



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ANÁLISIS DE LA VARIACIÓN INTERESPECÍFICA
BACTERIANA DE LOS ÉSTERES METÍLICOS DE LOS
ÁCIDOS GRASOS EN CINCO ESPECIES DE *Klebsiella*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)

P R E S E N T A :

PEDRO RAMÍREZ GARCÍA

DIRECTOR(A) DE TESIS: DRA. IRMA A. ROSAS PÉREZ

2001

00381

36



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.



*A mi pueblo, ese que sobrevive
en la sierra Tarahumara,
ese que sobrevive en las montañas
del sureste de México,
ese que no sabe que existo,
pero al que le debo' todo.*

*Con amor a mi esposa Patricia,
con quién comparto esos momentos
alegres y difíciles que nos hace vivir la vida.*

*A mis hijos Pedro, Anahí y Mariel,
quiénes siempre serán la alegría de la casa,
gracias por su confianza, cariño y admiración.*

A Chagua, por su disposición a apoyarnos siempre.

A mis hermanas y sus familias, con el cariño de siempre.

A Carmina y sus hijos que son la continuación de nuestra familia.

A mis amigos de siempre con gran sinceridad y afecto,

Dr. Carlos A. Eslava Campos, por su interés
y apoyo para el logro de este trabajo.

QFB Esperanza del S. Robles Valderrama, por el apoyo desinteresado
y por brindarme ese sentimiento de sincera amistad.

M. en C. Angel Durán Díaz, por su constante interés y apoyo
para concluir este trabajo.

Dr. Jiri Häusler, por paciencia en enseñarme su técnica
e implantarla en México y su guía durante mi estancia en su país.

Dr. Vladimir Richter, por su entusiasmo en mostrarme su trabajo
y su enseñanza en los numerosos recorridos por los museos de Praga.

Václav Tolma, por su interés en enseñarme el valor del trabajo técnico
y su gran calidad humana.

A mis colegas y colaboradores, esos que con sus críticas nos proponen y guían,
pero no aquellos que con sus críticas pretenden confundirnos o disminuirnos.

Índice

Resumen

1. Introducción

Métodos de identificación de bacterias	1
Composición de los ácidos grasos bacterianos	5
Identificación de microorganismos con base en sus ácidos grasos	7
Variabilidad de los ácidos grasos en Enterobacterias	11
Revisión del género <i>Klebsiella</i>	14
Planteamiento del problema	19
Objetivos	20

2. Materiales y Métodos

Perfiles cromatográficos patrón	21
Preparación del cultivo	21
Liofilización	23
Extracción y esterificación de los ácidos grasos	23
Análisis de los ácidos grasos esterificados	25
Análisis estadístico	26
Normalización	27
Medidas estadísticas descriptivas	27
Análisis discriminante	27
Análisis de conglomerados	28

3. Resultados

A. Análisis cromatográfico de ácidos grasos de especies tipo de <i>Klebsiella</i>	29
Análisis de correlación múltiple	30
Análisis discriminante	31
Ausencia-presencia de los ácidos grasos característicos de las cinco especies	32

B. Caracterización de ácidos grasos en especies de <i>Klebsiella</i> de origen clínico y ambiental	33
Análisis del perfil de ácidos grasos de las diferentes especies de <i>Klebsiella</i>	33
Validación del análisis utilizando áreas de ácidos grasos por los métodos de discriminantes y de conglomerados	33
Valores de área (abundancia relativa) de los ácidos grasos, expresada en porcentajes para identificar especies de <i>Klebsiella</i>	36
4. Discusión	54
5. Conclusiones	61
6. Bibliografía	63
ANEXO	71

Índice de figuras

1. Distribución de los diferentes grupos de ácidos grasos en especies tipo de <i>Klebsiella</i>	38
2A. Distribución de las áreas normalizadas (%) de cada ácido graso en <i>K. ozaenae</i>	40
2B. Distribución de las áreas normalizadas (%) de cada ácido graso en <i>K. pneumoniae</i>	41
2C. Distribución de las áreas normalizadas (%) de cada ácido graso en <i>K. oxytoca</i>	42
2D. Distribución de las áreas normalizadas (%) de cada ácido graso en <i>K. planticola</i>	43
2E. Distribución de las áreas normalizadas (%) de cada ácido graso en <i>K. rhinoscleromatis</i>	44
3. Matriz de correlación múltiple entre grupos de ácidos grasos comunes de las cinco especies de <i>Klebsiella</i> (diagrama de escalera)	45
4. Análisis discriminante de los ácidos grasos comunes por especie	46
5. Dendograma a partir de las áreas de los ácidos grasos comunes de cinco especies tipo de <i>Klebsiella</i>	47
6. Perfiles cromatográficos de <i>K. oxytoca</i> , tipificada (3), clínica (9) y ambiental (10)	48
7. Perfiles cromatográficos de <i>K. pneumoniae</i> tipo (2), ambientales (6,7 y 8) y <i>K. rhinoscleromatis</i> tipo (5)	49
8. Distribución de los grupos de ácidos grasos (% relativo) en especies tipo y aislamientos ambientales de las diferentes especies de <i>Klebsiella</i> analizadas	50
9. Diagrama de dispersión en donde se presentan los ejes de las funciones discriminantes 1 y 2 para las diferentes especies de <i>Klebsiella</i>	51
10. Dendograma (coeficiente de correlación de Pearson) con base en las áreas de 9 ácidos grasos comunes de las ocho especies estudiadas.	52
11. Dendograma de ausencia-presencia de todos los ácidos grasos que se determinaron en las ocho especies, con base en el índice de Jaccard	53

Índice de tablas

1. Áreas normalizadas de los ácidos grasos (%) respecto al ácido graso de mayor concentración (C 16:0) en <i>K. ozaenae</i>	72
2. Áreas normalizadas de los ácidos grasos (%) respecto al ácido graso de mayor concentración (C 16:0) en <i>K. pneumoniae</i>	74
3. Áreas normalizadas de los ácidos grasos (%) respecto al ácido graso de mayor concentración (C 16:0) en <i>K. oxytoca</i>	76
4. Áreas normalizadas de los ácidos grasos (%) respecto al ácido graso de mayor concentración (C 16:0) en <i>K. planticola</i>	78
5. Áreas normalizadas de los ácidos grasos (%) respecto al ácido graso de mayor concentración (C 16:0) en <i>K. rhinoscleromatis</i>	80
6. Estadística descriptiva de las áreas de los picos cromatográficos de cada ácido graso, en las cinco especies tipo de <i>Klebsiella</i>	82
7. Distribución de grupos de ácidos grasos identificados en las diferentes especies tipo de <i>Klebsiella</i> analizadas	85
7A. Distribución de áreas y porcentajes de ácidos grasos insaturados identificados en las diferentes especies tipo de <i>Klebsiella</i> analizadas	85
8. Grupos de ácidos grasos identificados con respecto a las medianas de su concentración relativa	39
9. Matriz de varianzas-covarianzas de las áreas normalizadas de los ácidos grasos comunes a las especies de <i>Klebsiella</i>	86
10. Valores de los coeficientes no estandarizados para las 4 funciones discriminantes	87
11. Análisis discriminante para las cinco especies	87
12. Valor de los centroides para cada una de las cinco especies	87
13. Áreas normalizadas de los ácidos grasos (%) respecto al ácido graso de mayor concentración (C 16:0) en un aislamiento ambiental (agua) de <i>Klebsiella pneumoniae</i> (087380)	88
14. Áreas normalizadas de los ácidos grasos (%) respecto al ácido graso de mayor concentración (C 16:0) en un aislamiento ambiental (aire) de <i>Klebsiella pneumoniae</i> (089711)	89

15. Áreas normalizadas de los ácidos grasos (%) respecto al ácido graso de mayor concentración (C 16:0) en un aislamiento ambiental (agua) de <i>Klebsiella pneumoniae</i> (087685)	90
16. Áreas normalizadas de los ácidos grasos (%) respecto al ácido graso de mayor concentración (C 16:0) en un aislamiento clínico de <i>Klebsiella oxytoca</i> (INDRE)	91
17. Áreas normalizadas de los ácidos grasos (%) respecto al ácido graso de mayor concentración (C 16:0) en un aislamiento ambiental (aire) de <i>Klebsiella oxytoca</i> (097806)	92
18. Estadística descriptiva del área de los picos (%) que representa a los diferentes ácidos grasos de las cuatro especies ambientales y una clínica de <i>Klebsiella</i>	93
19. Distribución de los grupos de ácidos grasos identificados en las diferentes especies de <i>Klebsiella</i> aisladas del ambiente	96
19A. Distribución de áreas y porcentajes de ácidos grasos insaturados identificados en las diferentes especies de <i>Klebsiella</i> aisladas del ambiente y la clínica	96
20. Valores de los coeficientes no estandarizados para las 4 funciones discriminantes (especies tipificadas y ambientales)	97
21. Análisis discriminante para las 8 especies	97
22. Valor de los centroides para cada una de las ocho especies de <i>Klebsiella</i> estudiadas	97
23. Presencia de los ácidos grasos celulares en ocho especies de <i>Klebsiella</i> , 3 tipificadas, 1 clínica y 4 ambientales (media \pm desviación estándar)	98

ANÁLISIS DE LA VARIACIÓN INTERESPECÍFICA BACTERIANA
DE LOS ESTERES METÁLICOS DE LOS ÁCIDOS GRASOS
EN CINCO ESPECIES DE *Klebsiella*

...the sure and definite determination (of species of bacteria) requires so much time, so much acumen of eye and judgement, so much of perseverance and patience that there is hardly anything else so difficult—Mueller

Resumen

Los sistemas tradicionales de identificación se basan en la actividad metabólica de la bacteria. La tipificación, serología, fagotipia, producción de bacteriocinas y recientemente los métodos moleculares, no son suficientemente discriminatorios y reproducibles en particular cuando se aplican en estudios epidemiológicos. Con relación a esto, constantemente se proponen y desarrollan nuevos procedimientos que mejoren los resultados. El perfil de ácidos grasos permite realizar análisis cuantitativos, lo que previene de interpretaciones subjetivas y de este modo establecer de manera más precisa la clonalidad de los microorganismos.

Recientemente ha cobrado importancia y se está recomendando con mayor frecuencia el uso del análisis de los ésteres metílicos de los ácidos grasos, en la identificación de microorganismos, y como una herramienta útil en estudios epidemiológicos de enfermedades de plantas y animales. La técnica cromatográfica es altamente reproducible, no compleja y con un bajo costo por muestra, estos atributos le confieren características especiales y tornan mas atractivo el uso de esta técnica.

Es posible observar que *Klebsiella* spp., presenta dos hábitats comunes; uno en el ambiente, en donde se presenta en diferentes tipos de agua (superficiales o de desecho), plantas y suelo, y otro en el epitelio del hombre y animales. Desde el punto de vista epidemiológico *Klebsiella* spp. es un patógeno oportunista que causa infecciones intrahospitalarias. La identificación de la bacteria no es complicada, sin embargo, es difícil de establecer en donde se origina la diseminación. Con base en lo anterior es necesario tener un procedimiento rápido y confiable para identificar las características de la bacteria en un brote hospitalario. En este estudio se muestran resultados que permiten concluir como los perfiles de ácidos grasos determinados por cromatografía de gases pueden utilizarse para identificar y caracterizar especies de *Klebsiella* de diferente origen. Mediante pruebas estadísticas, se pudo observar que por lo menos se requieren 30 repeticiones de los ensayos para validar el método. También se determinó que diez diferentes ácidos grasos de los tipos saturados, insaturados y ciclopropanos, así como su abundancia relativa, fueron constantes en las cinco especies estudiadas de *Klebsiella*. Asimismo mostraron que el ácido palmítico (C16:0) y los ácidos insaturados fueron constantes en las especies estudiadas de *Klebsiella*. Los perfiles de ácidos grasos obtenidos de especies clínicas y ambientales coincidieron con aquellos determinados en las cepas de referencia (ATCC).

Estas observaciones se confirmaron al utilizar el análisis de correlación de Pearson, que permite distinguir las diferencias o la asociación entre especies microbianas. Los resultados también muestran la asociación entre especies ambientales de *K. pneumoniae* y *K. rhinoscleromatis*. Desde un punto de vista aplicativo, se propone el uso de perfiles de ácidos grasos para caracterizar y determinar el origen clonal de las especies de *Klebsiella*, principalmente en estudios epidemiológicos durante brotes intrahospitalarios.

Summary

Bacterial characterization is performed using different procedures. However, some of these are not sufficient for a definitive identification. The fatty acids profile of bacteria is a procedure that permits identification and establishment of the clonal origin of microorganisms. Some bacteria such as *Klebsiella* are found both, in the environment, and in human or animal hosts. Epidemiological studies show that *Klebsiella* spp. is an opportunistic pathogen that causes nosocomial infections. Bacterial identification is not complicated; however, the dissemination origin of it in a hospital is difficult to establish. For this reason it is necessary to have a procedure to identify specific and particular characteristics of the bacteria during a hospital outbreak. In this study results are presented that show the fatty acids profiles as determined by gas chromatography could be used to identify and characterize *Klebsiella* strains of different origin. Using statistical analysis, it was observed that a minimum of 30 repetitions of the assay are necessary to consider the method valid. Also it was found that ten different fatty acids of the varieties saturated, unsaturated and cyclopropane and their relative abundance were constant in the 5 species of *Klebsiella* studied. The fatty acids profiles obtained in the clinical and environmental strains of *Klebsiella* were similar to those determined in the *Klebsiella* reference strains. These observations were confirmed using the Pearson's correlation analysis. The results obtained showed that there exists an association between environmental species of *K. pneumoniae* and *K. rhinoscleromatis*. The results also showed that palmitic acid (C16:0) and the unsaturated fatty acid were constant in the *Klebsiella* species studied. These results permit the use of fatty acid profiles to characterize and determine the clonal origin of *Klebsiella* species, specially in epidemiological studies during intrahospital outbreaks.

1. Introducción

Métodos de identificación de bacterias

El procedimiento ideal para la identificación de microorganismos no siempre es posible, particularmente con géneros o especies que no son susceptibles de ser caracterizadas por pruebas bioquímicas de uso rutinario. Cada vez es más común el empleo de procedimientos basados en detectar composiciones bioquímicas particulares para realizar una identificación más precisa. Los perfiles electroforéticos de proteínas, los patrones de lípidos o el análisis de DNA son algunos de los métodos que en la actualidad se emplean para la caracterización de microorganismos (Böttger, 1996).

En años recientes se ha hecho un esfuerzo para acelerar y simplificar la identificación bacteriana vía la introducción de micropruebas comerciales, como el sistema que utiliza un Índice de Perfiles Analíticos ("Analytical Profile Index", API), en el cual se corren 20 micropruebas bioquímicas que permiten una automatización parcial de los procesos y la aplicación de métodos por computadora. Este tipo de identificación aún resulta complicado y, en algunos casos, no es totalmente confiable, pues se basa siempre en el mismo principio: la observación de las propiedades bioquímicas de los microorganismos al utilizar sustratos que denotan la presencia o ausencia de una ruta metabólica y de la cual se obtiene información de tipo cualitativa (Holmes, 1978 y 1994).

Los métodos moleculares no son siempre accesibles para muchos laboratorios, debido a su alto costo, por esta razón, varios autores (Häusler y Richter, 1983; Sasser, 1990 y Welch, 1991) han tratado de reducir la laboriosidad y desventajas de los procedimientos convencionales y buscan reemplazarlos por métodos simples que provean, sin embargo, el mismo tipo de información, lo que de alguna manera reinicializa la identificación, centrando la atención en las sustancias estructurales o metabólicas comunes a la mayoría de los microorganismos (Siegel, 1997).

Estos intentos se basan en la aplicación de nuevos métodos analíticos y de separación, especialmente de cromatografía líquida y de gas, espectrometría de masas, electroforesis y espectrometría en el intervalo del infrarrojo. Así, el desarrollo de la instrumentación y automatización de dichos procesos analíticos permite una perfecta separación de los posibles componentes de la muestra analizada con una mínima demanda de tiempo y con una expresión cuantitativa segura. La aplicación práctica de estos métodos en el campo de la taxonomía se denomina quimiotaxonomía (Drucker y Owen, 1973; Drucker, 1974).

Contrariamente a la mayoría de las pruebas bioquímicas, cuyos resultados sólo se expresan (como presencia o ausencia), la quimiotaxonomía no sólo sirve para la determinación de cualidades, sino también de cantidades; esto significa que el ámbito de información obtenida por un simple análisis es considerablemente mayor. Por ejemplo, cinco pruebas bioquímicas con respuestas positivas o negativas pueden dar al menos 32 combinaciones, en cambio cinco componentes determinados por cromatografía de gases, con sólo 10 diferentes valores, nos proveen de 100,000 combinaciones. Por esta razón, se dice que los métodos usados en quimiotaxonomía no sólo son métodos rápidos, sino fundamentalmente exactos, inalterables y con resultados que pueden procesarse numéricamente (Cecchini y O'Brien, 1968, Springer *et al.*, 1996).

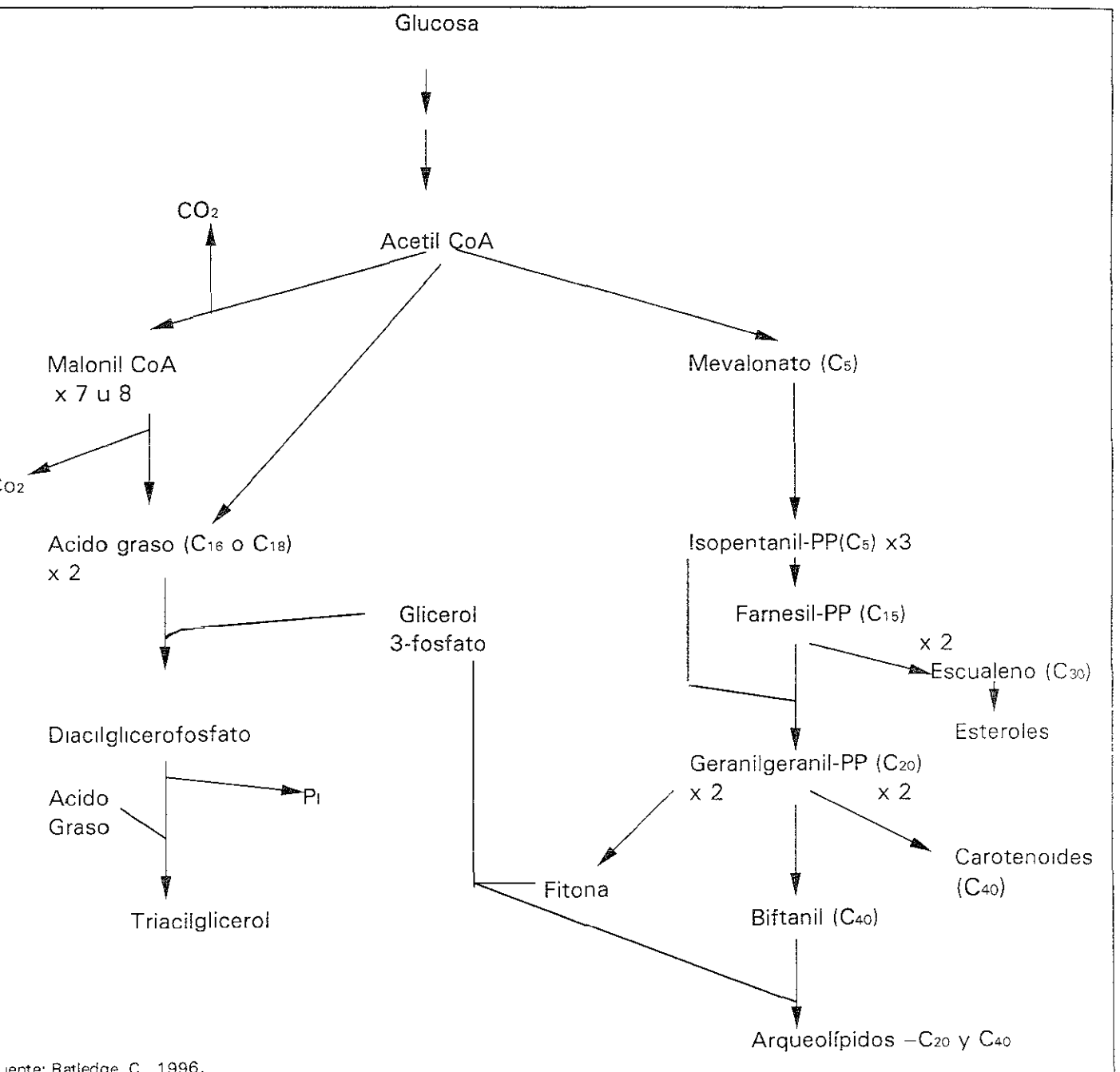
El objeto de interés de los métodos en quimiotaxonomía es que pueden estar basados en las diferentes estructuras celulares, enzimas, productos metabólicos liberados al medio de cultivo, o bien productos volátiles y gaseosos, todos los cuales dan una visión característica del organismo en cuestión (Goodfellow & Minnikin, 1985; Smith & Siegel, 1996)

La gran diversidad de bacterias y su plasticidad génica han llevado a los microbiólogos a emplear métodos genéticos, serológicos, inmunológicos y basados en el estudio de los ácidos nucleicos, tanto en su clasificación como en su identificación. De entre estos, particularmente los métodos quimiotaxonómicos proporcionan información precisa que se considera de gran valor, al permitir definir propiedades altamente

discriminatorias. Además la composición de los ácidos grasos celulares es una característica genéticamente estable, la cual está muy conservada y por ello ha resultado de gran utilidad el uso de los ácidos grasos. (Sasser, 1990; Smith y Siegel, 1996; McDonough *et al.*, 1999).

Un ejemplo al respecto son las diferencias entre las Archaea (arqueobacterias), -el grupo más primitivo de los procariontes- y las Bacterias (eubacterias). La distinción de estos microorganismos se basó principalmente en las secuencias de los genes de ARNr. Sin embargo, tal distinción también se pudo realizar analizando la naturaleza de los componentes lipídicos de los dos reinos. Las arqueobacterias contienen lípidos que están constituidos solamente de unidades repetidas de isopentanil. Las unidades de isopentanil derivan de la ruta de síntesis lipídica del mevalonato, no obstante que esta ruta metabólica se encuentra en otros microorganismos como fuente de lípidos terpenoides, en las arqueobacterias toda la familia de lípidos deriva de esa fuente, cuadro 1 (Ratledge, 1996), mientras que en particular en las eubacterias la composición es mucho más diversa (Smith y Siegel, 1996). En particular en las arqueobacterias otra importante distinción entre sus lípidos con los de otros microorganismos es que los lípidos de las primeras están ligados al glicerol por la vía de unión éter (-CH₂-O-CH₂-) y no por la unión más común, que es éster (-CH₂-O-CO-). El puente éter es menos susceptible a la hidrólisis, por lo que no es sorprendente que esto le confiera una considerable estabilidad a las estructuras de la membrana de las arqueobacterias. Lo anterior se puede observar con relación a la resistencia de éstos en ambientes extremos. Tal es el caso de las halófilas (*Halobacterium*, *Halococcus*, *Natronococcus*, *Natrobacterium*, etc.), termófilas extremas (*Thermus*, *Caldariella*, *Sulfobolus*, etc.), y organismos que pueden crecer en presencia de metano –metanotrofos o metanógenos, (*Methanospirillum*, *Methanosarcina*, *Methanococcus*, etc.) –. Asimismo, los lípidos ramificados bajo condiciones extremas de temperatura, pH, salinidad, etc., proporcionan estabilidad a la membrana de estas bacterias. Aunque la taxonomía de las arqueobacterias aún es incipiente, ya existen una

gran cantidad de trabajos sobre la estructura de dichos microorganismos (Lechevalier, 1989; Ratledge, 1996).



Cuadro 1. Origen biosintético de los principales grupos de lípidos microbianos. La columna de la derecha muestra la ruta de síntesis en las arqueobacterias y la de la izquierda la de las Gram negativas.

