minn.
19. EEROLA,E., and LEHTONEN,O. (1988). Optimal Data processing procedure for automatic bacterial identification by gas liquid chromatography of cellular fatty acids. J. Clin. Microbiol. 26:1745-1753.
20. FREIFELDER,D. (1981). Técnicas de Bioquímica y Biología Molecular. 1a. ed. Reverté,S.A. España.
21. GLASS,R.L. (1971) Alkohlisis, saponification and the preparation of fatty acids methylesters. Lipids. 6:919.
22. GOODFELLOW,M., and MINNIKIN,D.E. (1985). En: A Qualitative a quantitative study of the cellular fatty acids of *Streptococcus milleri* with capillary gas chromatography. B. Cookson et. al 1989. J. Gen. Microbiol. 135:831-838.
23. GORAN,O., LENNART,L. and ANDERS,M. (1984). Gas chromatography, mass spectrometry applications in microbiology. Plenum Press. N.Y.
24. GROB,R.L. (1977). Modern practice of gas chromatography. Jhon Wiley & Sons. USA.
25. GUDZINOWICZ,B.J. (1976). Fundamentals of integrated gas chromatography-mass spectrofotometric Part. G.C. Vol. 7 Chromatographic Sciencies Series. Marcel Dekker Inc., USA.
26. HAUSLER,J., RICHTER,V.(1983a). A process of identification of microorganism using chromatography. UK Patent Application GB 2 121-434 B.
27. HAUSLER,J., RICHTER,V.(1983b). Identification of bacteria of the family *Enterobacteriaceae* using gas chromatography. 12th. International Symposium on Microbiology. Association and Interaction in Food. Publishing House of the Hungarian Academy of Sciences Budapest.

28. HAUSLER, J. (1987a). Identification of indicators of fecal pollution by *Enterobacteriaceae* using gas chromatography. V Curso Simposio Internacional sobre Biología de la Contaminación, UNAM, SEDUE, UPN. México.
29. HAUSLER, J. (1987b). Determination of the organic acids content by gas chromatography as a rapid and accurate identification method for bacteria. V Curso Simposio Internacional sobre Biología de la Contaminación. UNAM, SEDUE, UPN. México.
30. HOLMES, B., WIULLCOX, W.R. and LAPAGE, S.P. (1978). Identification of *Enterobacteriaceae* by the API 20E system. J. Clin. Pathol. 31:22-30.
31. IUPACH, International Union for Pure and Applied Chemical. (1965). USA.
32. JENNINGS, W.G. (1981). Applications of glass capillary gas chromatography. Vol. 15, II Series. Chromatography-Science Series, Marcel Dekker Inc. USA.
33. KRIEG, N.R., and HOLT, J.G. Editors (1984). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 9 th. ed. Williams & Wilkins, Baltimore/London.
34. LARSSON, L., and MARDH, P.A. (1977). En: Determination of fatty acids and carbohydrate monomers in micro-organism by means of glass capillary gas chromatography: Analysis of *Mycobacterium gordonae* and *M. scrofulaceum*. Ch. Alvin et al. (1983). J. Gen. Microbiol. 129:401-405.
35. LEHNINGER, A.L. (1979). *Bioquímica*. 2a. ed. Omega, Barcelona.
36. LENNETTE, E.H., BALOWS, A., HAUSLER, W.J., SHADOMY, H.J. (1987). *Manual de microbiología clínica*. Médica Panamericana Buenos Aires.
37. Mac FADIN, J.F. (1976). *Biochemical test for identification of medical bacteria*. The Williams & Wilkins Co. Baltimore, USA.
38. Mc. NAIR, H.M. (1981). *Cromatografía de gases*. Traducido por Xorge A. Domínguez, Sría. Gral. ONU. Ed. Eva V. Chesneau. Washington, D.C.
39. MITRUKA, B.M. (1975). En: Fatty acids patterns in the clasification of some representatives of the families *Enterobacteriaceae* and *Vibrionaceae*. B. Boe et al. (1980). J. Gen. Microbiol. 116:41-49.
40. MORRISON, R.T., BOYD, R.N. (1990). *Química orgánica*. 5a. ed. Addison-Wesley Iberoamericana.