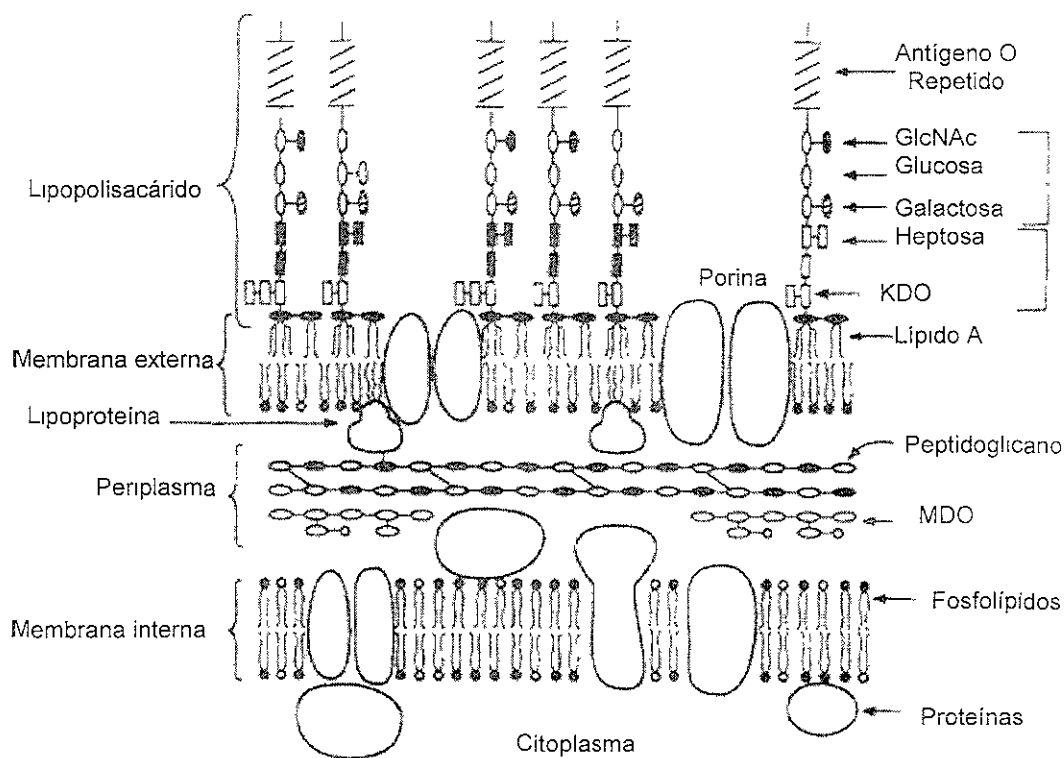
Composición de los ácidos grasos bacterianos

Los lípidos juegan un papel fundamental tanto en la estructura de la pared y de la membrana, como en su función de pozos de energía. Desde el punto de vista taxonómico los componentes lipídicos más importantes son los ácidos grasos. Estos aparecen en los microorganismos como ácidos lineales saturados, insaturados, con presencia de ramificaciones, hidroxilaciones y anillos ciclopropanos (Barr, 1977).

Los ácidos grasos celulares (AGC) se definen como los componentes de cualquier lípido celular que tiene una cadena lineal de 9 a 20 átomos de carbono; esto incluye la mayoría de los AGC localizados en la membrana celular, como glucolípidos o lipopolisacáridos, pero sin incluir las cadenas largas de 24 a 90 átomos de carbono de otro tipo de compuestos, como -por ejemplo- los ácidos micólicos (Lambert y Moss, 1983).

Hay que considerar que la fuente primaria de los ácidos grasos en las bacterias son los lípidos, fundamentalmente los de la membrana celular, (por ejemplo fosfolípidos) -o el lípido A, que es componente del lipopolisacárido en las bacterias Gram negativas, o el ácido lipoteicoico en las bacterias Gram positivas-. El contenido de ácidos grasos de todos los lípidos está determinado por una vía biosintética particular, para cada especie determinada. El proceso se inicia por la síntesis de la coenzima A del éster de un ácido graso, con una molécula de acetil coenzima A utilizada como iniciador.

La mayoría de las bacterias sintetizan ácidos grasos con cadenas de 10 a 19 átomos de carbono y los más comunes son los de 16 o 18 átomos de carbono. En particular el ácido graso saturado hexadecanoico (16 átomos de carbono), está altamente conservado entre los procariontes, así como en levaduras. La variabilidad en las propiedades de los ácidos grasos permiten distinguir la diferente composición de los ácidos grasos celulares que presentan los microorganismos e incluso diferencias cuantitativas entre los mismos (Sasser, 1990).



Fuente: Raetz C., 1996. Organización molecular de la cubierta de *E. coli* K-12. Los óvalos y rectángulos son residuos de azúcar. Los círculos representan la cabeza de los grupos de glicerofosfolípidos. KDO es el ácido 3-deoxi-D-manoglucosónico, la heptosa tiene la configuración L-glicero-D-manosa, y MDO representa los oligosacáridos derivados de la membrana. La estructura propuesta de la región central de *E. coli* K-12 ha sido revisada recientemente. En algunas cepas, el residuo de GlcNAc de la membrana exterior es reemplazado por la L-glicero-D-mano-heptosa.

Generalmente, los perfiles se presentan en un ámbito de 5 a 15 ácidos grasos celulares (AGC) en cantidades significativas. Algunos organismos con genomas pequeños - como es el caso de *Rochalimaea* spp.- presentan sólo pocos tipos de ácidos grasos, mientras que eubacterias - como *Xantomonas* spp.- tienen más de 20 diferentes ácidos grasos. Las bacterias tienen algunos ácidos grasos que son únicos y que no se encuentran en células eucariontes; por ejemplo, las cadenas ramificadas y el contenido de ciclopropano de los ácidos grasos que caracteriza a muchas bacterias Gram-positivas y Gram-negativas respectivamente, no se encuentran en hongos o en células de humanos.

Contrariamente, los ácidos grasos poliinsaturados que se encuentran en los organismos superiores no están en las bacterias aeróbicas. Generalmente, las bacterias Gram negativas tienen una alta proporción de ácidos grasos saturados y monoinsaturados

con un número inalterable en la cadena de carbonos. Sin embargo, bacterias Gram-positivas -como *Bacillus* spp. y *Staphylococcus*- tienen ácidos grasos celulares con cadenas de átomos de carbono impares, ramificadas y saturadas pero una baja proporción de cadenas lineales saturadas (Bousfield *et al.*, 1983; Kaneda, 1971).

Debido a la fácil volatilización de sus ésteres metílicos, los ácidos grasos se analizan por cromatografía de gas líquido. Comparando cada componente contra los presentes en una mezcla estándar por este procedimiento se pueden identificar los componentes presentes en una mezcla desconocida (Drucker, 1981).

Identificación de microorganismos con base en sus ácidos grasos

Los primeros trabajos dirigidos al análisis de los ácidos grasos en bacterias, mediante la cromatografía de gases, corresponden a James y Martin (1956), quienes trabajaron en la separación e identificación de ésteres metílicos de ácidos saturados e insaturados, mediante la esterificación de un extracto de *Pseudomonas aeruginosa*. En 1962, Kaneda efectuó el aislamiento e identificación de los ácidos grasos provenientes de *Bacillus subtilis*.

Como se mencionó anteriormente, Abel *et al.* (1963) fueron los primeros en presentar evidencias que sugerían que el análisis de ácidos grasos podría utilizarse con éxito en la identificación de bacterias. Asimismo, en ese mismo año identificaron diferentes patrones de ácidos grasos en varios miembros de la familia Enterobacteriaceae y en algunas bacterias Gram positivas, pero no identificaron específicamente los ácidos grasos celulares que caracterizaban a cada género o especie que ellos probaron. Aunque el análisis requería de numerosos pasos y los aparatos utilizados para la extracción y esterificación eran complicados, su trabajo puso de manifiesto la utilidad potencial del análisis de los ácidos grasos celulares y sentó las bases para investigaciones subsiguientes.

En 1968, Brian y Gardner realizaron un trabajo con *Vibrio* spp. en el cual compararon dos cepas -NIH 41 (lisa) y Ca 324 (rugosa)- de acuerdo con sus antígenos de superficie e identificaron los ésteres metílicos de ácidos grasos por cromatografía de gases, observando que la distribución de fosfolípidos, ácidos grasos y grasas neutras se presentaban de forma muy similar entre las cepas; sin embargo encontraron pequeñas diferencias en sus porcentajes (Brian y Gardner, 1967 y 1968).

Años más tarde (1973), Amstein y Hartman lograron la diferenciación de 37 cepas clonadas en agar soya tripticasa de *Enterococcus* utilizando la técnica de cromatografía de gases. De los resultados obtenidos se encontraron grandes semejanzas entre los perfiles de las diferentes cepas y algunas diferencias significativas, sobre todo en el carbón 19:0 entre cepas de *Streptococcus* y *S. faecium*. Estas diferencias fueron suficientemente consistentes como para considerarse un criterio taxonómico de separación a nivel de especie.

Erik Jantzen *et al.* (1974) reportaron un procedimiento para el fraccionamiento y la identificación de los ácidos grasos y monosacáridos bacterianos. En ese mismo año, el mismo grupo de investigadores (Erik Jantzen *et al.*) reportan un trabajo relacionado con la composición de ácidos grasos de los géneros *Neisseriae* y *Moraxellae* en cepas aisladas de casos clínicos; en este estudio, dichos autores encontraron que había grandes diferencias entre los géneros.

Bøe y Gjerde (1980) realizaron un estudio por cromatografía de gases -en columna capilar de vidrio- de 23 cepas de las familia Enterobacteriaceae y Vibronaceae. Con los datos normalizados y mediante un análisis de conglomerados lograron obtener una buena separación de especies, géneros y familias. Ellos estudiaron cepas de los géneros *Salmonella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Vibrio* y *Aeromonas*.

En 1981, Mayberry reportó un trabajo acerca de los ácidos grasos monohidroxílicos y dihidroxílicos en cepas de *Legionella pneumophila* utilizando técnicas de cromatografía en papel, cromatografía de gases, espectrometría de masas y espectrofotometría de infrarrojo. En 1982, Jantzen *et al.* analizaron la composición de

ácidos grasos de 13 cepas de *Bordetella* y algunas de *Brucella*, encontrándose ácidos grasos de cadena lineal saturada y algunos monoinsaturados; en dicho documento se menciona la cromatografía de gases como una importante herramienta para el diagnóstico bacteriológico y para el estudio de las interrelaciones bacterianas.

Posteriormente, Bousfield *et al.* (1983) realizó un análisis numérico del total de ácidos grasos en perfiles de corineformes, nocardioformes y algunas otras bacterias. Por su parte, Bergan *et al.* (1983) analizaron por cromatografía de gases los ácidos grasos de *Serratia* spp., logrando diferenciar muy bien entre especies y biotipos.

Alvin *et al.* (1983) se interesaron en conocer el contenido de ácidos grasos, y carbohidratos de seis cepas tipificadas de micobacterias; además, trataron de optimizar las condiciones cromatográficas con la finalidad de detectar de manera simultánea carbohidratos y ácidos grasos, analizados como derivados metilglucósidos y como metilésteres respectivamente; sus resultados sugieren la utilización de la cromatografía en trabajos de carácter taxonómico. También en el mismo año, Lambert realizó una investigación relacionada con la diferenciación de especies de la familia *Vibrionaceae*, analizando la composición de ácidos grasos; estos autores también proponen el análisis de ácidos grasos por cromatografía como una herramienta útil para la identificación y como criterio en la identificación sistemática de microorganismos de esta familia.

En 1988, Eerola y Lehtoen realizaron un trabajo para el procesamiento de datos de la identificación de bacterias mediante el análisis por cromatografía de gases de ácidos grasos componentes de los lípidos de la membrana. Un trabajo realizado por Monteoliva *et al.* (1988) -para establecer la composición de los ácidos grasos de *Deleya halofila*- señala que las condiciones de cultivo de los microorganismos (temperatura, concentración de sales) modifican el porcentaje de abundancia y tipo de ácidos grasos.

Veys *et al.* (1989) realizaron un trabajo para identificar bacterias Gram negativas no fermentadoras utilizando la composición de sus ácidos grasos; los resultados obtenidos por estos autores muestran la existencia de 35 especies representativas divididas en 19 grupos cromatográficos. Estos autores concluyeron que la cromatografía

de gas líquido es un método efectivo, rápido y preciso que puede utilizarse en identificaciones rutinarias de bacterias no fermentativas.

Otros investigadores (Goodwin *et al.*, 1989) analizaron la composición de ácidos grasos de *Campylobacter pylori* de primates y hurones comparándolas con otras especies de *Campylobacter*; en este estudio se establecieron 7 grupos cromatográficos, concluyendo que la presencia de los ácidos grasos inusuales es de gran ayuda para la diferenciación de estas especies.

En 1989, Cookson *et al.* trabajaron sobre el análisis de los ácidos grasos de *Streptococcus milleri*, con el propósito de establecer el análisis cromatográfico de los ésteres metílicos de los ácidos grasos como método taxonómico, ya que se estaba aplicando con mayor frecuencia en la sistemática bacteriana. Estudios recientes confirman la gran utilidad del análisis de ácidos grasos para la identificación y agrupamiento de diferentes géneros bacterianos (Okuyama, 1990; Galbraith y Wilkinson, 1991).

En 1992, Shantha y Napolitano realizaron una revisión acerca del análisis cromatográfico de los ácidos grasos, mencionando diversos métodos de trabajo sus ventajas y desventajas, así como la aplicación y utilidad de este tipo de análisis en la industria alimentaria, microbiología y producción de aceites vegetales entre otros.

En 1992, Shantha y Napolitano realizaron una revisión acerca del análisis cromatográfico de los ácidos grasos, mencionando diversos métodos de trabajo sus ventajas y desventajas, así como la aplicación y utilidad de este tipo de análisis en la industria alimentaria, microbiología y producción de aceites vegetales entre otros.

Considerando el conocimiento de las bases moleculares del análisis cromatográfico de ácidos grasos y el desarrollo de la instrumentación analítica, es importante hacer una consideración sobre el uso potencial y las limitaciones de esta tecnología. Los ácidos grasos han sido estudiados en la mayoría de los microorganismos, pero el éxito de su uso en la identificación no puede considerarse como total, debido al aún limitado alcance de los

estudios, la utilización de diferentes modelos de instrumental y el análisis estadístico estandarizado (Drucker, 1974; Lechevalier, 1982; Kazda *et al.*, 1992).

Variabilidad de los ácidos grasos en Enterobacterias

Los resultados del análisis cromatográfico son muy similares a los de la homología del ADN, y se ha reportado que mutaciones simples y la pérdida o ganancia de plásmidos no alteran la composición de los ácidos grasos celulares (Henis *et al.*, 1966; Brenner *et al.*, 1973; Jantzen, 1984).

Para cada grupo taxonómico, el estudio de la composición de los ácidos grasos de los lípidos bacterianos, es una de las líneas de investigación actualmente con más desarrollo y diversos autores (Bagley y Seidler, 1977; Veys *et al.*, 1989; Okuyama *et al.*, 1990, Annous, *et al.*, 1999, Irina *et al.*, 1999) definen las diferencias más importantes entre las bacterias Gram positivas y Gram negativas. Se ha encontrado que las Gram negativas, presentan ácidos oleico, palmítico y palmitoleico así como varios ésteres metílicos que aún no se han identificado; en las Gram positivas, Moss *et al.*, (1988) descubrieron que las bacterias Gram negativas poseen un alto grado de uniformidad ya que 14 de 16 especies poseen ácidos grasos del tipo C16:0, mientras que las Gram positivas exhiben gran variación en su composición y poseen ácidos grasos ramificados.

Los lípidos son sustancias no solubles en agua pero sí en solventes orgánicos como éter o cloroformo. Se pueden dividir arbitrariamente en saponificables y no saponificables; en el primer caso se hidrolizan por ebullición con hidróxido de sodio para romper la unión éster y separar el glicerol de la parte carboxílica (ácidos grasos); los lípidos no saponificables no son hidrolizables y generalmente tampoco son ésteres. Los lípidos saponificables se subdividen en lípidos simples (grasas y ceras) y en lípidos compuestos (fosfolípidos). En los microorganismos, los lípidos están frecuentemente asociados a carbohidratos o proteínas, es decir, formando lipopolisacáridos y lipoproteínas respectivamente.

Abel *et al.* (1963) sugieren la utilización del análisis cromatográfico para la clasificación de especies de la familia Enterobacteriaceae, por lo que se les considera como los fundadores de una nueva dirección en la bacteriología moderna.

Dada la importancia y el gran número de especies que agrupa la familia Enterobacteriaceae, varios autores (Gehrke y Goerlits en 1963, Brian y Gardner en 1967, Cronan en 1975, Bøe y Gjerde en 1980, Häusler y Richter en 1983 quienes también analizaron a la familia Vibrionaceae y aplicaron el método a levaduras) y Veys *et al.*, en (1989) utilizaron la cromatografía de gases para identificar e intentar esclarecer la posición taxonómica de diversos géneros pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae y han coincidido en que la técnica de cromatografía de gases es un método eficaz para una identificación de rutina rápida y precisa.

El análisis numérico de los perfiles de ácidos grasos de corineformes, actinobacterias y otras bacterias fue utilizado por Bousfield *et al.* (1983) para la identificación de esos microorganismos. Häusler y Richter utilizaron rutinariamente la cromatografía de gases, en el Instituto de Investigaciones del Agua en Praga, para identificar aislamientos de bacterias de las familias Enterobacteriaceae y Vibrionaceae procedentes de cuerpos de agua y redes de distribución de agua potable (comunicación personal).

En 1986, Rasoamanjara *et al.*, caracterizaron especies del género *Flavobacterium* por análisis de ácidos grasos y en 1987 Verhulst *et al.*, de *Eubacterium lentum*. En 1988, Monteoliva-Sánchez también revisaron el efecto que tienen la temperatura y la concentración de sales en el crecimiento de *Deleya halophila*. En ese mismo año, Eerola y Lehtonen (1988) estudiaron el método cromatográfico para su aplicación en la clínica. En 1989, Johnson *et al.* desarrollaron un método específico para la identificación de *Clostridium difficile* por cromatografía de gas líquido.

En 1990, Ahmad *et al.* elaboraron un árbol filogenético de un grupo de enterobacterias con base en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos, mientras que Matsuyama *et al.* (1990) estudiaron los niveles de glucolípidos y la producción de ácidos

grasos en *Serratia rubidea*; Okuyama *et al.* (1990) identificaron los ácidos grasos insaturados en bacterias psicrófilas como *Vibrio* spp.

Okuyama *et al.* (1990) determinaron ácidos grasos transinsaturados por cromatografía gas líquido en *Vibrio* spp. Del total de metilésteres de ácidos grasos celulares analizados, demostraron que los ácidos grasos de los glicerolípidos y fosfolípidos son el C16:0, C16:1 y C18:1, y concluyeron que estos ácidos grasos transinsaturados caracterizan a los géneros *Vibrio*, *Pseudomonas* y *Enterobacterium* respectivamente.

Los hidroxiácidos son constituyentes de los lipopolisacáridos de la envoltura celular de las bacterias Gram-negativas y se han encontrado en la mayoría de las especies que se han estudiado. Los ácidos grasos 3-Hidroxi en un ámbito de C11:0 a C21:0, se han identificado en *E. coli* y especies de *Salmonella*, *Klebsiella*, *Yersinia*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* y *Rhizobium*. También se presentan los 2-Hidroxiácidos, aunque en menor grado y con una configuración espacial en la forma L, la cuál es opuesta a la forma D de los ácidos grasos 3-Hidroxi; esto probablemente indica un origen biosintético separado de estos dos ácidos grasos. Los 3-Hidroxiácidos pueden detectarse como constituyentes menores en algunas especies, aunque por otra parte y de manera importante, hay que resaltar que el arreglo de los 3-Hidroxiácidos (de los cuales el 3-hidroxitetradecanoato es el más abundante) forma parte de la estructura del Lípido A de algunas enterobacterias. El lípido A es la región más ancha de la compleja estructura del lipopolisacárido en la membrana exterior de éstos microorganismos, mientras que los ácidos grasos fijados a la diglucosamina mantienen unido el espacio periplásmico.

Actualmente, los estudios relacionados con esta área tienen como objetivo utilizar el método cromatográfico como una alternativa o prueba complementaria en la identificación de microorganismos y su empleo es cada vez más frecuente en la taxonomía (Kazda *et al.*, 1992).

Revisión del género *Klebsiella*

En la literatura médica se acepta, en general, que la bacteria anteriormente conocida como *Aerobacter aerogenes* (*Bacterium lactis aerogenes*) se ubique dentro del género *Klebsiella*, con *K. pneumoniae* (Bacilo de Friedländer) tal como fue propuesto hace muchos años por autores como Edwards (1929) y Kauffmann (1949), aunque aún no hay acuerdo con respecto a la subdivisión del género. Ørskov describe (1974) solamente 3 especies: *K. pneumoniae*, *K. ozaenae* y *K. rhinoscleromatis*, una clasificación que concuerda con la de Edwards y Ewing (1962). La controversia se hace evidente, por ejemplo, en que este sistema es utilizado por los investigadores norteamericanos y del oeste de Europa, pero muy raramente en publicaciones del Reino Unido.

Como consecuencia de la sugerencia de Duguid (1959) de que "las cepas saprofitas de *K. aerogenes* son fimbriadas, mientras que las patógenas de *K. pneumoniae*, *K. rhinoscleromatis* y *K. ozaenae* no lo son", Cowan *et al.* (1960) revisaron los caracteres de esta bacteria y concluyeron que se podían reconocer 6 especies, *K. aerogenes*, *K. edwardsii*, *K. atlantae*, *K. pneumoniae (sensu stricto)*, *K. ozaenae* y *K. rhinoscleromatis*. Más tarde Bascomb *et al.* (1971) -otro grupo del Reino Unido- definieron 6 taxa en el género *Klebsiella* con base en la taxonomía numérica. Uno de esos taxa fue *K. pneumoniae (sensu stricto)*, otro que contiene a *K. aerogenes*, *K. edwardsii* y *K. atlantae* y, además, las cepas de *Klebsiella* formadoras de indol (*K. oxytoca*), que fueron excluidas del grupo por Cowan *et al.* (1960).

En una publicación de la taxonomía de *Klebsiella* hecha por Barr (1977) se remarca que Ørskov (1974) incluyó a *K. pneumoniae (sensu stricto)* en *K. pneumoniae (sensu lato)*. La razón para que esto se considere adecuado es que las 4 cepas capsuladas (la quinta no es capsulada) que componen el taxon de *K. pneumoniae (sensu stricto)* propuesto por Bascomb *et al.* (1971) pertenecen al tipo capsulado 3, como las cepas examinadas por

Cowan *et al.* (1960); en este caso, dichas cepas podrían ser descendientes de la misma célula bacteriana, es decir, que pertenecen al mismo clon. Si esto es así, parece que lo más razonable es considerar a tales cepas, las cuales son VP y KCN negativas, como pertenecientes a un tipo serofermentativo especial, o biotipo.

El mismo argumento puede usarse respecto a *K. rhinoscleromatis* (también cápsula tipo 3) y quizás la especie *K. ozaenae*, aunque se incluye a más de un clon. Con relación a esto, cabe mencionar que Brenner *et al.* (1973), encontraron un índice de reasociación de ADN del 80 al 90% entre *K. pneumoniae (sensu lato)*, *K. ozaenae*, *K. rhinoscleromatis* y *K. edwardsii*. Igualmente, Jain *et al.* (1974) también reportaron que los valores de reasociación del ADN no permiten la diferenciación entre las cepas de *Klebsiella* Indol-negativas.

Slopek y Durlakowa (1967) y Durlakowa *et al.* (1967) agruparon a *Klebsiella* en los mismos seis taxa propuestos por Cowan *et al.* (1960), aunque cambiaron los nombres y posiciones en cierta medida. Sin embargo, en muchos lugares fuera del Reino Unido, los sistemas de Cowan (1960) y Bascomb (1971) ofrecen más desventajas que ventajas.

De acuerdo con Barr (1977), algunos científicos británicos que trabajan en ambiente clínico han aceptado la similitud de varias especies de *Klebsiella* y refieren *K. aerogenes*, *K. oxytoca*, *K. edwardsii* y *K. atlantae* como un grupo identificable como *K. aerogenes*. El resultado podría ser la definición de dos especies, *K. aerogenes* y *K. pneumoniae (sensu stricto)* en el Reino Unido, en conflicto con una sola especie, *K. pneumoniae (sensu lato)*, en otros países europeos y en los Estados Unidos de América.

Para resolver este problema, Barr (1977) propone que en el Reino Unido se adopte el uso de *K. pneumoniae (sensu lato)* para incluir *K. aerogenes*, *K. oxytoca*, *K. edwardsii*, *K. atlantae* y *K. pneumoniae*, pero que conserven la capacidad de referirse independientemente al bacilo de Friedländer como *K. pneumoniae (sensu stricto)*.

Otro problema es el ocasionado por cepas de *Klebsiella* que forman Indol y licúan la gelatina, a las que se les han asignado diferentes nombres y posiciones taxonómicas a través de los años. Sin embargo, en la octava edición del manual de Bergey (1984), estas cepas se han incluido en la especie *K. pneumoniae* y se las considera sólo como biotipos.

Los estudios de Jain *et al.* (1974) sobre comparación del ADN indican que las cepas de *Klebsiella* indol y gelatina positivas (grupo oxytocum) representadas por un grupo homólogo con un ADN distintivo, podrían establecerse como un nuevo género de Enterobacteriaceae. Como consecuencia de esta discusión cabe proponer que *Klebsiella* debiera considerarse como un género con una sola especie, y que otro género incluyera cepas parecidas a *Klebsiella* Indol y gelatina positivos.