41. MOSS,C.W., and NUÑEZ-MONTIEL,O.L. (1982). Analysis of short-chain acids from bacteria by gas-liquid chromatography with a fused-silica capillary column. J. Clin. Microbiol. 15:308-311.
42. MOSS,C.W., DEES,S.B. and GUERRANT,G.O. (1980). Gas-liquid chromatography of bacterial fatty acids with a fused-silica capillary column. J. Clin. Microbiol. 12:127-130.
43. MURRAY,K.A., CLEMENTS,B.H. and KEAS,S.E. (1981). *Klebsiella ozaenae* Septicemia associated with Hansen's Disease. J. Clin. Microbiol. 14:703-705.
44. QUENTIN,N., MYRVIK,Ph.D. (1974). Fundamentals of medical Bacteriology and Micology for students of Medicine and related Sciencies. Lea & Febiger. USA.
45. RAKOFF,H. and ROSE,N.C. (1977). Química orgánica fundamental. Limusa, México.
46. RAMIREZ,G.P., ROBLES,V.E., RIVERA,A.V., GALLEGOS,N.E., GONZALEZ,A.M.E. (1989). Aplicación de la cromatografía de gases en la identificación ó clasificación de bacterias involucradas en problemas de contaminación ambiental. 1er. Simposio Internacional de Química Ambiental y III Reunión de Investigadores Universitarios en Contaminación Ambiental. UNAM.
47. RIVERA,A.V.M. (1991). Análisis de los ésteres metílicos de los ácidos grasos celulares de 6 especies de la familia *Enterobacteriaceae* por cromatografía gas-líquido. Tesis Doctorado, Facultad de Ciencias UNAM.
48. ROBLES,V.E., RAMIREZ,G.P., GONZALEZ,A.M.E., GALLEGOS,N.E., RIVERA,A.V., ZAVALA,M.M.(1988). Implementación de la técnica de cromatografía de gases para la identificación de enterobacterias. Memorias del VIII Coloquio de Investigación. ENEPI-UNAM.
49. SASSER,M. (1990). Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. Technical Note 101. Microbial Identification System (MIDI), Hewlett Packard.
50. SENEZ,J.C. (1976). Microbiología general. 1a. ed. española, P. Sanz Nicolás y J. Pérez Silva. Alhambra,España.
51. SOKAL,R.R. y JAMES,R.F. (1979). Biometría. Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica. H. Blume Madrid España.
52. STARR,M.P., STOLP,H., TRUPER,H.G., BALOWS,A., SCHLEGEL,H.G. Editors. (1981). The Prokaryotes. A handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria. Springer-Verlag. Berlín Heidelberg N.Y.

53. STORCH DE GRACIA, J.M. (1975). Fundamentos de la cromatografía de gases. 2a. ed. Alhambra, Madrid.
54. VYES, A., CALLEWAERT, W., WAELKENS, E., ABBEELE, K. van den. (1989). Application of gas-liquid chromatography to the routine identification of nonfermenting Gram-negative bacteria in clinical specimens. J. Clin. Microbiol. 27:1538-1542.
55. WILLARD, H.H., MERRITT, L.L.JR. and DEAN, J.A. (1971). Métodos instrumentales de análisis. 4a. Impresión. CECSA, México.
56. YAÑEZ, N.I. (1992). Análisis por cromatografía gas-líquido de los ácidos grasos celulares totales de *Enterobacter agglomerans*. Tesis Biología, ENEPI-UNAM.
57. ZAVALA, M.J.M. (1990). Implementación de una técnica por cromatografía de gases para la identificación de enterobacterias, utilizando como perfil cromatográfico el contenido de ácidos grasos. Tesis Biología, ENEPI-UNAM.
58. ZWEIG, G., SHERMA, J. Editors. (1986). Handbook of chromatography. 8a. ed. CRC-Series in Chromatography. CRC Press, Inc. Boca Ratón Florida.