A través de los años, *Klebsiella* ha sido aislada en numerosas ocasiones del ambiente, dentro del grupo de los coliformes totales, pero se les dio poca importancia a esos aislamientos porque se determinaron originalmente como "*Aerobacter*" o "*Bacterium aerogenes*" (Beckwith, 1931; Edwards, 1929; Johnson y Levine, 1917). La diferenciación genérica se basó en el hábitat de origen, y se identificaban los coliformes con un patrón indol (-), rojo de metilo (-), Voges-Proskauer (+), citrato (+) (IMViC) -proveniente de esputo- como *K. pneumoniae* y a un aislamiento del suelo -bioquímicamente similar- como "*Aerobacter*" (Breed, 1957). Quizá el primer indicio de la existencia de errores taxonómicos y de enigmas ecológicos se remonta a 1929, con Edwards, cuando se descubrió que 5 de 29 "*Aerobacter*" obtenidas del suelo podrían aglutinarse con un antisuero capsular tipo B preparado contra el Bacilo de Friedländer (*Klebsiella*).

En la literatura se menciona que la capacidad de "*Aerobacter*" de fijar nitrógeno permite confirmar que muchos de estos cultivos de origen ambiental fueron serotipificados como *K. pneumoniae* (Mahl *et al.*, 1965). Asimismo, otros autores mencionan que las bacterias anaerobias facultativas fijadoras de nitrógeno, los géneros *Klebsiella* y *Enterobacter* requieren compuestos nitrogenados para crecer en anaerobiosis; sin embargo, fijan N₂ a una tasa suficientemente alta como para crecer bajo las mismas condiciones anaerobias. Wilson (1965, en Evans & Burris, 1992) descubrió por primera vez estas condiciones que permiten la fijación del N₂ por parte de *Klebsiella pneumoniae*.

Algunas especies como -*K. pneumoniae*- que crecen bien en anaerobiosis, fijan mejor el nitrógeno cuando crecen microaerofílicamente. Esto se debe parcialmente al uso más eficiente de la glucosa en el catabolismo, pues se incorporan 15 mg de N por gramo de C

en lugar de 8 cuando crecen anaeróbiamente. Sin embargo, y de forma inexplicable, con bajos niveles de O₂ y de nitrógeno, se puede estimular la síntesis de nitrógeno. Lo anterior tiene relación con un gen (*nifL*) que presenta *K. pneumoniae*, el cual no ha sido encontrado en otros microorganismos fijadores de nitrógeno y cuya acción se da en dos vías, una de las cuales previene la activación del gen *nifA*, (y, por lo tanto, la síntesis de nitrogenasa) y la otra como respuesta neutral al *nifA*, que permite la síntesis de nitrogenasa en la presencia de bajas concentraciones de O₂ (Sprent & Sprent, 1990).

A pesar de ello, en las descripciones fenotípicas y la revisión de la nomenclatura es posible distinguir *Klebsiella* de *Enterobacter* ("*Aerobacter*") con base en patrones de motilidad, descarboxilasas y dihidrolasa (Eickhoff *et al.*, 1966 y Eickhoff, 1971; Hormacche y Edward, 1960). Con estas pruebas, muchos grupos han confirmado la amplia frecuencia de *Klebsiella* en varios hábitats naturales (Mahl *et al.*, 1965; Brown y Duncan y Razzel, 1972; Seidler, 1973; Aho *et al.*, 1974; Dufour y Cabelli, 1976; Knittel *et al.*, 1977).

La distribución ubicua de un patógeno oportunista de animales, incluso de humanos, con altas densidades celulares, en ambientes aparentemente libres de reciente contaminación fecal, provoca preguntas complejas sobre su importancia en salud pública y si verdaderamente las cepas aisladas son *K. pneumoniae* (*sensu stricto*), *Enterobacter* atípicas, o quizá nuevas especies de Enterobacteriaceae. Se han descrito 7 diferentes patrones IMViC para *Klebsiellas* de origen ambiental, mientras que sólo se observan 3 ó 4 patrones entre aislamientos de humanos y de otros animales (Brown y Seidler, 1973; Campbell y Roth, 1975; Edwards y Ewing, 1972).

Estos patrones han acrecentado la confusión taxonómica desde que se usan los resultados de la prueba IMViC (junto con otras pequeñas variaciones fenotípicas) para denotar varias especies en el género, que incluyen *K. pneumoniae*, *K. aerogenes*, *K. edwardsii*, *Aerobacter aerogenes* sin motilidad y *K. oxytoca* (Edwards y Ewing, 1972). Pareció ser que hay un acuerdo general de que las primeras 4 especies son sinónimas de *K. pneumoniae* (Núñez y Colmer, 1968), aunque ya se ha sugerido un nuevo género (*Oxytocum*) para la *Klebsiella* productora de Indol (Jain *et al.*, 1974).

Los estudios sobre los ácidos nucleicos de bacterias que son identificadas por biotipos y serológicamente como *K. pneumoniae*, han revelado una gran heterogeneidad molecular (Seidler *et al.*, 1975). La composición media de bases del ADN en 40 aislamientos identificados como *K. pneumoniae*, de origen clínico y ambiental, fluctúa entre 53.9 y 59.3% mol G+C, mientras que en la mayoría de las especies entéricas fluctúa únicamente entre 1 y 2% mol G+C (Hill, 1966). Esta heterogeneidad también se reflejó en diferencias de tamaño del genoma y en niveles de reasociación relativa de 5 a 100%.

Resultó significativo que algunos aislamientos de origen clínico, de vegetales y efluentes industriales, presentaron bajos niveles de reasociación relativa con la cepa neotipo de humano de *K. pneumoniae* (Seidler, 1975; Knittel, 1977). De este modo, no se encontró correlación entre el cultivo de origen y los aislamientos clínicos conocidos. Además, tampoco se encontró correlación entre el nivel de reasociación relativa y el patrón IMViC o alguna otra característica estudiada.

Se han utilizado muchas vías para intentar clarificar el enigma ecológico y taxonómico de *Klebsiella* en el ambiente. Por ejemplo, los estudios de la respuesta de *Klebsiella* en la prueba de coliformes fecales muestran que cerca del 85% de los aislamientos clínicos y el 16% o más de los aislamientos de origen ambiental, son positivos (Matsen *et al.*, 1974; Dufour y Cabelli, 1976). Asimismo, estos estudios muestran que existían reacciones idénticas en 270 generaciones durante su crecimiento a 35°C y utilizando como medio de cultivo efluentes industriales estériles. Debido a la alta incidencia de *Klebsiella* como coliforme fecal positivo en aislamientos clínicos y su presencia en el tracto gastrointestinal de animales de sangre caliente, se concluyó que *Klebsiella*, de origen ambiental, podría considerarse un coliforme fecal tan válido como *Escherichia coli* (Bagley y Seidler, 1977).

En los estudios de virulencia de *Klebsiella* de procedencia clínica y ambiental en ratones, no hubo diferencias significativas entre los aislamientos. Los valores en ratones de la dosis letal media de cultivos clínicos humanos, mastitis bovina y de origen ambiental

(agua potable, vegetales frescos y aserrín) fueron de 4.6×10^4 UFC (Unidades Formadoras de Colonias), 1.5×10^4 UFC y 4.2×10^4 UFC respectivamente (Bagley y Seidler, 1978).

Se pueden encontrar altas densidades de *Klebsiella* en vegetales, debido a la presencia de sustancias específicas promotoras del crecimiento que permiten su rápida proliferación a partir de inóculos pequeños. Los aislamientos de origen clínico y del ambiente crecen con igual vigor en efluentes industriales, extractos acuosos de aserrín y en la superficie de los vegetales (Nuñez y Colmer, 1968). Se concluye que en los medios acuáticos contaminados con materia orgánica vegetal, ésta sirve como un almacén potencial que permite el crecimiento y diseminación de patógenos oportunistas como *Klebsiella* (Knittel y Seidler, 1977).

Planteamiento del problema

Las especies del género *Klebsiella* están caracterizadas por una nomenclatura que refleja una historia taxonómica muy controvertida. Originalmente, la importancia médica del género la llevó a ser subdividida en tres especies que correspondían a las enfermedades que causaban: *K. pneumoniae*, *K. ozaenae* y *K. rhinoscleromatis*. Conforme la taxonomía se fue haciendo más refinada debido al desarrollo de nuevos métodos, tales como taxonomía numérica, hibridación de DNA y cromatografía de gases, la clasificación de las especies de este género se revisa continuamente.

K. terrigena y *K. planticola* -sin importancia clínica y restringidas a ambientes acuáticos y vegetales- han sido aisladas recientemente en humanos. De acuerdo con estos hallazgos, particularmente *K. planticola* se ha aislado sorpresivamente en infecciones humanas con una alta frecuencia, que va del 3.5 al 18.5% entre todos los aislamientos clínicos de las especies de *Klebsiella*. Más de la mitad de esos aislamientos se recuperaron de secreciones del tracto respiratorio; los siguientes aislamientos más comunes son de orina y heridas.

Debido a que la mayoría de los aislamientos de *Klebsiella* se obtienen de especímenes polimicrobianos, es difícil estimar la importancia de estas cepas como agentes causales de enfermedad. Sin embargo, se ha reportado que de 94 aislamientos de especímenes monomicrobianos se han recuperado 6, lo que nos estaría indicando que podrían estar relacionados con algún patógeno. Esto hace que parezca posible que en adición a *K. pneumonia* y *K. oxytoca* exista una tercera especie de *Klebsiella* que sea capaz de ocasionar infecciones humanas.

Con base en estos hallazgos, se ha reconsiderado la importancia del estudio de *Klebsiella*, a las que sólo se les daba importancia por ser integrantes del grupo coliforme, como organismos indicadores de contaminación de origen fecal. Además la dificultad de realizar pruebas serológicas, particularmente exitosas en estas bacterias, permite plantear la posibilidad de utilizar tanto un método cromatográfico como un método estadístico estandarizado para el manejo de resultados.

Objetivos

- Determinar cuantitativamente, por cromatografía de gases, la composición específica del perfil de ácidos grasos de *Klebsiella oxytoca*, *K. ozaenae*, *K. planticola*, *K. pneumoniae* y *K. rhinoscleromatis*.
- Definir y comparar los perfiles cromatográficos de ácidos grasos de las cinco especies tipo del género *Klebsiella* para definir y obtener un perfil patrón.
- Identificar en los perfiles aquellos ácidos grasos comunes entre las especies, su ausencia o presencia y el porcentaje de área que presentan cada uno.
- Proponer un método de estudio estandarizado para el análisis estadístico de los perfiles de ácidos grasos determinados por cromatografía de gases.

2. Materiales y Métodos

El presente capítulo está dividido en dos partes. La primera describe el método relacionado con la preparación del cultivo de las especies, cosecha, lavado, liofilización, esterificación, extracción e inyección en el cromatógrafo y la segunda describe el método estadístico que se utilizó para el análisis de los resultados.

Perfiles cromatográficos patrón.

Para obtener perfiles cromatográficos, que posteriormente se utilizaron como patrones, además de hacer todo el método bajo condiciones totalmente estandarizadas, los ácidos grasos deben provenir de organismos pertenecientes a una cepa tipo, y realizar el número necesario de repeticiones que validen el análisis estadístico. Las cepas analizadas provienen de la ATCC (catálogo, 1982) y fueron las siguientes: *Klebsiella oxytoca* 13182, *K. ozaenae* 11296, *K. planticola* 33631, *K. pneumoniae* 13882 y *K. rhinoscleromatis* 13884.

Las especies ambientales provienen de aislamientos realizados por el laboratorio de Aerobiología del Centro de Ciencias de la Atmósfera y confirmada su identificación en el laboratorio del Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina y son las siguientes: *K. pneumoniae* 087380 y 087685 (agua), 089711 (aire). *K oxytoca* INDRE (clínica) y 097806 (aire).

Preparación del cultivo

La obtención de resultados confiables se basa en el manejo cuidadoso de la preparación del cultivo, para este estudio se utilizaron cepas procedentes de la ATCC para garantizar un alto porcentaje en la viabilidad y estabilidad genética de los microorganismos.

Después de su recuperación, las bacterias se identificaron por técnicas microbiológicas convencionales, en las que se incluyeron morfología colonial, tinción de Gram y pruebas bioquímicas por el sistema de identificación comercial API20E, API System Analytab Products, Plainview, N Y, USA (Holmes, 1978).

La preparación del cultivo puro se realizó a partir de un tubo que contiene un primer base de la cepa tipificada y de la cual se tomó una porción con una asa de siembra y se distribuyó sobre la superficie del agar nutritivo al descargar el asa en tres líneas paralelas y girar la caja para obtener colonias aisladas.

De cajas de Petri con 25 ml de agar nutritivo (se recomienda utilizar medios Difco u Oxoid que son los que tienen mejor control de calidad en el mercado), se seleccionó una colonia aislada sin colonias satélites y se inocula, se distribuye uniformemente en toda la superficie del agar y se incuba a 37°C por 24 horas, este período se debe a que ahí finaliza el tiempo de crecimiento exponencial y es donde se ha comprobado que no existe variación en la proporción de los ácidos grasos que van a ser extraídos para el análisis (comunicación personal Häusler 1998).

Transcurridas las 24 horas se cosecha la biomasa bacteriana de la superficie del medio de cultivo, lavándola con 5 ml de solución fisiológica isotónica (0.85% de NaCl), cuidando de no romper el agar; las bacterias patógenas se cosechan con Formaldehído al 0.5%. Una vez que se ha desprendido todo el crecimiento celular, con ayuda de una varilla de vidrio, se vierte la suspensión que se forma en un tubo de ensaye y se centrifuga a 4°C durante 10 minutos a 20,000 G (12,000 r.p.m.), el sobrenadante se desecha al final de esta operación. Se adicionan otros 5 ml de suero fisiológico para resuspender la pastilla de biomasa con un vórtex, se centrifuga en las mismas condiciones como para el primer lavado y se desecha el sobrenadante; la operación se repite dos veces más.

Cuando el crecimiento del tapete bacteriano no es muy abundante, se siembra por triplicado y de este modo puede obtenerse suficiente biomasa para extraer los ácidos grasos.

El procedimiento descrito se utilizó para trabajar en el análisis de las especies aisladas del ambiente y la clínica, *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*.

Liofilización

La pastilla de biomasa bacteriana que se forma en el fondo del tubo después de la centrifugación se acondiciona antes de liofilizarla, sumergiendo la base del tubo de ensaye en una mezcla de hielo seco y acetona o de preferencia en nitrógeno líquido para bajar la temperatura hasta los -70°C aproximadamente. La liofilización se realizó en un equipo Labconco Lyph-Lock 4.5 L, con un sistema de enfriamiento en seco (77510.77-510-01), en un periodo de 3 a 4 horas.

El material liofilizado debe quedar esponjoso y separado del tubo para facilitar que las soluciones para la esterificación hidraten y reaccionen con toda la biomasa liofilizada. No se recomienda almacenar el material liofilizado debido a una posible contaminación u oxidación de los ácidos grasos en la muestra, si fuese necesario se deberá congelar a una temperatura de -20°C y el menor tiempo posible.

Extracción y esterificación de los ácidos grasos

El proceso que se describe a continuación se utilizó en el análisis cromatográfico de 268 repeticiones con corrimientos para cada especie tipo, distribuidos de la siguiente manera: 50 para *K. ozaenae* y *K. rhinoscleromatis*; 53 para *K. planticola*; 54 para *K. pneumoniae* y 61 para *K. oxytoca*.

En el caso de las especies ambientales los números de corrimientos fueron 156, distribuidos por especie de la siguiente forma: 30 para *K. pneumoniae* 087380 y 089711; 32 para 087685. En cuanto a *K. oxytoca* 31 para INDRE y 33 para 097806.

El número de análisis por especie tipo está dirigido a la obtención de un perfil patrón contra el cual puedan compararse los corrimientos de una muestra problema.

En un futuro, se pretende contar con un mayor número de perfiles de enterobacterias almacenadas en un banco de datos computarizado. En la práctica cada muestra problema se analizaría por quintuplicado, esto debido a la baja precisión del método, es decir el número de repeticiones para que un valor coincida dentro de un ámbito preestablecido es decir los fijados para cada ácido en los perfiles patrón. Lo anterior no se contrapone a que en algunos casos la exactitud sea del 100% es decir que el valor de un ácido graso coincida con el valor del encontrado en el patrón.

En tubos de ensaye previamente lavados con hexano se pesan 20 mg de biomasa liofilizada a la que se le adiciona 1ml de solución "A" (metóxido de sodio), dejando transcurrir 5 minutos para que se lleve a cabo una reacción de saponificación. Después de los 5 minutos se adicionan de 0.6 a 0.7ml de la solución "B" (metanol saturado con HCl gas), se agita ligeramente con movimientos circulares y se verifica el pH con papel indicador y de ser necesario se ajusta con la misma solución a un pH de 2.

Se deja por 30 minutos más en reposo, y se adicionan 2ml de solución "C" (suero fisiológico al 0.85%) por muestra y se mezclan con movimientos circulares. Se adiciona 1ml de hexano a cada tubo y se agita mecánicamente durante 1 minuto. Cuando se han separado las capas, se extrae la capa superior sobrenadante con una pipeta Pasteur y se transfiere a un tubo de ensaye previamente lavado con hexano y perfectamente seco. Para eliminar los residuos de agua que pudiera contener el extracto, es conveniente adicionar algunos granos de sulfato de sodio, el cual previamente se ha secado en una estufa por 2 horas a 115°C y almacenado en un desecador.

Se hace una segunda extracción con 1ml de hexano que se agita durante un minuto y se reúne la capa de hexano con la anterior. Se repite esta misma operación para la tercera extracción. Si las capas no se separan fácilmente después de la agitación, la muestra puede centrifugarse a 2,000 ó 3,000 r.p.m., por 5 o 10 minutos.

El volumen total de hexano que contiene a los ésteres metílicos extraídos de los ácidos grasos es de 3ml, el cual se evapora (sumergiendo el vial en un recipiente con agua) con N₂ gas hasta un volumen aproximado de 10 µl; de ese volumen final se toma 1 µl de

muestra (cantidad suficiente dada la sensibilidad del aparato y el tipo de columna capilar que se utiliza) para inyectarse directamente al cromatógrafo de gases.

Análisis de los ácidos grasos esterificados

La alícuota de 1 μ l de la fracción obtenida para los ésteres metílicos y se analiza en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard (HP) modelo 5890 A, con un inyector sólido HP Chromopack 8990 y un detector de ionización de flama hidrógeno SGE OCI-3, con una columna capilar de sílice-fundido (Alltech A.,INC. 30 M por 0.25 mm Heliflex Bonded FSOT RSL-150 0.25 mm MAOT:33 OC) cubierta con CPS y 0.25 μ m de grosor en la capa como fase estacionaria.

En principio, la mezcla de ésteres de ácidos grasos puede separarse tanto en columna normal como en columna capilar; sin embargo, los resultados en columna capilar son más confiables debido a que puede obtenerse en ella una separación más fina de los compuestos, proceso en la que también interviene su longitud y tipo de fase estacionaria empleada.

En este estudio se utilizó una columna capilar de película líquida debido a que en estas se pueden separar tanto isómeros de posición como isómeros geométricos (Holme, 1983).

Las condiciones de operación fueron las siguientes:

- a) Temperatura del inyector 270°C.
- b) Temperatura del detector 270°C.
- c) Presión del nitrógeno 50 Psi.
- d) Temperatura programada de la columna de 120°C a 270°C con incrementos de 4°C/minuto.
- e) Gas acarreador Nitrógeno con un flujo aproximado de 30ml/minuto al puerto de inyección.

Bajo estas condiciones los ésteres metílicos de los ácidos grasos, con 12 a 19 carbonos, eluyeron de la columna en 35 minutos en promedio. La cuantificación de las áreas de los picos cromatográficos fue ejecutada por un integrador electrónico HP 3396 A, acoplado al cromatógrafo.

Los picos de los ésteres metílicos de los ácidos grasos fueron identificados primariamente por la comparación de los tiempos de retención de cada especie bacteriana, con los tiempos de retención de una mezcla estándar de ésteres metílicos de los ácidos grasos bacterianos de Supelco, Inc, Bellafonte, Pa. USA, referencia 4-7080. La mezcla contiene un total de 10 mg/ml de ésteres metílicos en metil caproato. El número de veces que se realizó cada análisis, que consiste de siembra, cosecha, esterificación e inyección en el cromatógrafo, fue en número de repeticiones tal como se describe en el punto de extracción y esterificación.

Análisis estadístico

A partir de los picos de los ácidos grasos obtenidos en los cromatogramas, se seleccionaron aquellos con un número de átomos de carbono en el intervalo de 12 a 19, en general puede decirse que las bacterias tienen más del 95% de su complemento lipídico total asociado a su membrana celular, el restante 5% se distribuyen entre el citoplasma y la pared celular, para este estudio resultan de particular importancia los del intervalo mencionado.

Los ácidos con una cadena de menos de 12 carbonos aparecen como productos metabólicos intermedios, razón por la cual no se toman en consideración para este trabajo. Una vez determinados los picos de importancia con respecto al cromatograma del estándar que contiene la mezcla de ácidos grasos, la información se procesó de la siguiente manera:

Normalización

el método mediante el cual se estandarizan las áreas de los ácidos grasos que aparecen en el cromatograma para convertirlos a porcentajes de área y de esta manera analizar a las especies bacterianas por los métodos estadísticos que se describen más adelante. El proceso de normalización se lleva a cabo al transformar los datos numéricos de área y tiempo a porcentajes con relación a un dato de área o tiempo de referencia y al que se le asigna un valor del 100%.

El criterio a seguir es el siguiente: de los datos originales del cromatograma, se elige arbitrariamente como dato de referencia para la normalización, aquel pico con el área más alta y se le asocia el tiempo, por una conversión, basada en un estándar y que corresponde al ácido graso con mayor área. En el caso de las Enterobacterias el ácido graso de mayor área es el de 16 átomos de carbono. Una vez que los datos se han normalizado se procede a tabularlos y graficarlos por las repeticiones efectuadas en cada tipo bacteriano (Häusler, 1987).

Medidas estadísticas descriptivas

Se calcularon para cada especie la media, varianza, error estándar, mediana, máximo y mínimo e intervalos de confianza para la media de las áreas de los picos normalizados.

Los valores se calcularon como porcentajes del total del área del pico para eliminar el efecto de la variación debido a los volúmenes tan pequeños de muestra (1 μ l) que se inyectan manualmente en el cromatógrafo. Asimismo, se calculó una matriz de correlación múltiple graficando los resultados en un diagrama de escalera.

Análisis discriminante

Se propuso este análisis (Everitt, 1991), tomando como factor de clasificación a las cinco especies tipo del estudio. Dicho análisis arrojó resultados sobre estadística básica para los

idos grasos comunes (media aritmética y desviación estándar), coordenadas cartesianas los centroides y coeficientes no estandarizados por función discriminante. Así mismo, incluye el análisis para cada una de las funciones discriminantes obtenidas, su valor, porcentaje relativo y correlación canónica respectivamente (Flury y Hedwyl, 1988).

Con las dos funciones principales, se elaboró una gráfica cartesiana para ubicar espacialmente a las cinco especies.

Análisis de conglomerados

Para establecer la relación entre las especies tipo, con base en las áreas de los ácidos grasos comunes, se utilizó como medida de similitud $1-r$ de Pearson y como método de agrupación el de ligamiento completo. También se utilizó este análisis, para establecer la relación con base en la presencia-ausencia de los ácidos grasos. Para ello se utilizó como medida de similitud el porcentaje de discordancia y como método de agrupación el de ligamiento completo.

Para las especies ambientales se utilizaron los métodos estadísticos del análisis discriminante para la ubicación de las especies tipo y ambientales en el plano cartesiano; con base en el área de ácidos grasos comunes a todas las especies se aplicó el análisis de correlación de Pearson para obtener un dendograma que nos muestre la distancia entre las especies (a menor distancia mayor similitud). El índice de Jaccard se realizó con base en los datos de ausencia-presencia de ácidos grasos y de los cuales también se obtiene un dendograma de disimilitud.

3. Resultados

A. Análisis cromatográfico de ácidos grasos de especies tipo de *Klebsiella*.

Para determinar los patrones de ácidos grasos en las diferentes especies de *Klebsiella*, se realizaron análisis cromatográficos de lisados bacterianos. Las repeticiones iniciales, de cada especie tipo fueron: *K. ozaenae* y *K. rhinoscleromatis* 50, *K. planticola* 53, *K. pneumoniae* 54 y *K. oxytoca* con 61. Con los datos obtenidos se pudo establecer que 30 es el número de repeticiones necesarias para validar estadísticamente el método empleado. Los resultados obtenidos en cada repetición del ensayo se normalizaron y expresaron en por ciento de área con respecto al ácido graso con 16 carbonos, que presenta la mayor área en el cromatograma (Tablas 1 a 5, anexo), resultando que son 10 ácidos grasos los que de manera constante se encuentran en las 5 especies de *Klebsiella* (Tabla 6, anexo). Asimismo, se observan en las células bacterianas tres clases de ácidos grasos, determinados en el análisis cromatográfico: saturados, insaturados y ciclopropanos (Tabla 7, anexo y Figura 1).

La estadística descriptiva de los diferentes ácidos grasos de las 5 especies de *Klebsiella* se presenta en la tabla 6 (anexo), en estas se incluyen datos referentes al tamaño de muestra, media, varianza, error estándar, mediana, máximo y mínimo y los intervalos de confianza para la media al 95%.

Al determinar los valores de la media aritmética se encontró que estos son cercanos a los de la mediana, e incluso, los casos aberrantes detectados se observan solo entre el 4.6 y el 5% del total de la muestra. Con base en una inspección visual de los valores de la mediana y que aparecen representadas en los diagramas de caja, se identificaron los grupos mencionados con valores altos, intermedios y bajos y a los que se les denominó G-I, G-II y G-III respectivamente.

El análisis de estos resultados permitió establecer después de las diferentes repeticiones, que son 13 los ácidos grasos más comunes para *K. ozaenae* distribuidos en tres grupos con respecto a la mediana (Tabla 8 y Figura 2 A). Para esta especie se determinó como el más abundante al ácido graso de 14 carbonos y con el valor más bajo de la mediana al insaturado (monoenoico) C18:1⁹.

Con respecto a *K. pneumoniae* se encontraron 12 ácidos grasos constituidos en dos grupos (Tabla 8, Figura 2 B). En esta especie aparece de nuevo el C14:0 con el mayor valor de la mediana y el hidroxiaácido C14:0 2OH como el de menor valor.

En *K. oxytoca* se observaron dos grupos en los diagramas de caja, siendo el de mayor abundancia el ciclopropano C17:0 Δ y el hidroxiaácido C14:0 3OH el menos abundante (Tabla 8, Figura 2 C)

Las especies *K. planticola* y *K. rhinoscleromatis* presentan el mismo ácido graso, en el primer grupo y con el mayor valor de la mediana al insaturado (monoenoico) C16:1⁹. El menor valor de la mediana corresponde, en el caso de *K. planticola*, al ciclopropano C19:0 Δ y en el caso de *K. rhinoscleromatis* al insaturado (dienoico) C18:2^{9,12} que junto con *K. ozaenae* son las únicas especies que lo presentan (Tabla 8, Figuras 2 D y 2 E).

Análisis de correlación múltiple

En la figura 3, se ilustra el diagrama de escalera (Curts, 1994) correspondiente a las correlaciones entre los ácidos grasos comunes. De esta se desprende que las correlaciones mas altas están entre las áreas normalizadas del ácido graso saturado C14:0 y el hidroxiaácido C14:0 3OH ($r = 0.77$), de los saturados C15:0 y C17:0 ($r = 0.63$) y entre el saturado C15:0 y el monoinsaturado C16:1⁹ ($r = 0.42$).

Análisis discriminante

Para llevar a cabo este análisis, se calculó la matriz de varianzas-covarianzas (Tabla 9, anexo) ponderada para las cinco especies. A partir de ella, se estimaron 4 funciones discriminantes no estandarizadas de la forma:

$$Z_i = a_{i0} + a_{i1} X_1 + a_{i2} X_2 + \dots a_{ip} X_p$$

El valor de los coeficientes a_{ik} se presenta en la tabla 10 (anexo), en esta se observan los valores de los coeficientes no estandarizados para las 4 funciones discriminantes y para cada ácido graso. La tabla 11 (anexo), presenta los eigenvalores, el porcentaje de varianza acumulado y la correlación canónica. De esta tabla se desprende que el estudio para discriminar los 9 ácidos grasos comunes entre estas cinco especies puede estar descrita por las primeras dos funciones discriminantes, que en conjunto explican la variabilidad total de los datos (96.27%).

Con la finalidad de visualizar el proceso de discriminación anteriormente descrito, en la tabla 12 (anexo) se muestran los valores de los centroides para cada una de las especies que aparecen en la figura 4 y en donde se grafican los resultados de ambas funciones. En esta figura se observa que la función discriminante uno, separa de manera significativa a la especie *K. ozaenae* (1) con respecto a los otros grupos, cuyo centroide está localizado en las posiciones -1.4 y 8.69 . En cambio, la función discriminante dos, separa fundamentalmente a las especies *K. planticola* (4) y *K. rhinoscleromatis* (5), con centroides de -0.26 y 3.6 , y -0.6 y 3.0 respectivamente, del resto de las especies y observándose claramente el empalme entre ambas.

Ambas funciones poseen un nivel significativamente alto de discriminación, ya que sus correlaciones canónicas son del orden de 0.98 y 0.94 , respectivamente (Tabla 11, anexo).

Con respecto a las funciones discriminantes uno y dos que separan a las especies *K. pneumoniae* (2) y *K. oxytoca* (3), los centroides presentan un valor de -1.12 y -3.1 , y -5.43 y -1.68 respectivamente, también se observa claramente en la figura 4 que ambas especies forman dos grupos bien definidos.

Ausencia-presencia de los ácidos grasos característicos de las cinco especies

En este análisis se determinó que los ácidos grasos saturados, Láurico (C12:0), Mirístico (C14:0), Palmítico (C16:0) y Esteárico (C18:0) fueron los más comunes en las diferentes especies de *Klebsiella* estudiadas. Los ácidos grasos identificados son los mismos que se han descrito como propios de la familia Enterobacteriaceae. (Tabla 6, anexo).

Para el desarrollo del dendograma antes referido se utilizaron las áreas de cada ácido graso (tabla 6, anexo), en esta se observa que *K. ozaenae* no presenta el ácido graso ciclopropano C19:0 Δ , en tanto que *K. pneumoniae* no posee los ácidos grasos insaturados C18:2^{9,12} y C18:1⁹, la ausencia del hidroxiácido C14:0 2OH y de los insaturados C18:2^{9,12} y C18:1⁹ en *K. oxytoca* y *K. planticola*. También se puede observar que estas dos últimas especies presentan un patrón muy similar al de *K. rhinoscleromatis* con la única diferencia que esta especie presenta el ácido graso insaturado (dienoico) C18:2^{9,12}.

En la figura 5 se presenta el dendograma, preparado a partir de las áreas de los ácidos grasos de las cinco especies analizadas utilizando como medida de similitud $1-r$, en esta se pueden observar tres grupos que se constituyeron de la siguiente manera: un primer grupo con *K. rhinoscleromatis* y *K. planticola* al mismo nivel de agrupamiento, el otro formado por *K. oxytoca* y *K. pneumoniae* con una distancia entre ambas de 0.09, asimismo ambos grupos se combinan a una distancia de 0.25. En el tercer grupo se encuentra solamente *K. ozaenae*, que se relaciona a una distancia de 0.84 con los anteriores.

3. Caracterización de ácidos grasos en especies de *Klebsiella* de origen clínico y ambiental.

Como en el caso de las especies tipo de *Klebsiella*, en las de origen clínico y ambiental se realizó el análisis de ácidos grasos. Al analizar las áreas de los ácidos grasos determinados, normalizados y expresados como porcentaje en cada una de las especies aisladas de los diversos ambientes (agua, aire y clínica) se observó un comportamiento similar en el número y tipo de ácidos grasos con respecto a lo observado en las especies tipo (Tablas 13-17, anexo).

Análisis del perfil de ácidos grasos de las diferentes especies de *Klebsiella*.

Al graficar los valores de área de cada ácido graso por especie se observaron patrones para cada una. Lo anterior se confirmó cuando se graficaron los perfiles de la cepa tipo y las especies ambientales de *K. oxytoca*, que presentaron un perfil característico para la especie (Fig.6). Por el contrario al realizar el mismo análisis con las cepas de *K. pneumoniae* y comparar este con lo obtenido en la gráfica anterior de *K. oxytoca*, se puede observar que existen diferencias entre los perfiles de ambas especies. La diferencia principal se debe a las abundancias relativas y a que las especies de *K. pneumoniae* también presentan el hidroxiácido C14:0 2OH (Fig.7).

Validación del análisis utilizando áreas de ácidos grasos por el método de análisis de discriminantes y el de conglomerados, respectivamente.

En la tabla 18 (anexo) se presenta la estadística descriptiva de las especies de *Klebsiella*, aisladas del ambiente y la clínica; en las tablas 19 y 19-A (anexo) y figura 8, el por ciento de los grupos de ácidos grasos (saturados, insaturados y cíclicos) para las mismas

especies, además de las dos especies tipos, correspondientes a los aislamientos arriba mencionados. En la tabla 20 (anexo) se presentan los valores de los coeficientes no estandarizados para las 4 funciones discriminantes, así como los eigenvalores, el porcentaje de varianza acumulado y la correlación canónica. El estudio para discriminar las especies en función de 9 ácidos grasos comunes queda descrita por las primeras tres funciones discriminantes (Tabla 21, anexo), lo que en conjunto explica el 94.6% de la variabilidad total de los datos.

Con la finalidad de analizar el proceso de discriminación, en la tabla 22 (anexo) se muestran el valor de los centroides para cada una de las 8 especies (3 tipificadas y 5 ambientales). Con estos datos utilizados para todas las especies estudiadas, se puede observar como se constituyen tres grupos (Figura 9), el primero corresponde a *K. pneumoniae* (sp2, tipo) y los otros dos corresponden, uno a las especies *K. oxytoca* (3, 9 y 10, que son tipo, clínica y ambiental respectivamente) y otro formado por la especie tipo *K. rhinoscleromatis* (5) y los tres aislamientos de *K. pneumoniae*, (6 y 8) procedentes de agua y (7) del aire.

Con el coeficiente de correlación de Pearson, se realizó un dendograma empleando las áreas de los 9 ácidos grasos comunes de las ocho especies analizadas (Figura 10). En este dendograma se observan (a una distancia reajustada) los valores de la distancia existente entre las especies, por lo tanto los valores más cercanos a cero indican una mayor correlación entre especies.

Se distinguen 2 subgrupos que se muestran en el diagrama: el primero constituido por las especies ambientales 6, 8 y 7 de *K. pneumoniae*; de las cuales 6 y 8 (aislamientos ambientales de agua) son las más próximas entre sí al correlacionarse a una distancia de 1, a su vez la especie 7 (aislamiento del aire) se correlaciona con las especies, 6 y 8 a una distancia de 6 en el dendograma.

Este primer subgrupo se asocia a la especie tipo *K. rhinoscleromatis* (sp5) a una distancia de 11, formando a su vez un grupo con las especies ambientales de *K. pneumoniae* y la tipo de *K. rhinoscleromatis*.

El segundo subgrupo que se observa es el formado por las especies de *K. oxytoca* (9, 10, y 3) e igual que en el caso anterior 9 y 10 se correlacionan a una distancia de 1, y ambas con la especie 3 (tipo) a una distancia de 6.

El segundo grupo, asocia a la especie tipo *K. pneumoniae* (2) con las especies tipo, clínica y ambiental de *K. oxytoca* a una distancia de 13 unidades en el dendograma.

Los dos grandes grupos formados por las especies ya mencionadas se relacionan a una distancia de 25 en el dendograma.

El patrón de distribución encontrado se explica analizando la tabla 23 (anexo), en donde se puede observar que *K. pneumoniae*, tanto la especie tipificada como las ambientales, no presentan los ácidos grasos insaturados C18:2^{9,12} y C18:1⁹. También se puede observar en las especies de *K. oxytoca*, tipificada, clínica y ambiental la ausencia del hidroxíácido C14:0 2OH y de los insaturados, C18:2^{9,12} y C18:1⁹, dienoico y monoenoico respectivamente. Con respecto a la especie tipo de *K. rhinoscleromatis*, ésta es la única que presenta el ácido graso C 18:2^{9,12} y la ausencia del C14:0 2OH, como en el caso de *K. oxytoca*.

En la tabla 23 (anexo) también se puede observar que de los 14 ácidos grasos determinados, los más comunes son 10 (incluido el saturado de 16 carbonos que es el que presenta la mayor área en los cromatogramas) tanto entre las especies tipo como en las aisladas de diferentes fuentes.

Con respecto a la presencia-ausencia, de todos los ácidos grasos que se determinaron en las 8 especies, y con base en el índice de Jaccard, los valores de discordancia muestran, que existe correlación entre los grupos que aparecen tanto en el gráfico del análisis de discriminantes como en el dendograma. Al respecto se encontró una distancia de aproximadamente 1, entre los siguientes grupos: el formado por *K. oxytoca* tipo (sp3), clínica (sp9) y del aire (sp10) y el formado por *K. pneumoniae* tipo (sp2) y las aisladas de aire (sp7) y agua (spp 8 y 6). Entre los conglomerados mencionados se observa la presencia de la especie tipo *K. rhinoscleromatis*, la cual se

relaciona con el conglomerado de *K. oxytoca* a una distancia de 21 y a su vez este conglomerado se correlaciona con *K. pneumoniae* tipo a una distancia de 25 (Figura 11). En las especies ambientales, pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae, también se presentaron como en las cepas tipo, los ácidos grasos saturados característicos, Láurico (C12:0), Mirístico (C14:0), Palmítico (C16:0) y Esteárico (C18:0). De acuerdo con los valores de abundancia relativa de los 9 ácidos grasos comunes para las 8 especies, la posición de cada una de las especies es clara en el diagrama de dispersión (Fig. 9); solo llama la atención la presencia de las especies de *K. pneumoniae* de origen ambiental (6, 7 y 8) en un grupo, asociadas a la presencia de *K. rhinoscleromatis* tipo, mientras que *K. pneumoniae* tipo (sp 2), aparece formando otro.

Valores de área (abundancia relativa) de los ácidos grasos, expresada en porcentajes para establecer la identidad entre especies de *Klebsiella*.

Como se observó previamente en el gráfico de discriminantes, existe proximidad entre los valores obtenidos para cada especie, siendo más evidente en los ácidos grasos saturados C14:0, insaturados (monoenoicos) C16:1⁹, C18:1⁹trans y C18:1¹¹cis y el ciclopropano C17:0 Δ .

Como se ha mencionado, las áreas de ácidos grasos analizados son similares en las diferentes cepas estudiadas, sin embargo, si observamos el gráfico de análisis discriminante y los dendogramas que se obtuvieron utilizando el coeficiente de correlación de Pearson, se puede sugerir que los perfiles de otras especies de bacterias podrían presentar perfiles diversos por género y especies y de este modo lograr un arreglo que permita distinguir y visualizar las correlaciones existentes entre ellas.

Lo anterior se basa en el hecho de que el perfil de ácidos grasos de una bacteria es el resultado de la expresión génica, por lo que está altamente conservado y la estructura de la membrana celular corresponde a su huella digital, por lo que es difícil que se obtenga en dos especies un perfil idéntico.

Un aspecto importante sería contar con una base de datos que permita tener registros del perfil de ácidos grasos para que en un momento determinado se puedan analizar los cambios intra e interespecíficos presentes en las poblaciones bacterianas autóctonas, sujetas a ambientes específicos.

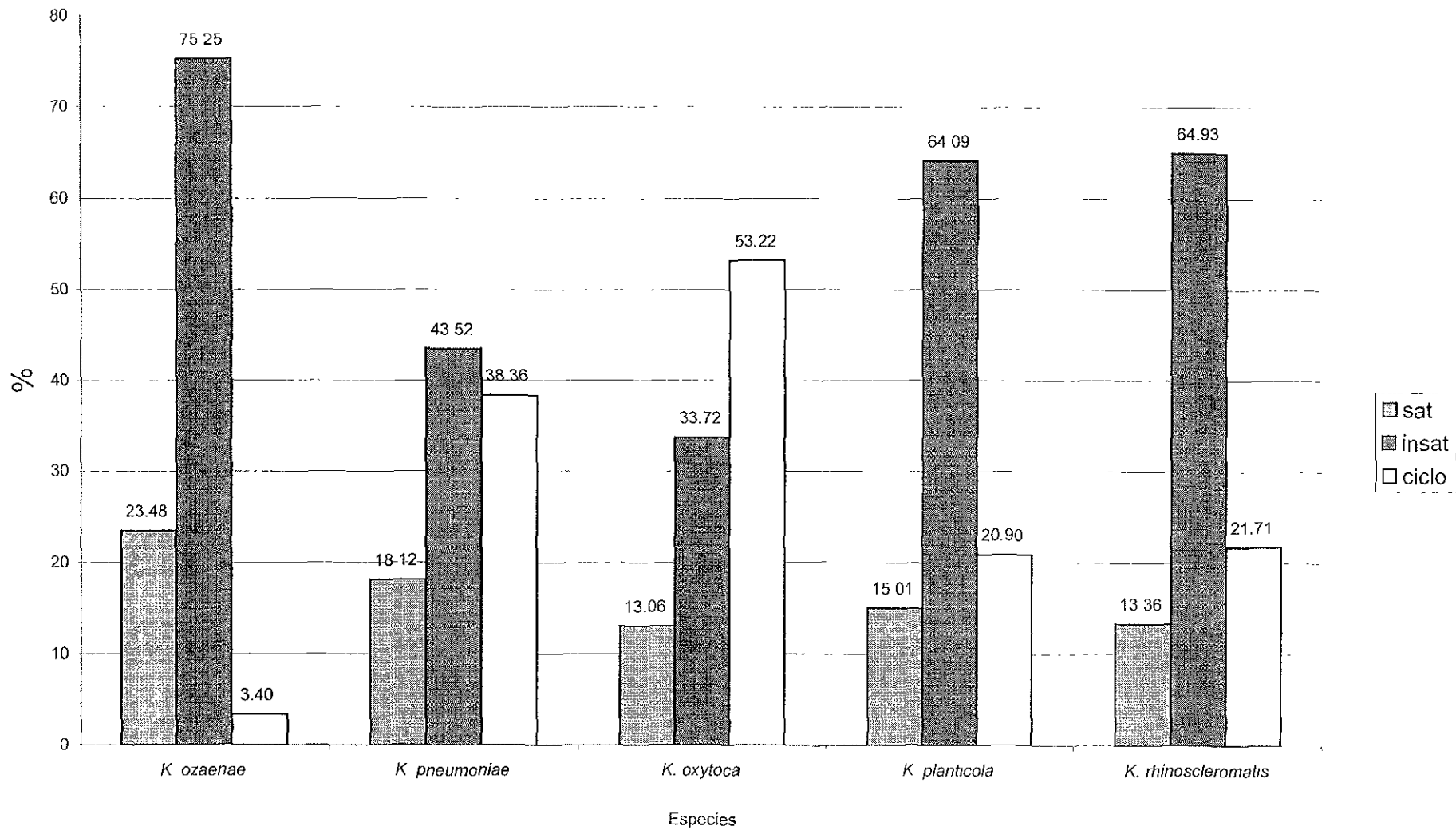


Figura 1. Distribución de los diferentes grupos de ácidos grasos en especies tipo de *Klebsiella*. Se muestra el análisis cromatográfico obtenido en porcentaje relativo de los diferentes grupos de ácidos grasos identificados.

Tabla 8. Grupos de ácidos grasos identificados con respecto a las medianas de su concentración relativa

	Grupo I					Grupo II				Grupo III				
	Saturado	Insaturados				Saturados			Insaturados		Saturado	Ciclopropano	Insaturado	
		monoenoicos							hidroxiácidos				dienoico	monoenoico
<i>K. ozaenae</i>	C 14:0	C 16:1 ⁹	C 18:1 ⁹ trans	C 18:1 ¹¹ cis		C 15:0	C 17:0	C 18:0	C 14:0 2-OH	C 14:0 3-OH	C 12:0	C 17:0 Δ	C 18:2 ^{9,12}	C 18:1 ⁹
	medianas: 30.9 a 66.7%					medianas: 1.4 a 10.6%				medianas: 0.20 a 0.55%				
	Grupo I					Grupo II								
	Saturados				Insaturado hidroxiácido	Saturado	Insaturado monoenoico		Hidroxiácido	Ciclopropanos				
	C 12:0	C 15:0	C 17:0	C 18:0	C 14:0 2-OH		C 14:0	C 16:1 ⁹	C 18:1 ⁹ trans C 18:1 ¹¹ cis	C 14:0 3-OH	C 17:0 Δ	C 19:0 Δ		
medianas: 0.95 a 3.7%					medianas: 8.3 a 46.2%									
	Grupo I					Grupo II				Grupo III				
	Saturados					Insaturado hidroxiácido	Insaturado monoenoico		Ciclopropano	Ciclopropano				
	C 12:0	C 14:0	C 15:0	C 17:0	C 18:0	C 14:0 3-OH	C 16:1 ⁹	C 18:1 ⁹ trans C 18:1 ¹¹ cis	C 19:0 Δ	C 17:0 Δ				
medianas: 1.6 a 6.4%					medianas: 15.0 a 30.0%				mediana: 54.47%					
	Grupo I					Grupo II								
	Saturados					Insaturados hidroxiácido	Ciclopropano	Insaturados Monoenoicos		Ciclopropano				
	C 12:0	C 14:0	C 15:0	C 17:0	C 18:0	C 14:0 3-OH		C 19:0 Δ	C 16:1 ⁹		C 18:1 ⁹ trans C 18:1 ¹¹ cis	C 17:0 Δ		
medianas: 1.6 a 11.2%					Medianas: 32.1 a 61.0%									
	Grupo I					Grupo II					Grupo III			
	Saturados					Insaturados hidroxiácidos	Ciclopropano	Insaturado Monoenoico		Ciclopropano	Insaturado Dienoico			
	C 12:0	C 14:0	C 15:0	C 17:0	C 18:0	C 14:0 3-OH		C 19:0 Δ	C 16:1 ⁹	C 18:1 ⁹ trans C 18:1 ¹¹ cis	C 17:0 Δ	C 18:2 ^{9,12}		
medianas: 1.8 a 10.0%					medianas: 33.0 a 61.4%					mediana: 0.17%				

Figura 2 A. Distribución de las áreas normalizadas (%) de cada ácido graso en *K. ozaenae*

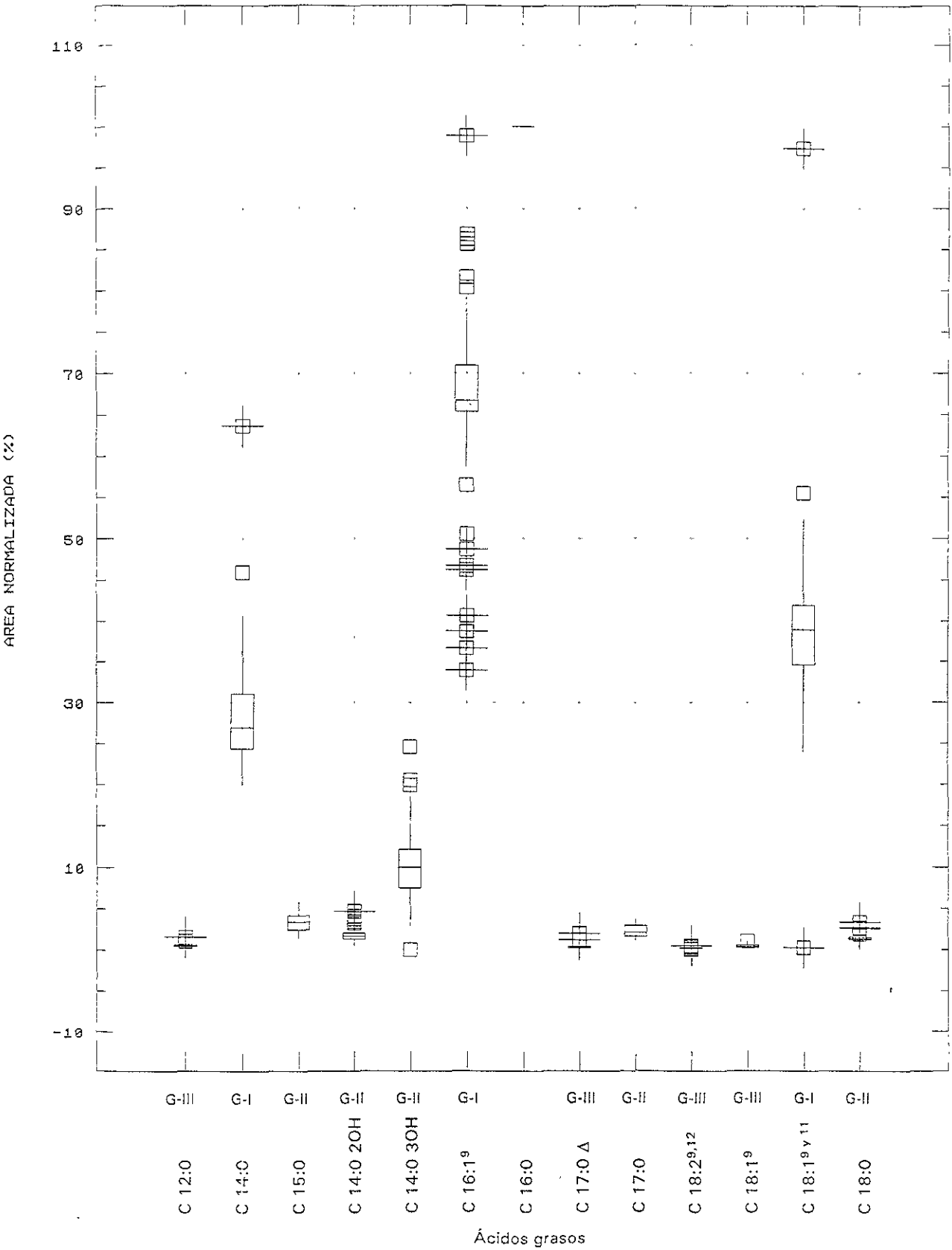


Figura 2 B. Distribución de las áreas normalizadas (%) de cada ácido graso en *K. pneumoniae*