A P E N D I C E

TABLA 2
AREAS Y TIEMPOS DE RETENCION NORMALIZADOS
DE *Klebsiella ozaenae*

Num. de Cromato grama. →		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Num. de pico	Ac. Graso	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
3	12:0	43.11	43.11	42.69	42.91	42.64	42.89	42.65	42.72	42.75	42.86
		0.64	0.64	0.51	0.57	0.52	0.85	0.85	0.54	0.42	0.89
7	14:0	69.69	69.68	69.37	69.55	69.37	69.61	69.39	69.42	69.40	69.57
		31.38	31.35	25.78	26.57	26.29	34.76	26.87	26.72	24.06	39.36
10	15:0	84.35	84.34	83.73	84.18	83.70	84.22	83.75	84.00	83.88	84.35
		3.53	3.47	2.52	2.70	3.27	3.37	2.06	2.69	2.44	4.06
11	14:0-20H	85.92	85.92	85.23	85.70	85.22	85.77	85.27	85.50	85.40	85.84
		1.86	1.80	1.62	1.89	1.64	1.80	1.41	2.01	1.56	3.80
12	14:0-30H	89.85	89.84	89.43	89.74	89.36	89.74	89.45	89.57	89.47	89.88
		11.72	11.76	11.91	13.17	10.27	9.89	11.29	10.55	8.87	20.57
14	16:1 ⁹	95.90	95.90	95.73	95.86	95.75	95.88	95.76	95.80	95.78	95.96
		70.73	71.30	65.63	66.55	66.63	67.39	67.45	66.08	67.41	98.86
15	16:0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
		100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
17	17:0 cis	111.19	111.17	110.41	111.01	110.35	111.08	110.47	111.15	110.64	111.63
		0.26	0.14	0.37	0.36	0.37	0.30	0.31	0.74	0.40	2.02
18	17:0	114.29	114.30	113.52	114.12	113.49	114.20	113.62	113.99	113.76	114.50
		2.07	2.03	1.90	1.87	2.37	1.72	1.41	1.86	1.86	2.89
20	18:2 ^{9,12}	122.93	122.88	122.04	122.73	122.01	122.80	122.12	122.57	122.33	123.13
		0.25	0.19	0.25	0.25	0.26	0.16	0.25	0.24	0.24	0.34
21	18:1 ⁹ cis	124.37	124.37	123.53	124.21	123.54	124.31	123.68	124.07	123.84	124.61
		0.27	0.27	0.41	0.49	0.39	0.34	0.21	0.58	0.54	0.88
22	18:1 ^{9,11} trans-cis	125.44	125.43	125.00	125.42	125.03	125.33	125.14	125.34	125.20	125.64
		36.85	36.89	35.54	36.49	37.65	26.66	39.82	33.87	39.37	29.31
23	18:0	128.92	128.94	128.04	128.74	128.04	128.82	128.17	128.61	128.34	129.18
		1.12	1.13	1.32	1.26	1.40	0.93	1.26	1.24	1.23	1.51

TABLA 2 (continuación)
AREAS Y TIEMPOS DE RETENCION NORMALIZADOS
DE *Klebsiella ozaenae*

Num. de Cromato grama.		11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Num. de pico	Ac. Graso	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
3	12:0	42.75	42.54	42.20	42.19	43.18	42.88	42.88	42.69	42.44	42.64
		0.43	0.43	0.53	0.52	0.60	0.54	0.52	0.56	0.43	0.61
7	14:0	69.41	69.34	69.07	69.07	69.71	69.50	69.50	69.40	69.16	69.38
		24.24	23.45	25.64	25.64	27.79	27.09	27.10	31.71	21.80	29.03
10	15:0	83.97	83.90	83.23	83.23	84.56	84.22	84.22	84.16	83.62	84.01
		2.61	2.33	3.74	3.69	2.86	2.39	2.39	2.98	2.54	3.20
11	14:0-20H	85.48	85.41	84.69	84.76	86.19	85.73	85.72	85.67	85.06	85.46
		1.60	1.21	2.04	2.00	1.91	1.27	1.29	1.64	1.11	1.36
12	14:0-30H	89.55	89.42	88.97	88.97	90.01	89.68	89.67	89.66	89.14	89.51
		9.48	7.13	12.16	7.74	10.88	7.68	7.87	10.13	6.32	7.51
14	16:1 ⁹	95.79	95.76	95.59	95.51	95.92	95.86	95.86	95.87	95.40	95.83
		66.23	64.81	66.22	56.52	67.08	66.83	66.97	86.77	33.96	78.26
15	16:0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
		100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
17	17:0 cis	110.77	110.74	109.82	109.83	111.43	111.25	111.17	111.36	110.39	110.89
		0.27	0.25	0.39	0.39	0.10	0.36	0.11	0.48	0.41	0.38
18	17:0	113.92	113.86	113.00	113.00	114.65	114.27	120.67	114.31	113.55	114.09
		1.87	1.58	2.51	2.51	2.05	1.55	1.53	2.07	1.89	2.08
20	18:2 ^{9,12}	122.54	122.44	121.42	121.42	123.27	122.94	122.93	123.03	122.11	122.66
		0.21	0.20	0.24	0.24	0.06	0.21	0.20	0.17	0.23	0.08
21	18:1 ⁹ cis	124.04	124.01	123.01	123.01	124.69	124.41	124.40	124.48	123.66	124.22
		0.47	0.38	0.25	0.25	0.55	0.70	0.72	1.02	0.49	0.56
22	18:1 ^{9,11} trans-cis	125.31	125.24	124.79	124.79	125.68	125.48	125.47	125.57	125.17	125.46
		38.08	32.42	38.62	38.62	24.08	33.22	33.27	29.28	37.23	38.88
23	18:0	128.56	128.50	127.50	127.50	129.33	128.95	128.95	129.05	128.20	128.79
		1.13	1.08	1.39	1.36	1.26	1.15	1.05	1.53b	1.31	1.31