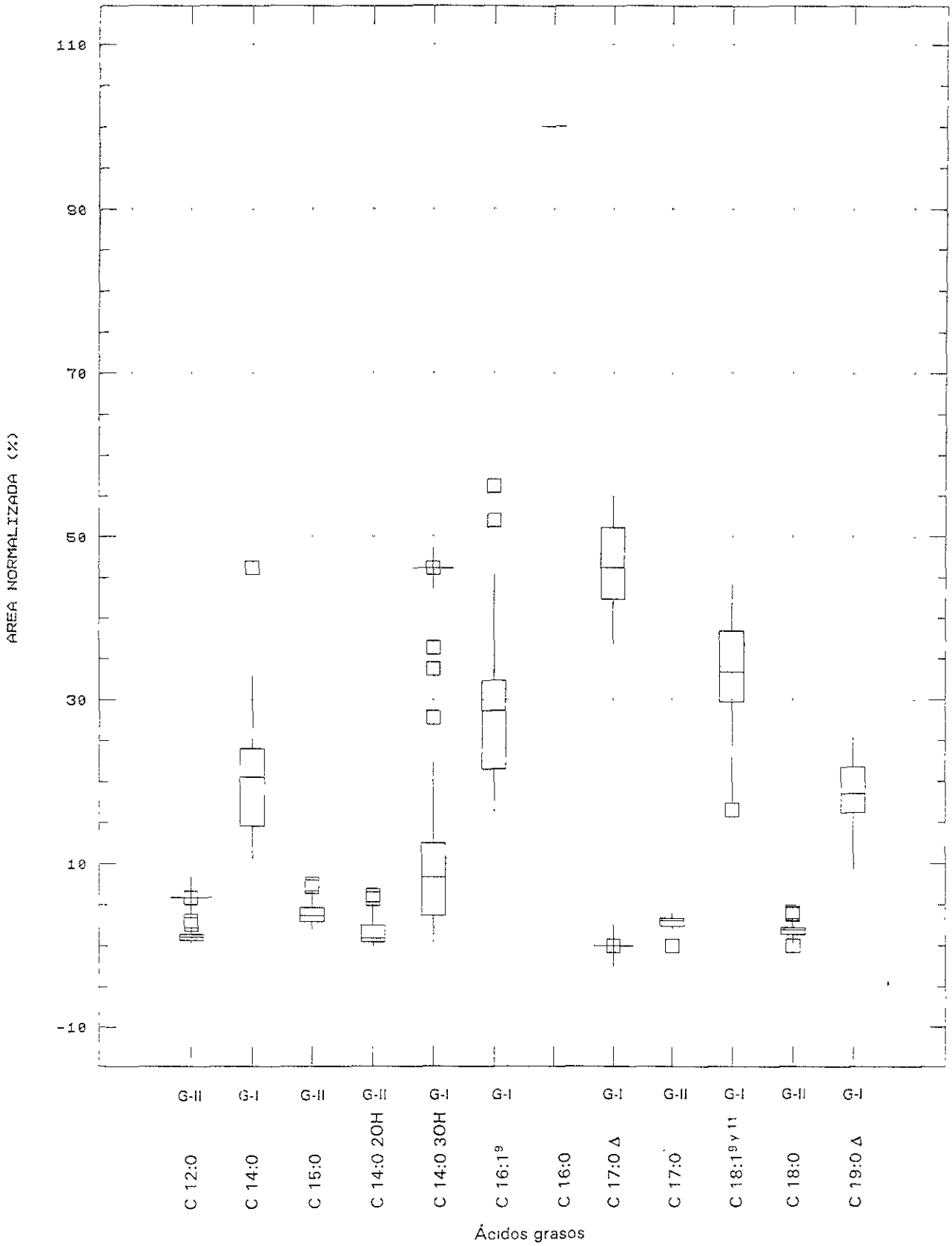


Figura 2 C. Distribución de las áreas normalizadas (%) de cada ácido graso en *K. oxytoca*

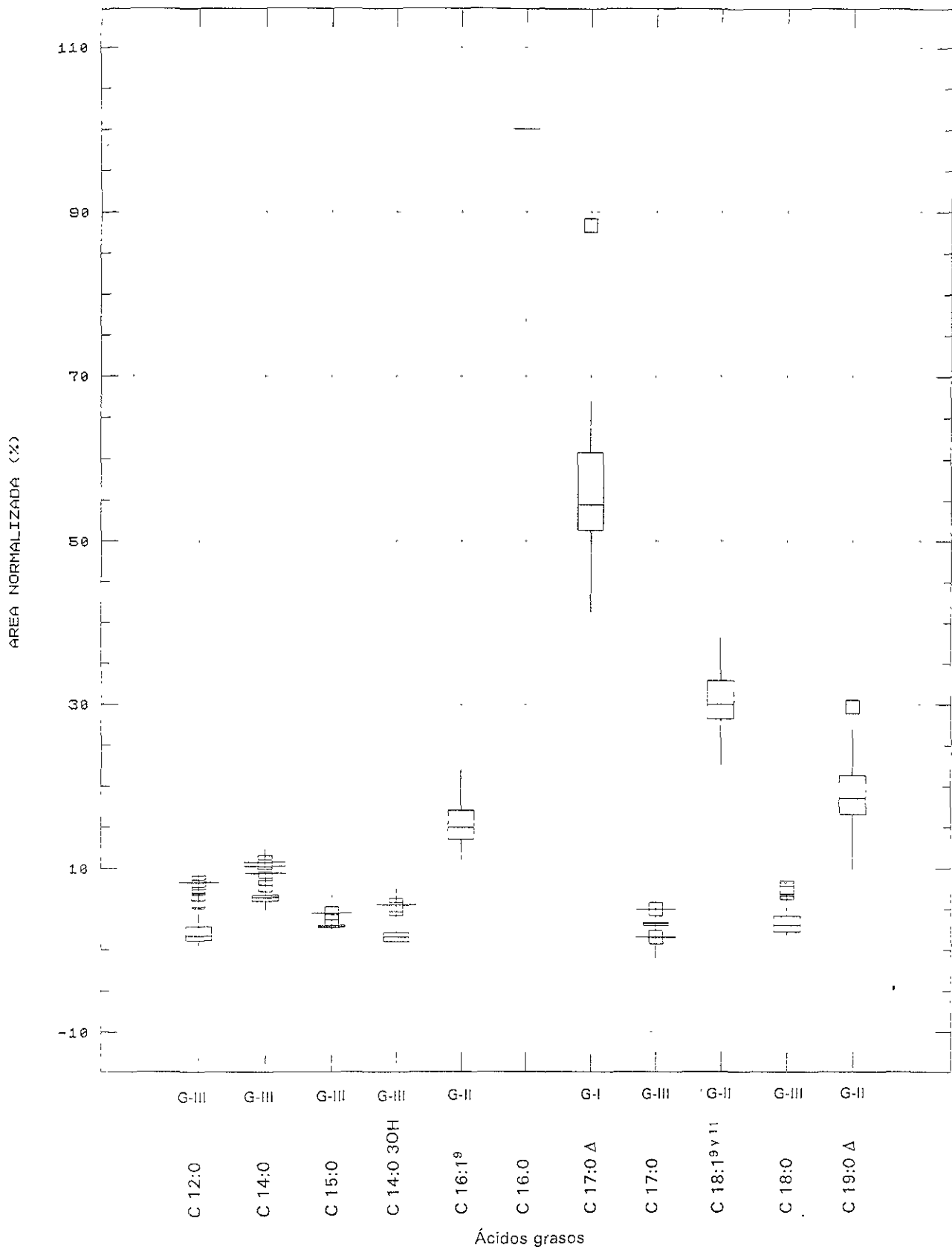


Figura 2 D. Distribución de las áreas normalizadas (%) de cada ácido graso en *K. planticola*

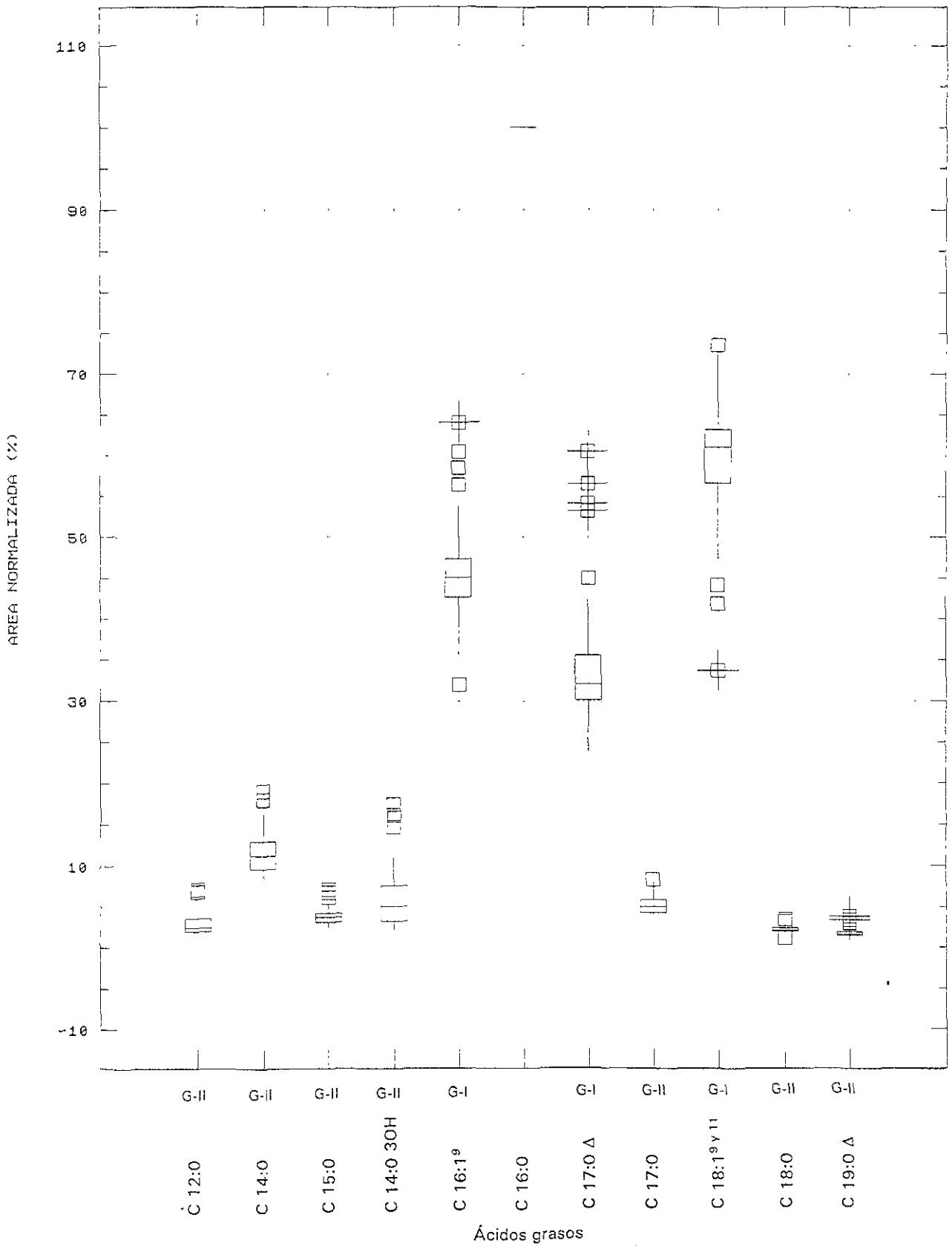
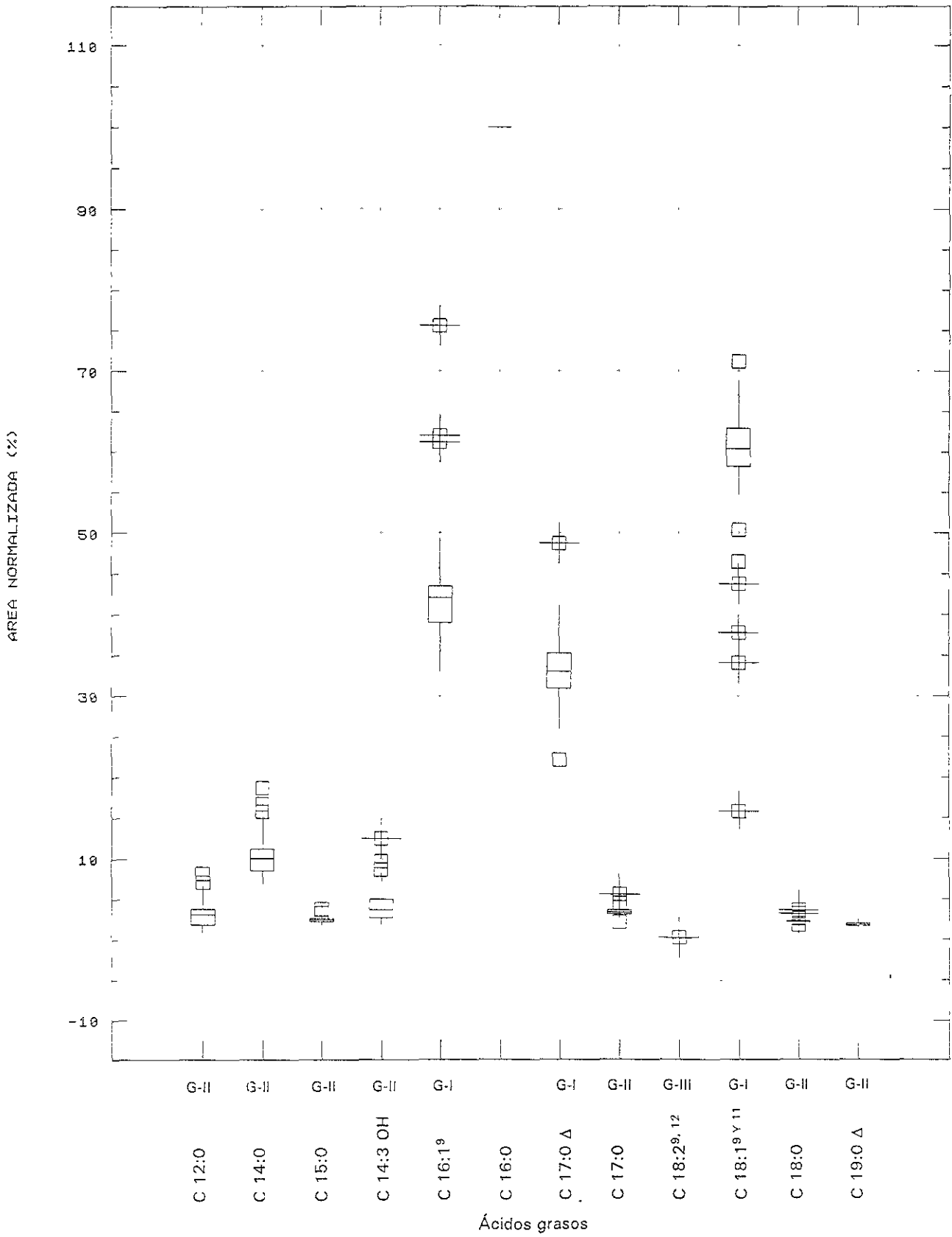


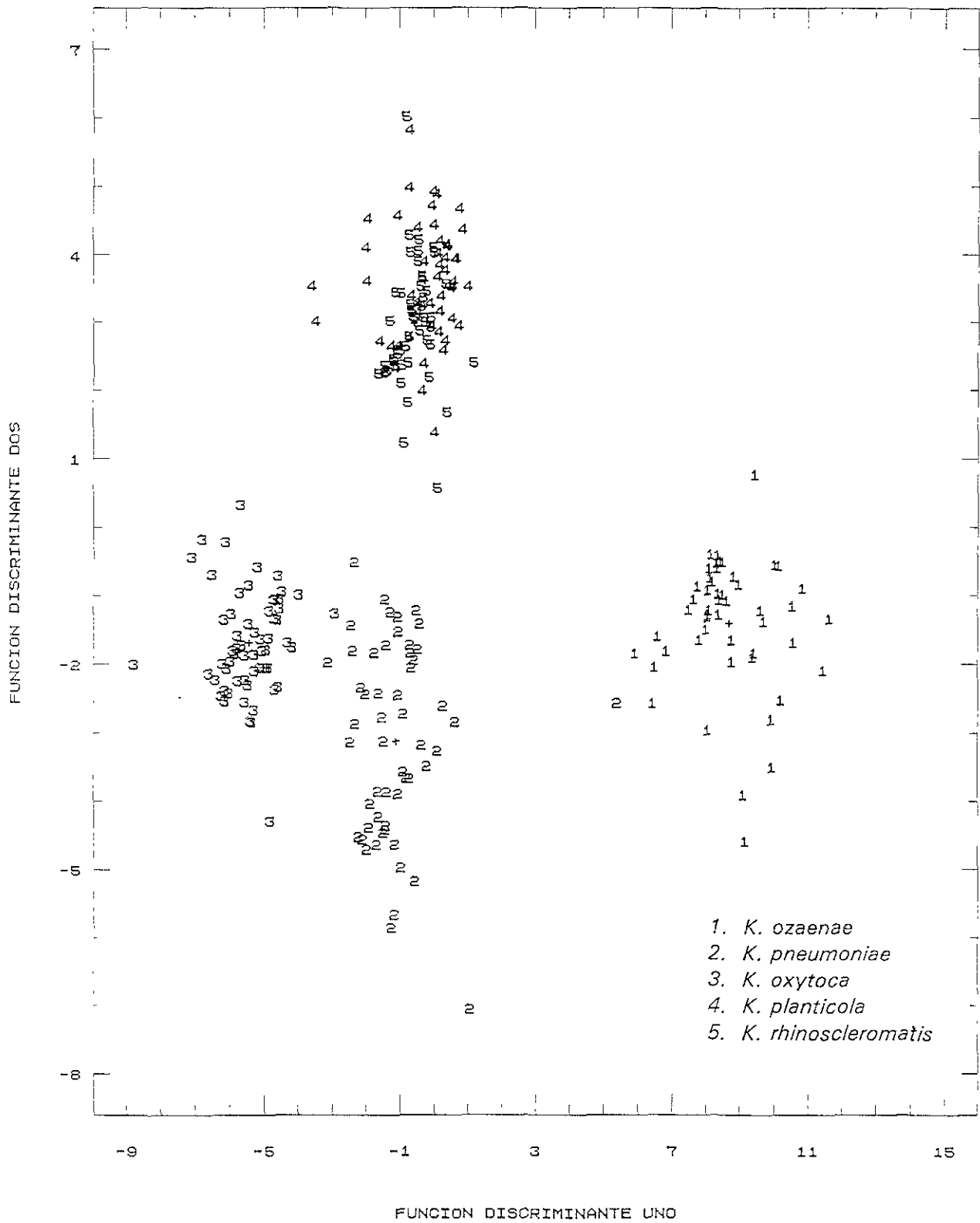
Figura 2 E. Distribución de las áreas normalizadas (%) de cada ácido graso en *K. rhinoscleromatis*



n = 268 *r > 0.40 P < 0.05		Saturados					Insaturados			Ciclopropano
		C12:0	C14:0	C15:0	C17:0	C18:0	hidroxiácido	monoenoico		
							C14:0 3 OH	C16:1 ⁹	C18:1 ⁹ trans C18:1 ¹¹ cis	
S a t t u r a d o s	C12:0	1.00								
	C14:0	0.37	1.00							
	C15:0	0.08	0.14	1.00						
	C17:0	0.04	-0.05	0.63*	1.00					
	C18:0	0.29	-0.00	-0.16	0.15	1.00				
I n s a t u r a d o s	hidroxiácido C14:0 3 OH	0.38	0.77*	0.19	-0.14	-0.11	1.00			
	monoenoico C16:1 ⁹	0.10	0.16	0.42*	0.20	-0.13	0.20	1.00		
	monoenoico C18:1 ⁹ trans C18:1 ¹¹ cis	-0.02	0.07	0.15	0.18	0.08	0.00	0.10	1.00	
Ciclopropano	C17:0 Δ	-0.08	0.16	0.23	0.25	-0.14	0.12	0.11	-0.03	1.00

Figura 3. Matriz de correlación múltiple entre grupos de ácidos grasos comunes de las cinco especies de *Klebsiella* (diagrama de escalera). El análisis muestra que las correlaciones más altas se presentan entre C14:0 / C14:0 3OH; C15:0 / C17:0 y entre C15:0 y C16:1⁹.

Figura 4. ANALISIS DISCRIMINANTE DE LOS ACIDOS
GRASOS COMUNES POR ESPECIE



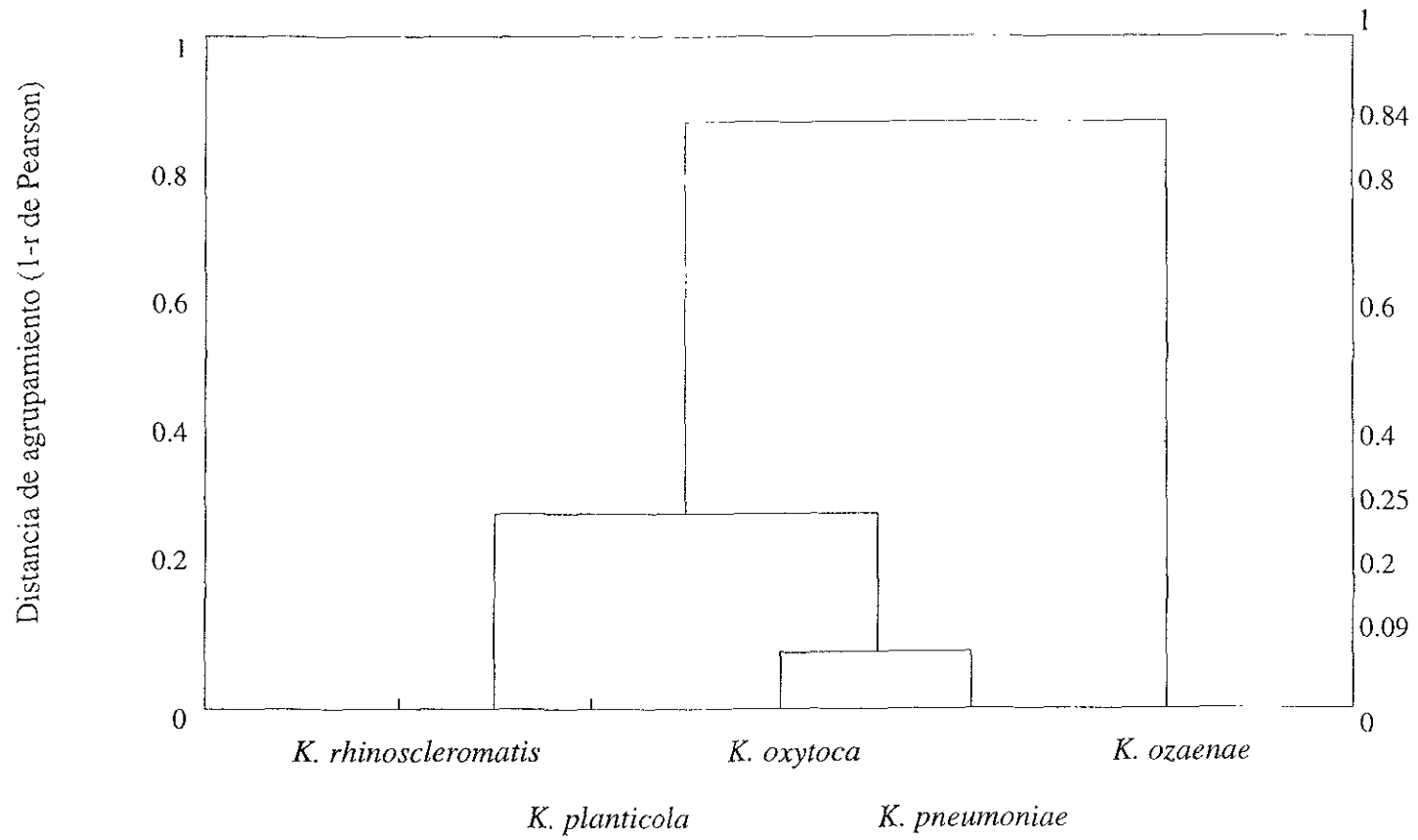


Figura 5. Dendrograma a partir de las áreas de los ácidos grasos comunes de cinco especies tipo de *Klebsiella*. Se presentan las distancias de agrupamiento (1-r de Pearson), a menor distancia mayor similitud entre las especies.

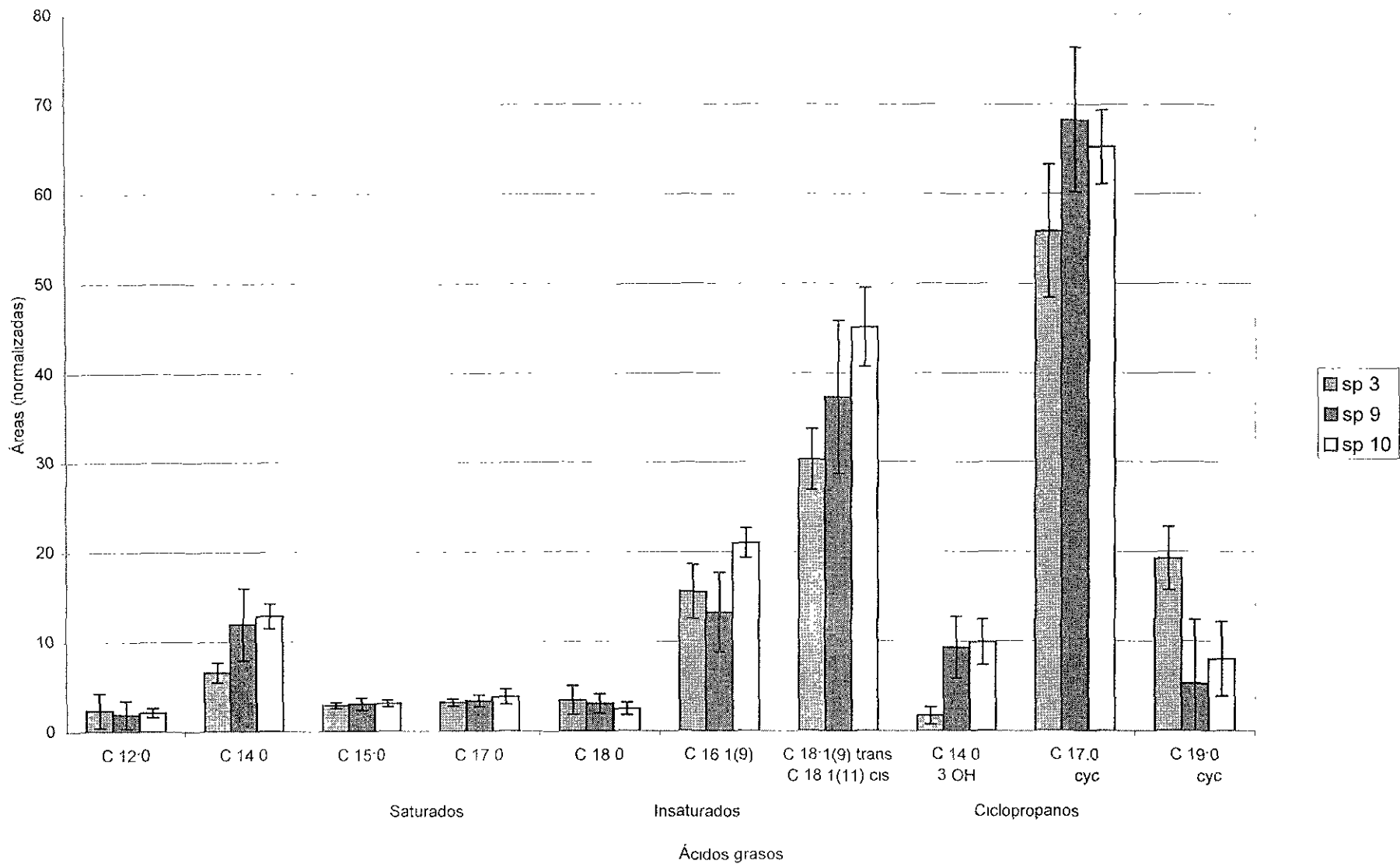


Figura 6. Perfiles cromatográficos de *K. oxytoca*, tipificada (3), clínica (9) y ambiental (10). En esta gráfica se observa el patrón que presentó cada una así como su desviación estándar.

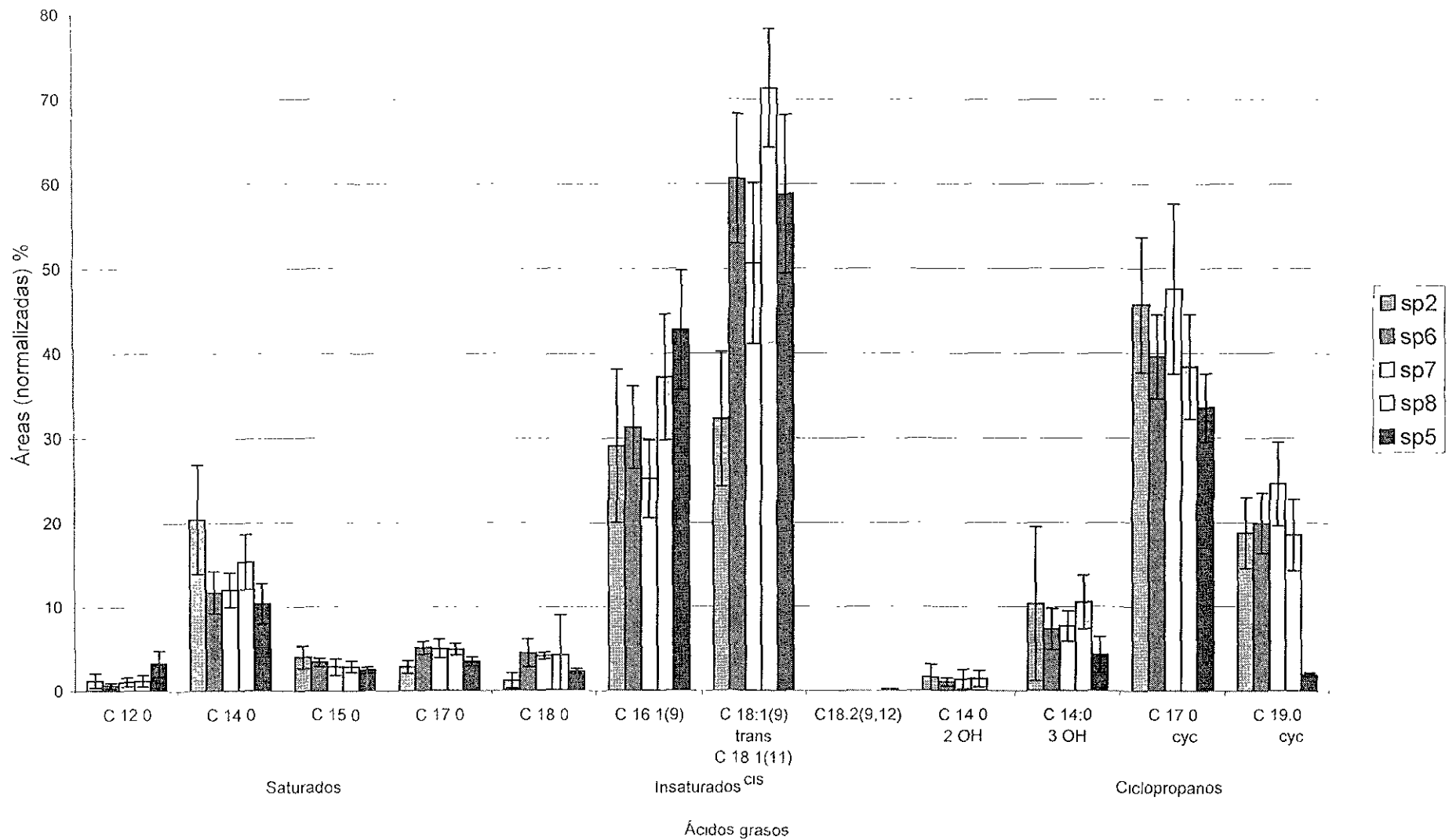


Figura 7. Perfiles cromatográficos de *K. pneumoniae* tipo (2), ambientales (6,7 y 8) y *K. rhinoscleromatis* tipo (5). En la gráfica se observa el patrón que presentó cada una y su desviación estándar

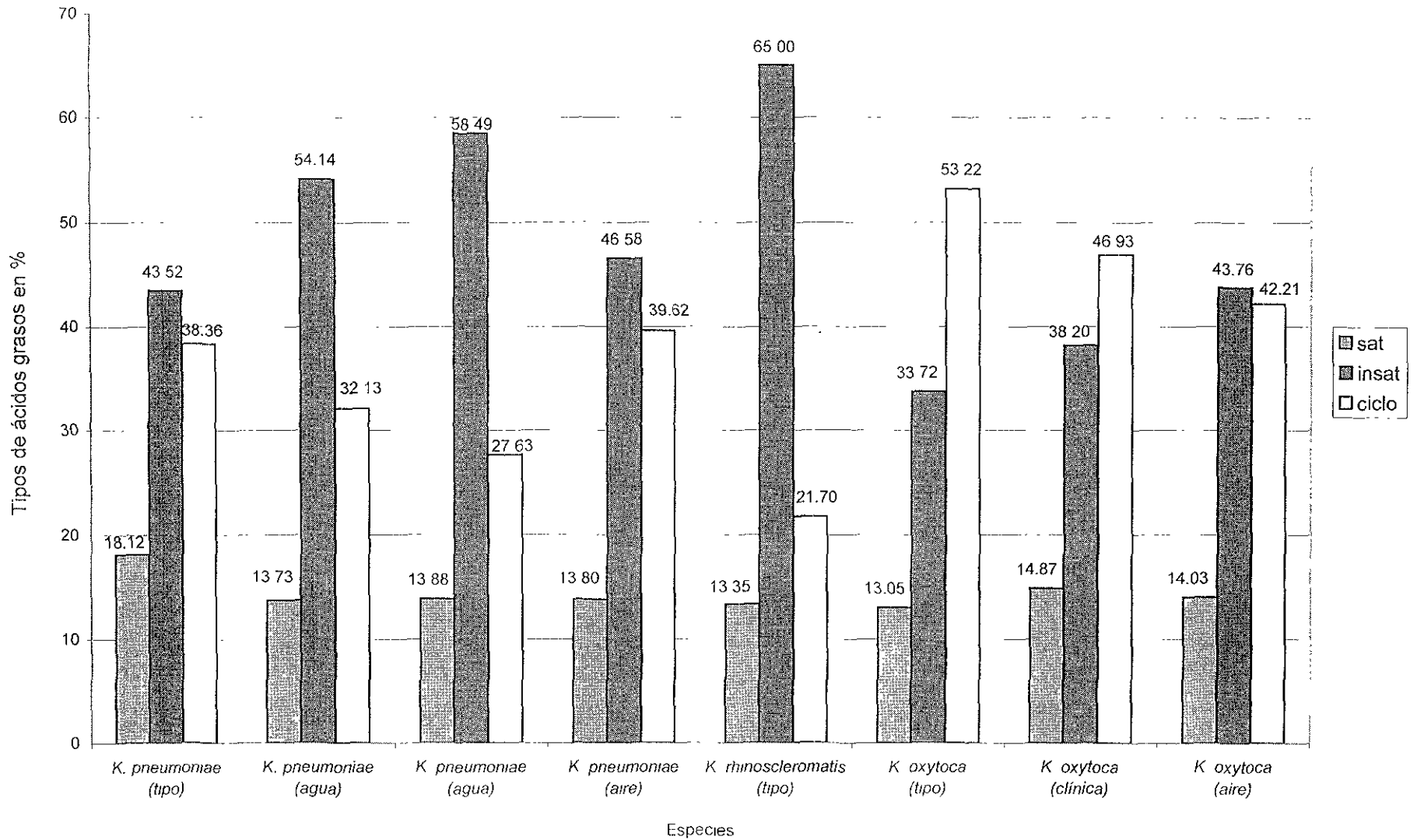


Figura 8 Distribución de los grupos de ácidos grasos (% relativo) en especies tipo y aislamientos ambientales de las diferentes *Klebsiellas* analizadas

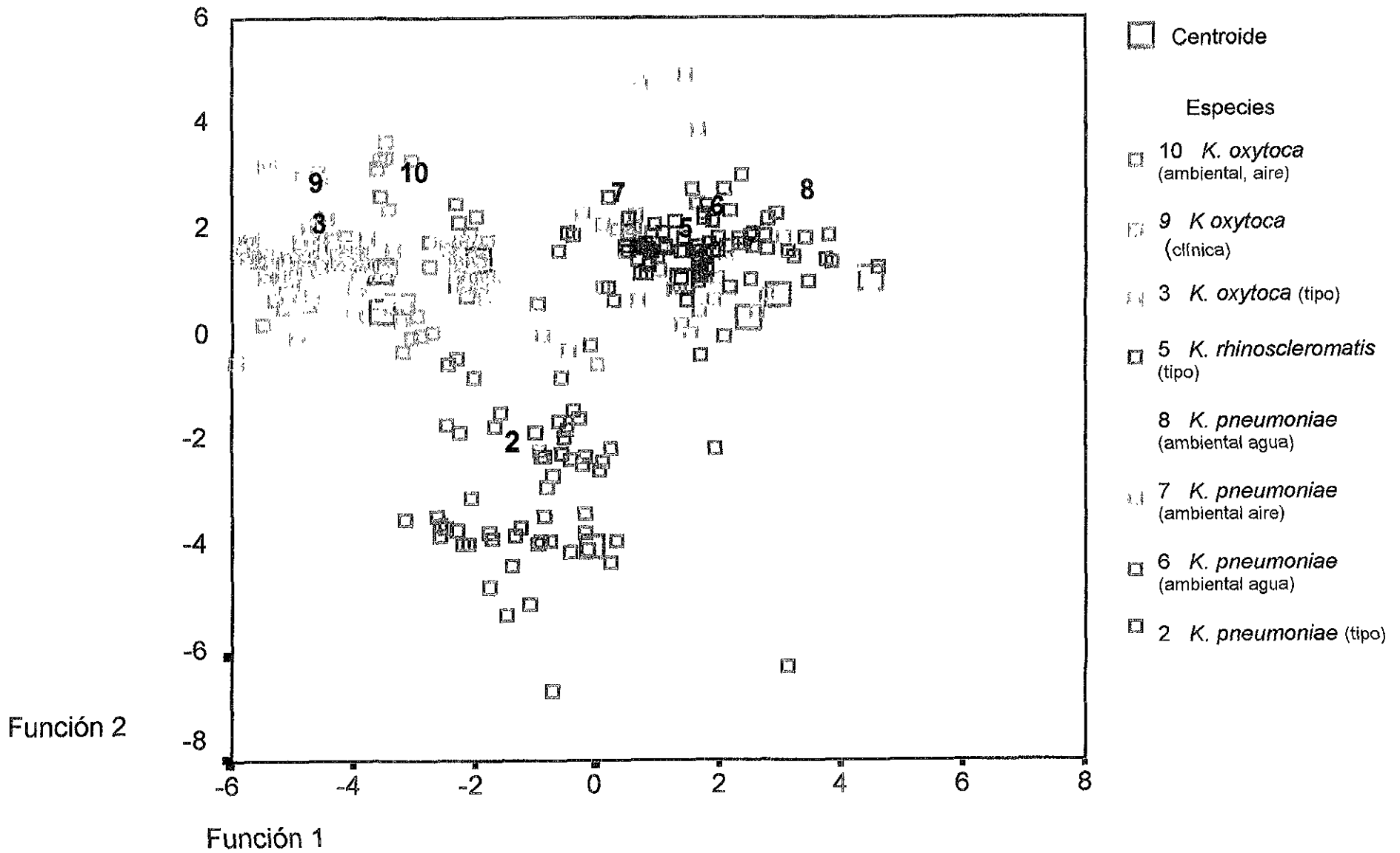
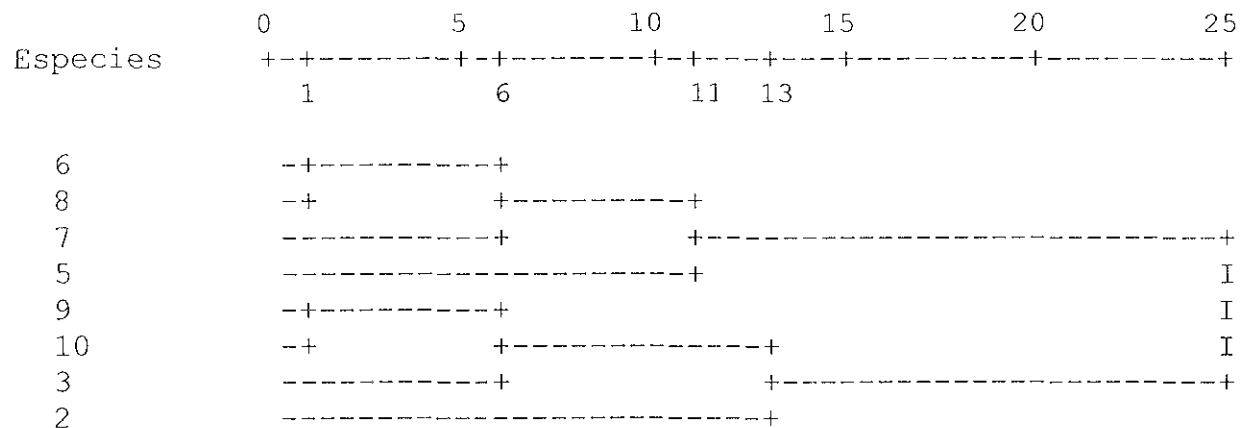
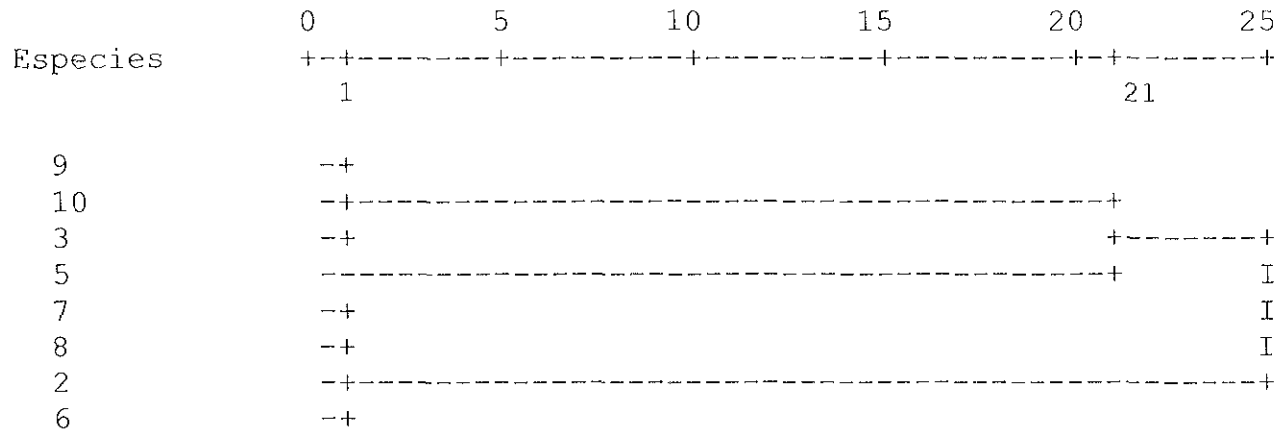


Figura 9. Diagrama de dispersión en donde se presentan los ejes de las funciones discriminantes 1 y 2 para las diferentes especies de *Klebsiella*



- | | | | |
|---|--|----|---|
| 2 | <i>K. pneumoniae</i> (tipo) | 5 | <i>K. rhinoscleromatis</i> (tipo) |
| 6 | <i>K. pneumoniae</i> (aislamiento de agua) | 3 | <i>K. oxytoca</i> (tipo) |
| 7 | <i>K. pneumoniae</i> (aislamiento de aire) | 9 | <i>K. oxytoca</i> (aislamiento clínico) |
| 8 | <i>K. pneumoniae</i> (aislamiento de agua) | 10 | <i>K. oxytoca</i> (aislamiento ambiental) |

Figura 10. Dendrograma (utilizando el coeficiente de correlación de Pearson) con base en las áreas de 9 ácidos grasos comunes de las ocho especies estudiadas. Se observan los valores de la distancia entre especies, los valores más cercanos a cero indican mayor correlación entre especies.



- | | | | |
|---|--|----|---|
| 2 | <i>K. pneumoniae</i> (tipo) | 5 | <i>K. rhinoscleromatis</i> (tipo) |
| 6 | <i>K. pneumoniae</i> (aislamiento de agua) | 3 | <i>K. oxytoca</i> (tipo) |
| 7 | <i>K. pneumoniae</i> (aislamiento de aire) | 9 | <i>K. oxytoca</i> (aislamiento clínico) |
| 8 | <i>K. pneumoniae</i> (aislamiento de agua) | 10 | <i>K. oxytoca</i> (aislamiento ambiental) |

Figura 11. Dendrograma de ausencia-presencia de todos los ácidos grasos que se determinaron en las ocho especies, con base en el índice de Jaccard. Los valores de discordancia muestran la correlación que existe entre los grupos que aparecen en este gráfico.

4. Discusión

Se ha podido observar que microorganismos del género *Klebsiella* spp., al parecer tienen dos hábitats comunes. Uno en el ambiente, en donde se ha encontrado en diferentes tipos de agua (superficiales o de desecho), suelos y plantas, y el otro los epitelios de hospederos como el hombre y/o animales. El género *Klebsiella* por sus características es más parecido a *Enterobacter* y *Citrobacter* que a *Shigella* o *E. coli*, bacterias que están mejor adaptadas a humanos. Desde un punto de vista epidemiológico, se sabe que el género *Klebsiella* es un patógeno oportunista causante de infecciones intrahospitalarias (Severn, 1996, Kil, 1997, Yuk-Fong, 1998). La identificación del microorganismo no es complicada, sin embargo, establecer el sitio del cual se diseminó la bacteria se dificulta dado que es común encontrarla en cualquier ambiente. Por lo anterior ha surgido el interés de conocer el origen clonal de bacterias causantes de brotes epidémicos como es el caso de las diferentes especies del género *Klebsiella* y el de bacterias de otros géneros (Podschn y Ullman, 1998; Decré *et al.*, 1998; McDonough, 1999).

Los sistemas de identificación habituales, como los relacionados con el metabolismo, la tipificación, serología, la fagotipia, producción de bacteriocinas y más recientemente los métodos moleculares, de manera individual no son lo suficientemente discriminatorias y reproducibles cuando se pretenden realizar estudios epidemiológicos. Por tal motivo cada vez se proponen y desarrollan procedimientos que den mejores resultados. El perfil de ácidos grasos de bacterias es un procedimiento que permite realizar análisis cuantitativos que no sean susceptibles a interpretaciones subjetivas, por lo que permiten establecer de una manera más eficiente la clonalidad de los microorganismos. En los últimos años se ha propuesto el empleo del análisis de los ésteres metílicos de los ácidos grasos para la identificación de microorganismos y como herramienta en la epidemiología de enfermedades de plantas y animales (Basile *et al.*, 1995; Steele, 1997; McDonough,

1999). La reproducibilidad, la poca complejidad y el bajo costo son algunas de las características que hacen atractiva a esta técnica.

La distribución discontinua de varias clases de lípidos en las bacterias constituyen una abundante fuente de datos. Las paredes de las bacterias Gram negativas son especialmente ricas en lipoproteínas, lipopolisacáridos, así como lípidos polares y no polares que se localizan en el plasma y membrana externa (Goodfellow y Minnikin, 1985).

Los ácidos grasos juegan un papel importante en determinar las propiedades fisicoquímicas de los lípidos de la célula y de la membrana, es así que los microorganismos poseen perfiles específicos de ácidos grasos por especie. Esta composición es diferente entre especies expuestas, por ejemplo, a cambios de temperatura lo que nos describe una adaptación a las condiciones ambientales a las que están expuestas. Por otro lado, los lípidos microbianos son indicadores de la biomasa microbiana, de la estructura de la comunidad y del estatus metabólico; esto se ha hecho mediante el análisis de los fosfolípidos, los cuales son los componentes estructurales de todas las membranas biológicas. Con base en lo anterior es que se ha considerado que el análisis de los ácidos grasos puede ayudar de manera importante a realizar la caracterización de bacterias (Annous, 1999; Noble *et al.*, 2000).

Las técnicas cromatográficas, son particularmente sensibles y confiables, con éstas es posible obtener perfiles de constituyentes celulares provenientes de pequeñas cantidades de material celular. Este tipo de aproximación directa para analizar marcadores bacterianos, pone a nuestro alcance un potente y útil método no solo para estudios básicos de sistemática bacteriana sino también en el trabajo práctico como es la caracterización microbiana.