TABLA 2 (continuacion)
AREAS Y TIEMPOS DE RETENCION NORMALIZADOS
DE *Klebsiella ozaenae*

Num. de Cromato grama. →		21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Num. de pico	Ac. Graso	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
3	12:0	42.60	42.53	42.56	42.73	42.48	42.42	42.43	42.59	42.35	42.37
		0.42	0.42	0.45	0.79	0.49	0.42	0.50	0.49	0.45	0.38
7	14:0	69.26	69.25	69.27	69.48	69.24	69.18	69.21	69.26	69.11	69.11
		20.03	21.44	24.43	39.08	25.14	23.43	27.02	26.08	24.30	20.32
10	15:0	83.92	83.85	83.85	84.12	83.67	83.62	83.61	83.83	83.50	83.54
		2.29	3.73	5.10	4.77	4.79	4.17	4.17	5.89	2.90	4.25
11	14:0-20H	85.38	85.32	85.29	85.58	85.10	85.07	85.06	85.27	84.91	85.00
		0.66	0.96	1.06	4.11	1.53	1.24	1.79	1.10	1.02	0.81
12	14:0-30H	89.39	89.37	89.31	89.72	89.21	89.18	89.25	89.28	88.99	89.03
		3.97	5.85	5.47	19.96	8.36	7.11	9.77	6.07	3.03	4.64
14	16:1 ⁹	95.69	95.73	95.76	95.88	95.45	95.48	95.69	95.81	95.74	95.67
		46.74	65.41	78.37	86.23	36.67	40.72	58.71	81.62	80.40	65.69
15	16:0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
		100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
17	17:0 cis	110.82	110.84	110.65	111.02	110.41	110.38	110.36	110.63	110.24	110.27
		0.35	0.31	0.51	0.46	0.47	0.42	0.37	0.69	0.60	0.50
18	17:0	113.99	113.92	113.89	114.24	113.59	113.56	113.57	113.85	113.45	113.46
		1.60	2.58	3.32	3.06	3.03	2.66	2.69	3.66	3.49	2.82
20	18:2 ^{9,12}	122.58	122.51	122.44	122.83	122.17	122.14	122.13	122.41	121.93	121.93
		0.22	0.21	0.23	0.24	0.20	0.19	0.20	0.23	0.25	0.07
21	18:1 ⁹ cis	124.15	123.97	123.98	124.35	123.64	123.65	123.68	124.01	123.55	123.51
		0.54	0.23	0.45	0.54	0.15	0.24	0.25	0.39	0.45	0.18
22	18:1 ^{9,11} trans-cis	125.39	125.39	125.37	125.58	125.23	125.22	125.20	125.30	125.14	125.12
		34.60	39.37	46.01	49.50	40.75	41.81	42.70	31.86	39.91	38.95
23	18:0	128.69	128.63	128.52	128.94	128.20	128.19	128.17	128.51	128.06	128.04
		1.30	1.50	1.64	1.53	1.38	1.28	1.28	1.73	1.87	1.49

TABLA 2 (continuacion)
AREAS Y TIEMPOS DE RETENCION NORMALIZADOS
DE *Klebsiella ozaenae*