La correlación entre la composición lipídica bacteriana y la clasificación taxonómica se ha utilizado ampliamente para la identificación de bacterias. La clasificación bacteriana basada en perfiles lipídicos se ha podido comparar sin problemas con la clasificación basada en la homología de ácidos nucleicos (Jantzen y Bryn, 1985; Basile, 1995).

Existen estudios relacionados con el perfil cromatográfico de ácidos grasos de diferentes bacterias incluido el género *Klebsiella*, sin embargo, éstas han sido utilizadas para establecer diferencias entre géneros (Robles *et al.*, 1994; Robles *et al.*, 1999), pero no los perfiles de las especies de un solo género, ni los cambios que se pueden presentar en el contenido de ácidos grasos dependiendo del origen de aislamiento de la bacteria.

En este estudio se evaluó el perfil cromatográfico de ácidos grasos de diferentes especies tipo del género *Klebsiella*, asimismo se analizaron los posibles cambios de dichos perfiles en especies aisladas del ambiente y de origen clínico.

Los resultados obtenidos mostraron que los ácidos grasos en el género *Klebsiella* incluyen los saturados, insaturados y ciclopropanos que son los que comúnmente se presentan en los diferentes géneros bacterianos (Welch, 1991). Al evaluar qué tan confiable era el método para la caracterización de bacterias, se encontró que se requieren realizar un mínimo de 30 repeticiones para obtener el perfil cromatográfico definitivo de cada especie. Este tipo de análisis no se menciona frecuentemente, y es necesario para establecer la eficacia del procedimiento. Es importante mencionar que el procedimiento se ha estandarizado considerando nutrimentos, temperatura y tiempos de incubación así como ciertas variables cromatográficas citadas en estudios anteriores realizadas por otros laboratorios, de esta manera los resultados se pueden comparar y así tener parámetros que permitan evaluar la eficiencia (Moore, 1994; Smith & Siegel, 1996; McNabb, 1997).

Los ácidos grasos saturados, son parte de los lípidos de la membrana y de importancia como metabolitos intermediarios en la síntesis, de otros ácidos grasos. La mayoría de las bacterias sintetizan ácidos grasos con cadenas de 10 a 19 átomos de carbono, de los cuales los de mayor prevalencia son los de 16 o 18 átomos de carbono. El ácido graso saturado con 16 átomos de carbono está altamente conservado en los procariontes (O'Leary, 1989). En este estudio este dato fue corroborado ya que cuando se analizó el área bajo la curva del perfil cromatográfico la mayor área la presentó el ácido graso de 16 carbonos. Utilizando este dato se normalizaron los resultados obtenidos con los otros ácidos grasos. El resultado obtenido fue consistente con lo reportado en la

literatura referente a que las enterobacterias presentan una mayor proporción de Palmítico, C16:0 (Jantzen y Bryn, 1985, Häusler y Ritcher, 1987, Urdaci, 1990).

Los ácidos grasos insaturados fueron los más abundantes en las diferentes especies de *Klebsiella* estudiadas, por lo que podrían considerarse como marcadores para este género. Utilizando diferentes métodos estadísticos (análisis discriminante, análisis de correlación de Pearson e índice de Jaccard) se analizó la proporción de ácidos grasos insaturados de cada especie y se obtuvo un patrón de agrupamiento en el que *K. ozaenae*, con un porcentaje de 76.3, se encuentra a una distancia relativamente grande que las separa de las otras especies como se observa en el diagrama de dispersión. Por lo tanto consideramos que el procedimiento cromatográfico del análisis de ácidos grasos insaturados permite ubicar y definir a las especies de *Klebsiella*.

Los ácidos grasos insaturados se dividen en monoenoicos, dienoicos e hidroxiácidos, los primeros son de importancia para la bacteria pues la introducción de una doble ligadura en la cadena es una forma de ajustar la fluidez de la membrana. En las especies tipo estudiadas, los porcentajes que presentaron cada una de ellas pueden utilizarse como un criterio más de discriminación entre las especies. Con relación a los ácidos grasos dienoicos C18:2^{9,12}, su presencia permitió diferenciar *K. ozaenae* de *K. pneumoniae* y *K. rhinoscleromatis* de *K. planticola*. Este resultado permite confirmar la utilidad del perfil cromatográfico de ácidos grasos en la diferenciación de especies de *Klebsiella*. Los ácidos grasos dienóicos aunque se presentan en niveles traza son un excelente biomarcador ya que la mayoría de las bacterias no sintetizan ácidos grasos poliinsaturados debido a la pérdida de la enzima desaturasa; se ha visto claramente que una entrada de ácidos grasos puede reprimir la síntesis de esta enzima en la misma forma que ella reprime *de novo* la síntesis de ácidos grasos (Ratledge, 1996). Los métodos convencionales para identificar *K. planticola* y *K. terrigena*, generalmente fallan, por lo que se recurre a pruebas de asimilación de carbono y pruebas convencionales (Monnet, 1994). En nuestro estudio se pudo establecer la identidad de especies de *Klebsiella* por el método cromatográfico, este es un hecho de gran relevancia ya que propone el uso de

dicho procedimiento para la identificación precisa de microorganismos con un método de menor riesgo y costo.

Los ácidos grasos hidroxilados 3OH son constituyentes del lipopolisacárido (endotoxina) de las bacterias Gram negativas (Goodwin, 1989). Los ácidos 3OH de C11 a C21, se han identificado en *E. coli* y especies de *Salmonella*, *Klebsiella*, *Yersinia*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Xantomonas* y *Rhizobium*. La biosíntesis de los hidroxiácidos 2- y 3- pueden diferir, pues mientras el 2OH es un intermediario de la α oxidación de los ácidos grasos, el 3OH proviene de la ruta ordinaria de elongación para biosíntesis de ácidos grasos. En general los ácidos grasos 3OH, que es el tipo más abundante y parte del lípido A al formar parte de su estructura, muestran cierta similitud entre especies, lo cual se refleja en el análisis celular (Lechevalier, 1977; Jantzen, 1985; Welch, 1991 y Colin Ratledge, 1996).

En este trabajo se encontró que las especies tipo estudiadas, *K. oxytoca* presentaron el menor valor en el 3OH, seguida por *K. rhinoscleromatis* y *K. planticola* con valores muy similares entre sí. Tanto *K. ozaenae* como *K. pneumoniae* presentaron los hidroxiácidos 2OH y 3OH. Sin embargo, también se pudo observar que *K. pneumoniae* presenta un mayor porcentaje (14%) del 3OH que el resto de las especies. Se podría considerar que la presencia de este hidroxiácido le confiere una característica particular, que al estar relacionada con el lípido A, pudiera establecer el carácter patogénico de la especie.

Los ciclopropanos son muy comunes en los lípidos bacterianos, encontrándose en cantidades abundantes tanto en bacterias Gram positivas como en Gram negativas, estos se forman por la adición de un metilo a un ácido graso monoinsaturado preexistente (Cronan *et al.*, 1987). El ejemplo mas ampliamente distribuido es el ácido lactobacílico (C19:0 Δ), aislado de *Lactobacillus* spp., pero reconocido ahora en organismos como *E. coli*, la mayoría de las *Pseudomonas* spp. y algunos *Rhizobium* y *Clostridium* spp. Los ácidos C19:0 Δ y C17:0 Δ pueden considerarse como indicativos de un lípido bacteriano único debido a que no se presentan en organismos eucariontes (Ratledge, 1996). La marcada

inhibición de la síntesis de un ácido graso ciclopropano, la cual acompaña la inducción de formas filamentosas de *E. coli*, es indicio de que los ácidos grasos ciclopropanos juegan un importante papel estructural en la envoltura celular de las bacterias Gram negativas (Moat G. A. & Foster W. J, 1988).

En este estudio, los ácidos grasos ciclopropanos presentaron valores particulares en cada una de las especies estudiadas, lo que propone su empleo como indicadores para la discriminación entre éstas. En los casos particulares de *K. planticola* y *K. rhinoscleromatis* los ciclopropanos presentaron valores de 21 y 22%, que son prácticamente iguales, de tal forma que sólo han de tomarse en cuenta dentro del grupo de ácidos que constituyen el perfil cromatográfico de cada una de ellas, *K. pneumoniae* (38%) y *K. oxytoca* (53%) mostraron los valores más altos de ciclopropanos, lo que podría considerarse para ser utilizada en la discriminación entre estas especies de *Klebsiella*.

Con respecto al análisis que se realizaron de los aislamientos ambientales y que fue comparado con las especies tipo mostraron perfiles similares; esto confirma por un lado que los ácidos grasos saturados y los ciclopropanos son un buen marcador para la identificación del género.

En las especies de *Klebsiella* aisladas del ambiente y clínica, la presencia de ácidos grasos insaturados C16:1⁹ y C18:1⁹trans es consistente con lo reportado en la literatura presentándose perfiles de ácidos grasos típicos de bacterias Gram negativas (Jantzen y Lassen, 1980). En este estudio los porcentajes son altos y constantes en *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*, que los define como marcadores para ambas especies. La conversión de ácidos grasos insaturados, de los isómeros cis a trans, podría ser una estrategia de la bacteria para reducir la fluidez de la membrana y con esto presentar una mayor tolerancia frente a los compuestos tóxicos presentes en el ambiente (Heipieper, 1992, Tsitko, 1999).

En lo referente a los hidroxiácidos, la especie tipo y las especies ambientales de *K. pneumoniae* mostraron los hidroxiácidos C14:0 2OH y C14:0 3OH. Tanto su presencia como el alto porcentaje en el que se encuentran hacen de este par de ácidos grasos marcadores exclusivos para esta especie. Utilizando pruebas bioquímicas tradicionales para

En la identificación de *Klebsiella*, encontramos que todos los aislamientos ambientales se comportaron como *K. pneumoniae*, sin embargo, al hacer el análisis de estas bacterias ambientales por el método cromatográfico y aplicar el análisis discriminante, se encontró que estas formaban un grupo con la especie tipo de *K. rhinoscleromatis*. Este hecho concuerda con lo reportado por Bergey, quién menciona que *K. pneumoniae*, tiene tres subespecies, *K. pneumoniae*, *K. ozaenae* y *K. rhinoscleromatis*.

El método cromatográfico por lo tanto resulta un auxiliar importante para caracterizar microorganismos y conocer su relación clonal (Kelly, 1996).

En el caso de *K. oxytoca*, que solo presenta el C14:0 3OH, el porcentaje mas alto del mismo se observó en la especie clínica, seguida por la ambiental del agua y finalmente la tipo. Lo anterior permite considerar la posibilidad de utilizar este ácido graso y su porcentaje como un biomarcador para determinar el hábitat de origen de cada especie.

Con base en lo anteriormente descrito y observando los valores encontrados, de la presencia-ausencia de ácidos grasos en las especies de *Klebsiella* aisladas de la clínica y el ambiente, se puede considerar que el análisis cromatográfico de ácidos grasos es útil para caracterizar y establecer el origen de las especies.

El haber observado que las especies de *Klebsiella pneumoniae* aisladas del ambiente (6 y 8 agua y 7 aire), se agruparon con *K. rhinoscleromatis* tipo, nos confirma que mediante este procedimiento se pueden determinar grupos cromatográficos o subespecies de aislamientos de diferente hábitat. También habría que considerar la posibilidad, mediante este método, de determinar la clonalidad de las especies y/o subespecies estudiadas lo cual resultaría particularmente útil en estudios epidemiológicos de la bacteria considerando por ejemplo que la distribución del serogrupo O es virtualmente igual entre aislamientos de infecciones invasivas, no invasivas o colonizaciones (Trautman *et al.*, 1997).

Los resultados obtenidos son interesantes en virtud de que el procedimiento está estandarizado y con el análisis de resultados bien fundamentado se podría iniciar un estudio más amplio con aislamientos de diferentes especies y de diferente origen para evaluar si es factible utilizar este sistema en estudios de brotes intrahospitalarios.

5. Conclusiones

El análisis de los ácidos grasos bacterianos permite identificar comunidades bacterianas y su posible procedencia, ya que cada especie presenta un perfil característico que corresponde a una huella digital y sus variaciones en sitios específicos son adaptables a ambientes particulares.

La determinación de perfiles de ácidos grasos permite caracterizar especies de *Klebsiella* procedentes de diferentes hábitats.

La variación de las comunidades bacterianas podría verse reflejada en la composición de sus ácidos grasos y detectarse por el método de cromatografía de gases.

El análisis de ácidos grasos resulta de gran utilidad en la caracterización microbiológica, en la biotecnología aplicada y en estudios de contaminación ambiental.

Los patrones de ácidos grasos se presentan como una huella digital, sin embargo es necesario contar con un criterio basado en la estandarización de la técnica y análisis de resultados para analizar los perfiles, ya sean de especies tipo o de aisladas del ambiente. El criterio sería el de aplicarles un análisis discriminante y/o un análisis de conglomerados.

Se propone el uso del análisis discriminante como una herramienta estandarizada para el manejo de resultados provenientes de la determinación de ácidos grasos celulares por cromatografía gas-líquido, para definir los perfiles patrón de las especies del género *Klebsiella*.

El mapa que se obtiene con el análisis discriminante, del género *Klebsiella*, resulta de gran utilidad para comparar la técnica de cromatografía con algún otro método y con esto corroborar de primera instancia la labor de identificación. Se requiere contar con un banco de datos tanto de cepas tipo como de cepas autóctonas de este modo la identificación podría tornarse práctica y rápida.

Adicionar al presente estudio, el de la especie *K. terrigena* para proponer el patrón de comparación definitivo para el género *Klebsiella*. Además para el patrón de comparación definitivo se considera conveniente agregar especies cercanas para tener un espectro más amplio al momento de hacer la comparación. También sería de importancia incluir a *K. mobilis*, considerando la propuesta que existe desde hace varios años para que se anexe al género *Klebsiella*.

Con base en lo anterior se resalta la importancia taxonómica de los ácidos grasos insaturados e hidroxiácidos en la identificación de bacterias Gram negativas utilizando cromatografía de gases.

Considerar la propuesta de varios investigadores de agrupar al género *Klebsiella* por el análisis químico de sus ácidos grasos, (como grupos cromatográficos) para contribuir a la clasificación del género y facilitar la identificación de estos microorganismos provenientes de diferentes ambientes.

Las relaciones taxonómicas de los miembros de la familia Enterobacteriaceae aún siguen validándose, razón por la cual resulta particularmente interesante hacer el análisis de sus ácidos grasos y compararlo con la caracterización fenotípica.

Los ácidos grasos saturados e insaturados con menos de 10 o 12 átomos de carbono son generalmente intermediarios metabólicos en la degradación o biosíntesis de ácidos grasos de cadena larga. Los ácidos grasos ciclopropanos indican la presencia de un ácido graso bacteriano único ya que no se presentan en microorganismos eucariontes, además este tipo de ácidos presentan una estructura que se relaciona con la protección de los ácidos grasos a la oxidación u otro tipo de degradación química.

Bibliografia

- Abel, K., H de Schmertzing & Peterson, J. I. 1963. Classification of microorganisms by analysis of chemical composition. I. Feasibility of utilizing gas chromatography. *J Bacteriol* **85**:1039-1044.
- Aho, P. E., Scidler, R. J., Evans, H. J. & Rajh, P.N. 1974. Distribution, enumeration and identification of nitrogen-fixing bacteria associated with decay in living trees. *Phytopathol* **64**:1413-1420.
- Alvin, C., Larsson L., Magnusson., M., per Mardh 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*. *J Gen Microbiol* **129**:401-405.
- Ahmad, S., Weisburg, G. W. & Jensen, R. A. 1990. Evolution of aromatic amino acid biosynthesis and applications to the fine-tuned phylogenetic positioning of enteric bacteria. *J Bacteriol* **172**:1051-1061.
- American Type Culture Collection (ATCC). 1992. Catalogue of strains. Rockville, Md, USA.
- Amstein, C.F. & Hartman, P. A. 1973. Differentiation of some enterococci by gas chromatography. *J Bacteriol* **113**:38-41.
- Annous, B. A., Kozempel, M. and Kurantz, M. J. 1999. Changes in membrane fatty acid composition of *Pediococcus* sp. Strain NRRL B-2354 in response to growth conditions and its effect on thermal resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:2857-2862.
- Bagley, S. T. & Seidler, R. J. 1977. Significance of fecal coliform positive *Klebsiella*. *Appl and Environ Microbiol* **33**:1141-1148.
- Barr, J. G. 1977. *Klebsiella*: Taxonomy, nomenclature and communication. *J Clin Path* **30**:943-944.
- Bascomb, S., Lapage, S. .P, Willcox, W. R. & Curtis, M. A. 1971. Numerical classification of the tribe Klebsielleae. *J Gen Microbiol* **66**:279-295.
- Basile, F., Voorhees, K. J. & Hadfield, T. L. 1995. microorganism gram-type differentiation based on pyrolysis-mass spectrometry of bacterial fatty acid methyl ester extracts. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:1534-1539
- Beckwith, T. D. 1931. The bacteriology of pulp slime. *J Bacteriol* **22**:15-22.
- Bergan T. P., Grimont, A. D. & Grimont, F. 1983. Fatty acids of *Serratia* determined by gas chromatography. *Current Microbiol* **8**:7-11.
- Bergey's manual of systematic bacteriology. 1984. vol I Baltimore: Williams & Wilkins.
- Bøe, B., & Gjerde, J. 1980. Fatty acid patterns in the classification of some representative of the Families Enterobacteriaceae and Vibrionaceae. *J Gen Microbiol* **116**:41-49.

- Böttger, E.C., 1996. Approaches for identification of microorganisms. ASM News **62**:No. 5 247-250.
- Bousfield, I. J., Smith, G. L., Dando, T. R. & Hobbs, G. 1983. Numerical analysis of total fatty acid profiles in the identification of coryneform, nocardioform, and some other bacteria. J Gen Microbiol **129**:375-394.
- Breed, R. S. 1957. *Klebsiella* pp. 344-346. In: Bergey's manual of determinative bacteriology. 7th ed. Breed, R. S., Murray, E.G.D., Smith, N.R. (eds). Baltimore: Williams & Wilkins.
- Brenner, D. J., Steigerwalt, A. G. & Fanning, G. R. 1973. Differentiation of *Enterobacter aerogenes* from *Klebsiella* by deoxyribonucleic acid reassociation. Int J Syst Bacteriol **22**:193-200.
- Brian, B. L. & Gardner, E. W. 1967. Preparation of bacterial fatty acid methyl esters for rapid characterization by gas liquid chromatography. Appl Microbiol **15**:1499-1500.
- Brian, B. L. & Gardner, E. W. 1968. Fatty acids from *Vibrio cholerae* lipids. J Infect Dis **118**:47-53.
- Brown, C. & Seidler, R. J. 1973. Potential pathogens in the environment *Klebsiella pneumoniae*, a taxonomic and ecological enigma. Appl Microbiol **25**:900-904.
- Campbell, L. M. & Roth, I. V. 1975. Published inconsistencies in methyl red and Voges-Proskauer reactions of *Klebsiella pneumoniae*. Int J Syst Bacteriol **25**:386-387.
- Cecchini, G. L. & O'Brien, R. T. 1968. Detection of *Escherichia coli* by gas chromatography. J Bacteriol **95**:1205-1206.
- Cookson, B., Talsania, H., Chinn, S. & Phillips, I. 1989. A qualitative and quantitative study of cellular fatty acids of *Streptococcus milleri* with capillary gas chromatography. J Gen Microbiol **135**:831-838.
- Cowan, S. T., Steel, K. J., Shaw, C. & Duguid, J. P. 1960. A classification of the *Klebsiella* group. J Gen Microbiol **23**:601-612.
- Cronan, J. E., Jr. 1975. Thermal regulation of the membrane lipid composition of *Escherichia coli*. J Biol Chem **250**:7074-7077.
- Decré, D., Gachot, B., Lucet, J.C., Arlet, G., Bergogne-Bérézin, E. and Régnier, Bernard. 1998. Clinical and bacteriologic epidemiology of extended-spectrum β -Lactamase-producing strains of *Klebsiella pneumoniae* in a medical intensive care unit. Clin Infect Dis **27**:834-844.
- Dufour, A. P. & Cabelli, V. J. 1976. Characteristics of *Klebsiella* from textile finishing plant effluents. J Wat Poll Contr Fed **48**:872-879.
- Duguid, J. P. 1959. Fimbriae and adhesive properties of *Klebsiella* strains. J Gen Microbiol **21**:271-286.
- Duncan, D. W. & Razzell, W. E. 1972. *Klebsiella* biotypes among coliforms isolated from forest environments and farm produce. Appl Microbiol **24**:933-938.
- Durlakowa, I., Lachowics, Z. & Slopek, S. 1967. Biochemical properties of *Klebsiella* bacilli. Arch Immun et Therap Experimen **15**:490-496.

- Drucker, D. B. & Owen, I. 1973. Chemotaxonomic fatty acid fingerprints of bacteria growth with and without aeration. *J Canad Microbiol* **19**:247-250.
- Drucker, D. B. 1974. Chemotaxonomic fatty acid fingerprints. *Can J Microbiol* **20**:1723-1728.
- Drucker, D. B. 1981. Analysis of structural components of microorganisms by gas chromatography, p.166-291. In: Microbiol Applic Gas Chromat Drucker, D.B. (ed), Cambridge University Press. Cambridge.
- Edwards, P. R. 1929. Relationships of the encapsulated bacilli with special reference to *Bacterium aerogenes*. *J Bacteriol* **17**:339-353.
- Edwards, P. R. & Ewing, W. H. 1962. Identification of Enterobacteriaceae. 2a. ed. Burgess Publishing Co. Minneapolis, Minn.
- Edwards, P. R. & Ewing, W. H. 1972. Identification of Enterobacteriaceae. 3a. ed. Burgess Publishing Co. Minneapolis, Minn.
- Eickhoff, T. C., Steinhauer, B. W. & Finland, M. 1966. The *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* division. Biochemical and serologic characteristics and susceptibility to antibiotics. *Ann Int Med* **65**:1163-1179.
- Eickhoff, T .C. 1971. Nosocomial infections due to *Klebsiella pneumoniae*: Mechanisms of intra hospital spread, pp. 117-125. In: Brachman, P. S. and Erickhoff, T. C. (eds.) Proceedings of the International Conference on Nosocomial Infection. Chicago: American Hospital Association.
- Eerola, E. & Lehtonen, O. P. 1988. Optimal data processing procedure for automatic bacterial identification by gas-liquid chromatography of cellular fatty acids. *J Clin Microbiol* **9**:1745-1753.
- Evans, H. J. & Burris, R. H. Highlights, en: Biological Nitrogen Fixation during the last 50 years. In: Biological Nitrogen Fixation. Edited by Gary Stacey, Robert H. Burris and Harold J. Evans. 1992.
- Everitt, B & Dun, G. 1991. Applied multivariate data analysis. Ed. Edward Arnold London. A division of Holder & Soughton by the University Press, Cambridge. pp 304
- Flury, B. & Riedwyl, H. 1988. Multivariate Statistics. A practical approach. Ed. Chapman and Hall. London.
- Galbraith, L. & Wilkinson, S. G. 1991. Polar lipids and fatty acids of *Pseudomonas pickettii*, *J. Gen. Microbiol.* **137**:197-202
- Gehrke, C. W. & Goerlitz, D. F. 1963. Quantitative preparation of methyl esters of fatty acids for gas chromatography. *Analyt Chem* **35**:76-80.
- Goodfellow, M. & Minnikin, D. E. 1985. Introduction to chemosystematics. In: Chemical Methods in Bacterial Systematic, p. 1-15. Edited by M. Goodfellow & D. E. Minnikin. London & New York: Academic Press.
- Goodwin, S. C., McConnell, W., McCulloch, R. K., MacCullough, C. Hill, R., Bronsdon, M. A. & Kasper, G. 1989. Cellular fatty acid composition of *Campylobacter pylori* from primates and ferrets compared with those of other *Campylobacter*. *J Clin Microbiol* Vol. **27**: No. 5 p 938-943.