Num. de Cromato grama. →		31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Num. de pico	Ac. Graso	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
3	12:0	42.70	42.47	42.64	42.77	42.67	42.48	42.71	42.70	42.69	42.73
		0.46	0.47	0.60	0.60	0.53	0.63	0.45	0.46	0.63	0.58
7	14:0	69.38	69.22	69.39	69.45	69.41	69.30	69.39	69.39	69.42	69.41
		23.58	24.40	27.09	30.35	27.46	33.31	22.58	23.43	34.69	30.65
10	15:0	84.10	83.75	84.04	84.16	83.94	83.79	84.09	84.09	83.96	84.01
		3.90	4.65	3.91	4.92	3.91	5.09	4.34	4.30	4.79	5.04
11	14:0-20H	85.55	85.17	85.53	85.62	85.41	85.22	85.54	85.53	85.42	85.50
		1.06	1.74	2.10	1.63	2.01	2.63	1.44	1.49	2.61	1.97
12	14:0-30H	89.55	89.30	89.59	89.63	89.52	89.37	89.57	89.56	89.54	89.53
		5.81	8.66	11.52	8.71	10.49	11.79	6.82	7.01	13.08	10.23
14	16:1 ⁹	95.84	95.72	95.83	95.86	95.82	95.79	95.78	95.84	95.84	95.87
		66.72	66.33	68.12	85.62	68.64	79.15	48.70	66.13	70.96	86.85
15	16:0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
		100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
17	17:0 cis	111.05	110.54	111.00	111.34	110.81	110.58	111.01	111.00	110.82	110.88
		0.39	0.52	0.45	1.28	0.47	0.54	0.55	0.50	0.46	0.60
18	17:0	114.21	113.74	114.19	114.24	113.98	113.74	114.20	114.20	113.99	114.05
		1.15	3.00	2.60	3.33	2.61	3.12	2.88	2.74	3.32	3.35
20	18:2 ^{9,12}	122.85	122.29	122.85	122.87	122.54	122.31	122.81	122.78	122.58	122.65
		0.18	0.21	0.25	0.22	0.09	0.18	0.23	0.20	0.30	0.15
21	18:1 ⁹ cis	124.33	123.86	124.33	124.38	124.12	123.84	124.30	124.33	124.12	124.17
		0.21	0.33	0.76	0.55	0.44	0.39	0.53	0.47	0.47	0.38
22	18:1 ^{9,11} trans-cis	125.59	125.32	125.58	125.60	125.45	125.24	125.56	125.55	125.47	125.48
		37.66	40.62	40.36	51.63	41.02	32.51	38.97	39.20	52.37	50.37
23	18:0	128.93	128.36	128.91	128.94	128.63	128.37	128.90	128.92	128.66	128.73
		1.28	1.53	1.48	1.77	1.29	1.44	1.46	1.37	1.93	1.74

TABLA 2 (continuacion)

AREAS Y TIEMPOS DE RETENCION NORMALIZADOS

DE *Klebsiella ozaenae*

Num. de Cromato grama. →		41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
Num. de pico	Ac. Graso	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
3	12:0	42.68	42.41	42.78	42.43	42.83	42.53	42.33	42.53	42.52	42.64
		0.73	1.60	0.88	1.12	0.86	0.85	0.63	0.68	1.10	0.70
7	14:0	69.43	69.41	69.48	69.41	69.51	69.38	69.16	69.30	69.38	69.40
		30.26	63.67	30.63	45.96	32.61	31.10	26.27	26.91	40.78	29.30
10	15:0	83.95	83.58	84.13	83.55	84.15	83.89	83.39	83.69	83.67	83.97
		2.72	4.01	2.07	4.03	2.07	2.26	1.95	1.94	1.63	1.95
11	14:0-20H	85.44	85.09	85.60	85.04	85.62	85.37	84.90	85.19	85.19	85.46
		3.30	4.72	3.52	3.47	3.27	3.06	1.65	1.60	2.65	2.66
12	14:0-30H	89.62	89.42	89.75	89.33	89.74	89.61	89.09	89.35	89.42	89.61
		18.01	24.62	18.38	18.44	17.73	17.25	9.28	9.55	15.29	14.72
14	16:1 ⁹	95.79	95.93	95.85	95.37	95.83	95.78	95.52	95.76	95.80	95.81
		67.55	46.26	66.71	38.71	66.94	66.14	50.56	65.47	75.29	65.32
15	16:0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
		100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
17	17:0 cis	110.79	110.37	111.02	110.32	111.07	110.77	110.12	110.52	110.54	110.87
		0.27	0.39	0.20	0.41	0.15	0.20	0.19	0.19	0.15	0.19
18	17:0	113.97	113.51	114.22	113.48	114.20	113.95	113.27	113.65	113.67	114.07
		1.84	2.93	1.51	2.91	1.43	1.55	1.47	1.41	1.16	1.43
20	18:2 ^{9,12}	122.60	122.11	122.83	122.01	122.86	122.48	121.83	122.26	122.27	122.67
		0.21	0.51	0.17	0.38	0.15	0.06	0.18	0.20	0.32	0.18
21	18:1 ⁹ cis	124.10	123.69	124.38	123.56	124.38	124.15	123.40	123.80	123.89	124.25
		0.41	0.40	0.33	0.23	0.26	0.31	0.21	0.26	0.34	0.32
22	18:1 ^{9,11} trans-cis	125.42	125.45	125.57	125.08	125.51	125.47	125.01	125.36	125.46	125.56
		42.25	97.34	32.06	36.78	41.96	44.09	34.44	45.08	55.60	44.43
23	18:0	128.66	128.20	128.93	128.14	128.90	128.68	127.90	128.34	128.39	128.81
		1.40	3.36	1.36	2.70	1.35	1.47	1.40	1.54	2.59	1.52