- Häusler, J. & Richter, V. 1983. A process of identification of microorganism using chromatography. UK Patent Application GB 2 121-434 a.
- Häusler, J. & Richter, V. 1985. Identification of bacteria 12th International Symposium of Microbiology. Association and interaction in food. Publishing House of the Hungarian Academy of Sciences. Budapest.
- Häusler, J. 1987. 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.
- Heipieper, H-J, Diefenbach, R. & Keweloh, H.1992. Conversion of *cis* unsaturated fatty acid to *trans*, a possible mechanism for the protection of phenol-degrading *Pseudomonas putida* P8 from substrate toxicity. *Appl Environ Microbiol* **58**:1847-1852.
- Henis, Y., Gould. J. R. & Alexander, M. 1966. Detection and identification of bacteria by gas chromatography. *Appl Microbiol* **14**:513-524.
- Hill, L. R. 1966. An index to deoxyribonucleic acid base composition of bacterial species. *J Gen Microbiol* **44**:419-437.
- Holmes, B., Willcox, W. R. & Lapage, S. P. 1978. Identification of Enterobacteriaceae by the API 20E System. *J Clin Pathol* **31**:22-30.
- Holmes, B., Costas, M., Ganner, M., On, SL. and Stevens, M. 1994. Evaluation of *Biological system for identification of some gram-negative bacteria of clinical importance*. *J Clin Microbiol* **32**:1970-1975.
- Hormacche, E., Edward, P. R. 1960. A proposed genus *Enterobacter*. *Int Bull Bacteriol Nom Tax* **10**:71-74.
- Irina, V. T., Gennadi, M. Z., Anatoli, G. L. & Mirja, S. S. 1999. Effect of aromatic compounds on cellular fatty acids composition of *Rhodococcus opacus*. *Appl Environ Microbiol* **65**:No. 2 853-855
- James, A. T. & Martin, A. J. 1956. Gas-Liquid chromatography: The separation and identification of the methyl esters of saturated and unsaturated acids from formic acid to n-octadecanoic acid. *Biochem J* **63**:144-152.
- Jain, K., Radsak, K. & Mannheim, W. 1974. Differentiation of the *Oxytocum* group from *Klebsiella* by deoxyribonucleic acid hybridization. *Int J Syst Bacteriol* **24**:402-407.
- Jantzen, E., Bergan, K. & Bovre, K. 1974. Gas chromatography of whole cell methanolysates. V. Fatty acids composition of *Neisseria* and *Moraxella*. *Acta Pathol Microbiol Scand* **83**:569-576.
- Jantzen, E. & Lassen, J. 1980. Characterization of *Yersinia* species by analysis of whole-cell fatty acids. *Int J Syst Bacteriol* **30**:421-428.
- Jantzen, E. 1984. Analysis of cellular components in bacterial classification and diagnosis, p. 257-302. In: Gas chromatography mass spectrometry applications in microbiology. G. Odhan, L. Larson and P.A. Mardh (ed). Plenum Publishing Corp., New York.

- Jantzen, E. & Bryn, K. 1985. in: Chemical Methods in Bacterial Systematic, p. Edited by M. Goodfellow & D. E. Minnikin. London & New York: Academic Press.
- Johnson, B. R., Levine, M. 1917. Characteristics of coli-like microorganisms from the soil. *J Bacteriol* **2**:379-401.
- Johnson, L. L., McFarland, L., Dearing, P., Raisys, V. & Shoenknecht, F. D. 1989. Identification of *Clostridium difficile* in stool specimens by culture-enhanced gas-liquid Chromatography. *J Clin Microbiol* **27**:2218-2221.
- Kaneda, T. 1962. Biosynthesis of branched chain fatty acids: Isolation and Identification of fatty acids from *Bacillus subtilis* ATCC 7059. *J Biol Chem* **238**:1222-1228.
- Kaneda, T. 1971. Factors affecting the relative ratio of fatty acids in *Bacillus cereus*. *Can J Microbiol* **17**:269-275.
- Kauffmann, P. 1949. On the serology of the *Klebsiella* group *Acta Pathol Microbiol Scand* **26**:381-406.
- Kelly, R. F. & Whitefield. C. 1996. Clonal diverse *rfb* gene clusters are involved in expression of a family of related D-galactana O antigens in *Klebsiella* species. *J of Bacteriol* **178**:5205-5214.
- Kazda, J., Müller, H. J., Stackebrandt, E., Daffe, M., Müller, K. & Pitulle, C. 1992. *Mycobacterium madagascariense* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **42**:524-528.
- Kil, K. S., Darouiche, R.O., Hull, R.A., Mansouri M.D. & Musher, D.M. 1997. Identification of a *Klebsiella pneumoniae* strain associated with nosocomial urinary tract infection. *J Clin Microbiol* **35**:2370-2374.
- Knittel, M. D., Seidler, R. J., Eby, C. & Cabe, L. M. 1977. Colonization of the botanical environmental by *Klebsiella* isolates of pathogenic origin. *Appl Environ Microbiol* **34**:557-563.
- Lambert, M. A. & Moss, C. W. 1983. Composition of the effects of acid and base hydrolysis on hydroxy and cyclopropane fatty acids in bacteria. *J Clin Microbiol* **18**:1370-1377.
- Lambert A. Mary, F. W. Hickman-Brenner, J. J. Farmer III & C. Wayne Moss. 1983. Differentiation of *Vibrionaceae* species by their cellular fatty acid composition. *J Syst Bacteriol* Vol. **33** N° 4 777-792.
- Lechevalier, M. P. 1982. Lipids in bacterial taxonomy. P.460-509. en: CRC Handbook of microbiology. I. Laskin & H. A. Lechevalier (ed)., 2nd ed., Vol. 4. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla. USA.
- Lechevalier, M. P. 1989. Lipids in bacterial taxonomy. P. 455-547. en: Practical Handbook of Microbiology. Edited by William M. O'Leary. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla. USA.
- Mahl, M. C., Wilson, P. W., Fife, M. A. & Ewing, W. H. 1965. Nitrogen fixation by members of the tribe *Klebsiella*. *J Bacteriol* **89**:1482-1487.
- Matsen, J. M., Spindler, J. A. & Blosser, R. O. 1974. Characterization of *Klebsiella* isolates from natural receiving waters and comparison with human isolates. *Appl Microbiol* **28**:672-678.

- Matsuyama, T., Kaneda, K., Ishizuka, I., Toida, T. & Yano, I. 1990. Surface active novel glycolipid and Linked 3-hydroxy fatty acids produced by *Serratia rubidaea* J Bacteriol **172**:3015-3022.
- Mayberry, W. R. 1981. Dihydroxy and Monohydroxy Fatty Acids in *Legionella pneumoniae*. J. Bacteriol Vol. **147** N° **2**:373-381.
- McDonough, P. L., Fogelman, D., Shin, S. J., Brunner, M. A. and Lein D. H. 1999. *Salmonella enterica* serotype Dublin infection: an emerging infectious disease for the Northeastern United States. J Clin Microbiol **37**:2418-2427.
- McNabb, A *et al.*, 1997. Fatty acids characterization of rapidly growing pathogenic aerobic actinomycetes as a means of identification. J. Clin. Microbiol. **35**:1361-1368.
- Moat A. G. & Foster J. W. 1988. Microbial physiology. 2nd ed. pp 52-249. Wiley-Interscience Publication. John Wiley & Sons, USA.
- Moore, L. V., Bourne D. M. & Moore W. E. 1994. Comparative distribution and taxonomic value of cellular fatty acids in thirty-three genera of anaerobic gram-negative bacilli. **44**:338-347.
- Moss, C. W., Wallace, P. L., Hollis, D. G. & Weaver, R. E. 1988. Cultural and chemical characterization of CDC groups EO-2, M-5, AND M-6, *Moraxella* species, *Oligella urethralis*, *Acinetobacter* species, and *Psychrobacter immobilis*. J Clin Microbiol **26**:484-492.
- Monnet D. & Freney J. 1994. Method for differentiating *Klebsiella planticola* and *Klebsiella terrigena* from other *Klebsiella* species. J. Clin. Microbiol. **32**:1121-1122.
- Monteoliva-Sánchez, M. 1988. Cellular fatty acid composition of *Deleya halophila*: effect of growth temperature and salt concentration. J Gen Microbiol **134**:199-203.
- Noble, P. A., Almeida, J. S. & Lovell, C. R. 2000. Application of Neural Computing Methods for Interpreting Phospholipid Fatty Acid Profiles of Natural Microbial Communities. Appl Environ Microbiol **66**:694-699.
- Núñez, W. J. & Colmer, A. R. 1968. Differentiation of *Aerobacter* and *Klebsiella* isolated from sugar cane. Appl Microbiol **16**:1875-1890.
- Okuyama, H., Sasaki, S., Higashi, S & Murata, N. 1990. A transunsaturated fatty acid a psychrophilic bacterium. *Vibrio* sp. strain ABE-1. J Bacteriol **172**:3515-3518.
- O'Leary, W. M. (ed.) 1989. Practical handbook of Microbiology. 3rd ed. pp. 77-547. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
- Ørskov, I. 1974. *Klebsiella* pp.321-324. In: Buchanan, R. E. Gibson, N. E. (eds). Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th ed. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Podschun, R. & Ullmann, U. 1998. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. Clin Microbiol. Rev. **11**:589-603.

- Raetz, C. R. H. 1996. Bacterial Lipopolysaccharides: a Remarkable family of bioactive macroamphiphiles en: *Escherichia coli* and *Salmonella*. ASM Press. Washington, DC. pp 1035-1063.
- Ratledge, C. 1996. Lipids microbial en: Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medicine. Vol. 3 Ed. Robert A. Meyers. pp 403-471.
- Rasoamanjara, D., Peladan, F., Turlot, C. J., Monteil, H. and Richard, C. 1986. Characterization of *Flavobacterium* species by analysis of volatile fatty acids production. J Gen Microbiol **132**:2723-2732.
- Robles V. E., A. ME. González, M. Ma. G. Sáinz G., P. Ramírez, R. B. Martínez. 1994. Determination of cellular fatty acids of *Klebsiella ozaenae* by gas chromatography. Rev. Roum. Biochim. **31**,1:51-55 Bucarest.
- Robles Valderrama E., Ramírez García P., M.E. González Arreaga. M.G. Sáinz Morales, B. Martínez Rodríguez, A Durán Díaz & D. Chávez Ramírez. 1999. Aplicación de la Cromatografía de Gases en la identificación de *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes* y *Enterobacter agglomerans*. Revista Latinoamericana de Microbiología **41**:11-16.
- Sasser, M. 1990. Identification of bacteria through fatty acid analysis, p. 199-204. In: Methods in phytobacteriology. Z. Klement, K. Rudolph and D. Sands (ed.) Akademiai Kiado, Budapest.
- Shantha N. C. & Napolitano G. E. 1992. Review gas chromatography of fatty acids. J Chrom **624**:37-51.
- Seidler, R. J., Knittel, M. D. & Brown, C. 1975. Potential pathogens in the environment: Cultural reactions and nucleic acid studies on *Klebsiella pneumoniae* from clinical and environmental sources. Appl Microbiol **29**:819-825.
- Severn, W. B., Kelly, Robert, Richards, J. C., Whitfield, C. 1996. Structure of the Core Oligosaccharide in the Serotype O8 Lipopolysaccharide from *Klebsiella pneumoniae*. J Bacteriol **178**:1731-1741.
- Siegel, J.P., Smith, A.R. and Novak, R.J. 1997. Comparison of the cellular fatty acid composition of a Bacterium Isolated from a human and alleged to be *Bacillus sphaericus* with that of *Bacillus sphaericus* isolated from a mosquito larvicide. Appl and Environ Microbiol **63**:No. 3 1006-1010.
- Slopek, S. & Durlakowa, I. 1967. Studies on the taxonomy of *Klebsiella bacilli*. Arch Immun Therap Experimen **15**:481-487.
- Smith, R. A & Siegel, P.J. 1996 Cellular fatty acid Analysis for the Classification and Identification of Bacteria. In: Automated microbial identification and quantitation-technologies for the 2000's.- (cap 9) Edited by Wine P. Olson. Interpharm Press, Inc. Buffalo Grove, IL.
- Sprent, J. I. & Sprent, P. 1990. Nitrogen fixing organisms. University press, Cambridge, GB. p 66-84
- Springer, B., Stockman, L., Teschner, K., Roberts, G. D. and Böttger, E. C. 1996. Two-laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: molecular versus phenotypic methods. J Clin Microbiol **34**:No. 2 296-303.

- Steele, M., McNab, W.B., Read, S., Poppe, C., Harris, L., Lammerding, A.M., Odumeru, J.A. 1997. Analysis of Whole-Cell Fatty Acid Profiles of Verotoxigenic *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis* with the Microbial Identification System. *Appl Environ Microbiol* **63**:757-760.
- Trautmann, M. *et al.*, 1997. O-antigen seroepidemiology of *Klebsiella* clinical isolates and implications for immunoprophylaxis of *Klebsiella* infections. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* **4**:550-555.
- Tsitko, I. V., Zaitzev, G. M., Lobanok A. G. & Salkinoja-Salonen M. S. 1999. Effect of aromatic compounds on cellular fatty acid composition of *Rhodococcus opacus*. *Appl Environ Microbiol* **65**:853-855.
- Urdaci, M. C., Marchaad M. & Grimont P. A. D. 1990. Characterization of 22 *Vibrio* species by gas chromatography analysis of their cellular fatty acids. *Institute Pasteur. Res Microbiol.* **141**:437-452
- Veys, A., Clallenaert, W., Waelkens, E. & Abbeele, K. V. 1989. Application of gas-liquid chromatography to the routine identification of nonfermenting Gram-negative bacteria in clinical specimens *J Clin Microbiol* **7**:1538-1542.
- Verhulst, A., Van Hespén, H., Symons, F. & Eyssen, H. 1987. Systematic Analysis of the long-chain components of *Eubacterium lentum*. *J Gen Microbiol* **133**:275-286.
- Welch, D. F. 1991. Applications of cellular fatty acid analysis. *Clin Microbiol Rev.* **4**:422-438.
- Yuk-Fong Liu, P., Tung, Jai-Chin, Ke, Se-Chin and Chen, Shun-Liang. 1998. Molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in a district hospital in Taiwan. *J Clin Microbiol* **36**:2759-2762.

Tabla 1. Areas normalizadas de los ácidos grasos (%) respecto al ácido graso de mayor concentración (C16:0) en *K. ozaenae*

Tamaño de muestra n=50	C12:0	C14:0	C15:0	C14:0	C14:0	C16:1 ^o	C16:0	C17:0	C17:0	C18:2 ^{o,14}	C18:1 ^o	C18:1 ^o	C18:0
				2-OH	3-OH			cis 9,10				C18:1 ^o	
	AN 3	AN 7	AN 10	AN 11	AN 12	AN 14	AN 15	AN 17	AN 18	AN 20	AN 21	AN 22	AN 23
1	0.64	31.38	3.53	1.86	11.72	70.73	100	0.26	2.07	0.25	0.27	36.85	1.12
2	0.64	31.35	3.45	1.80	11.76	71.30	100	0.14	2.03	0.19	0.27	36.89	1.13
3	0.51	25.78	2.52	1.62	11.91	65.63	100	0.37	1.90	0.25	0.41	35.54	1.32
4	0.57	26.57	2.70	1.89	13.17	66.55	100	0.36	1.87	0.25	0.49	36.49	1.26
5	0.52	26.29	3.27	1.64	10.27	66.63	100	0.37	2.37	0.26	0.39	37.65	1.40
6	0.85	34.76	3.37	1.80	9.89	67.39	100	0.30	1.72	0.16	0.34	26.66	0.93
7	0.85	26.87	2.06	1.41	11.29	67.45	100	0.31	1.41	0.25	0.21	39.82	1.26
8	0.54	26.72	2.69	2.01	10.55	66.08	100	0.74	1.86	0.24	0.58	33.87	1.24
9	0.42	24.06	2.44	1.56	8.87	67.41	100	0.40	1.86	0.24	0.54	39.37	1.23
10	0.89	39.36	4.06	3.80	20.57	98.86	100	2.02	2.89	0.34	0.88	29.31	1.51
11	0.43	24.24	2.61	1.60	9.48	66.23	100	0.27	1.87	0.21	0.47	38.08	1.13
12	0.43	23.45	2.33	1.21	7.13	64.81	100	0.25	1.58	0.20	0.38	32.42	1.08
13	0.53	25.64	3.74	2.04	12.16	66.22	100	0.39	2.51	0.24	0.25	38.62	1.39
14	0.52	25.64	3.69	2.00	7.74	56.52	100	0.39	2.51	0.24	0.25	38.62	1.36
15	0.60	27.79	2.86	1.91	10.88	67.08	100	0.10	2.05	0.06	0.55	24.08	1.26
16	0.54	27.09	2.39	1.27	7.68	66.83	100	0.36	1.55	0.21	0.70	33.22	1.15
17	0.52	27.10	2.39	1.29	7.87	66.97	100	0.11	1.53	0.20	0.72	0.27	1.05
18	0.56	31.71	2.98	1.64	10.13	86.77	100	0.48	2.07	0.17	1.02	29.28	1.53
19	0.43	21.80	2.54	1.11	6.32	33.96	100	0.41	1.89	0.23	0.49	37.23	1.31
20	0.61	29.03	3.20	1.36	7.51	78.26	100	0.38	2.00	0.08	0.56	38.88	1.31
21	0.42	20.03	2.29	0.66	3.97	46.74	100	0.35	1.60	0.22	0.54	34.60	1.30
22	0.42	21.44	3.73	0.96	5.85	65.41	100	0.31	2.58	0.21	0.23	39.37	1.50
23	0.45	24.43	5.10	1.06	5.47	78.37	100	0.51	3.32	0.23	0.45	46.01	1.64
24	0.79	39.08	4.77	4.11	19.96	86.23	100	0.46	3.06	0.24	0.54	49.50	1.53
25	0.49	25.14	4.79	1.53	8.36	36.67	100	0.47	3.03	0.20	0.15	40.75	1.38
26	0.42	23.43	4.17	1.24	7.11	40.72	100	0.42	2.66	0.19	0.24	41.81	1.28
27	0.50	27.02	4.17	1.79	9.77	58.71	100	0.37	2.69	0.20	0.25	42.70	1.28
28	0.49	26.08	5.89	1.10	0.07	81.62	100	0.69	3.66	0.23	0.39	31.86	1.73
29	0.45	24.30	2.90	1.02	3.03	80.40	100	0.60	3.49	0.25	0.45	39.91	1.87
30	0.38	20.32	4.25	0.81	4.64	65.69	100	0.50	2.82	0.07	0.18	38.95	1.49
31	0.46	23.58	3.90	1.06	5.81	66.72	100	0.39	1.15	0.18	0.21	37.66	1.28

Tabla 1.

Áreas normalizadas de los ácidos grasos (%) respecto al ácido graso de mayor concentración (C16:0) en *K. ozaenae*

32	0.47	24.40	4.65	1.74	8.66	66.33	100	0.52	3.00	0.21	0.33	40.62	1.53
33	0.60	27.09	3.91	2.10	11.52	68.12	100	0.45	2.60	0.25	0.76	40.36	1.48
34	0.60	30.35	4.92	1.63	8.71	85.62	100	1.28	3.33	0.22	0.55	51.63	1.77
35	0.53	27.46	3.91	2.01	10.49	68.64	100	0.47	2.61	0.09	0.44	41.02	1.29
36	0.63	33.31	5.09	2.63	11.79	79.15	100	0.54	3.12	0.18	0.39	32.51	1.44
37	0.45	22.58	4.34	1.44	6.82	48.70	100	0.55	2.88	0.23	0.53	38.97	1.46
38	0.46	23.43	4.30	1.49	7.01	66.13	100	0.50	2.74	0.20	0.47	39.20	1.37
39	0.63	34.69	4.79	2.61	13.08	70.96	100	0.46	3.32	0.30	0.47	52.37	1.93
40	0.58	30.65	5.04	1.97	10.23	86.85	100	0.60	3.35	0.15	0.38	50.37	1.74
41	0.73	30.26	2.72	3.30	18.01	67.55	100	0.27	1.84	0.21	0.41	42.25	1.40
42	1.60	63.67	4.01	4.72	24.62	46.26	100	0.39	2.93	0.51	0.40	97.34	3.36
43	0.88	30.63	2.07	3.52	18.38	66.71	100	0.20	1.51	0.17	0.33	32.06	1.36
44	1.12	45.96	4.03	3.47	18.44	38.71	100	0.41	2.91	0.38	0.23	36.78	2.70
45	0.86	32.61	2.07	3.27	17.73	66.94	100	0.15	1.43	0.15	0.26	41.96	1.35
46	0.85	31.10	2.26	3.06	17.25	66.14	100	0.20	1.55	0.06	0.31	44.09	1.47
47	0.63	26.27	1.45	1.65	9.28	50.56	100	0.19	1.47	0.18	0.21	34.44	1.40
48	0.68	26.91	1.94	1.60	9.55	65.47	100	0.19	1.41	0.20	0.26	45.08	1.54
49	1.10	40.78	1.63	2.65	15.29	75.29	100	0.15	1.16	0.32	0.35	55.60	2.59
50	0.70	29.30	1.95	2.66	14.72	65.32	100	0.19	1.43	0.18	0.32	44.43	1.52

Tabla 2. Areas normalizadas de los ácidos grasos (%) respecto al ácido graso de mayor concentración (C16:0) en *K. pneumoniae*

Tamaño de muestra n = 54	C12:0	C14:0	C15:0	C14:0	C14:0	C16:1 ^ω	C16:0	C17:0	C17:0	C18:1 ^ω	C18:0	C19:0
				2-OH	3-OH			cis 9,10		C18:1 ¹¹		cis 9,10
	AN 3	AN 7	AN 10	AN 11	AN 12	AN 14	AN 15	AN 17	AN 18	AN 22	AN 23	AN 24
1	1.14	22.77	2.67	2.17	9.62	16.34	100	51.61	2.48	18.52	2.50	26.08
2	1.13	23.59	2.64	0.51	10.68	17.66	100	51.99	2.36	18.93	1.93	24.44
3	1.12	24.05	2.98	2.21	11.24	17.36	100	52.34	2.33	19.70	1.90	25.96
4	1.23	25.20	2.46	2.50	13.39	17.11	100	54.21	2.21	18.45	2.11	26.99
5	1.40	29.21	2.75	2.93	15.18	17.59	100	49.38	2.23	17.41	1.88	21.48
6	0.91	21.84	2.67	1.59	8.05	18.25	100	49.56	2.36	20.98	1.88	24.04
7	1.69	29.06	2.59	3.35	17.12	16.29	100	52.21	2.38	16.52	2.10	23.83
8	0.91	32.63	2.94	4.32	19.68	18.63	100	49.51	2.40	17.51	1.99	21.56
9	2.05	31.74	2.42	4.28	22.24	18.45	100	51.19	2.12	17.46	1.96	23.57
10	1.11	25.76	2.43	3.28	15.73	18.90	100	51.95	2.29	21.00	2.19	25.85
11	0.94	24.24	3.01	1.60	9.97	27.20	100	44.04	2.29	32.13	1.75	19.84
12	1.23	26.94	2.12	3.14	12.52	28.51	100	43.39	2.35	31.62	1.72	19.39
13	1.11	20.84	2.98	2.59	6.44	25.51	100	44.40	2.12	29.72	1.72	19.92
14	1.11	24.86	2.97	2.59	11.28	28.91	100	42.42	2.33	32.00	1.85	18.49
15	0.71	20.77	2.95	1.32	8.51	26.38	100	41.93	2.28	30.78	1.63	18.59
16	1.17	23.22	2.64	1.90	9.13	18.03	100	48.80	2.28	20.02	2.10	23.57
17	0.56	13.12	3.69	0.51	0.51	28.73	100	39.33	3.23	39.65	2.01	17.17
18	1.16	19.79	4.27	0.75	5.00	32.30	100	36.91	3.12	34.29	1.47	12.89
19	1.79	14.09	3.90	0.86	4.30	28.16	100	38.22	3.32	39.32	2.37	16.40
20	0.57	12.88	3.79	0.50	2.44	30.14	100	41.16	3.45	42.69	2.20	18.52
21	0.63	13.98	3.66	0.68	3.14	27.26	100	38.93	0.00	36.85	2.51	16.35
22	1.06	19.54	4.12	1.85	10.19	31.56	100	42.01	3.33	39.66	1.98	17.17
23	0.88	17.74	4.20	1.14	7.14	31.00	100	43.20	3.42	39.78	0.00	18.69
24	1.36	18.04	3.92	1.14	6.74	31.95	100	40.73	3.21	40.26	1.89	17.09
25	1.97	13.16	3.59	0.52	2.19	22.13	100	44.83	3.18	28.55	3.85	20.28
26	1.70	10.97	3.32	0.31	1.21	22.98	100	36.80	3.11	31.82	3.92	16.80
27	2.11	10.88	3.23	0.40	1.67	21.53	100	41.67	3.33	32.05	3.30	19.87
28	1.92	10.68	3.15	0.41	1.47	20.66	100	44.80	3.30	34.61	0.30	23.40
29	1.41	18.89	3.08	1.69	8.20	26.69	100	43.68	2.67	35.19	4.12	19.00
30	3.08	11.75	3.38	0.62	2.74	20.75	100	44.90	3.34	32.24	3.80	21.80
31	2.39	22.59	3.62	3.94	14.15	25.09	100	49.56	3.37	32.90	4.08	23.98

Tabla 2. Areas normalizadas de los ácidos grasos (%) respecto al ácido graso de mayor concentración (C16:0) en *K. pneumoniae*

32	0.68	17.77	4.04	0.82	6.91	30.44	100	50.36	3.46	43.18	1.90	24.08
33	0.76	15.46	3.50	1.06	4.34	36.57	100	40.96	2.94	43.73	2.13	14.71
34	0.54	13.16	3.42	0.00	1.51	31.25	100	39.17	2.75	39.83	2.27	14.35
35	0.61	14.58	3.93	0.53	1.58	31.85	100	44.41	3.07	39.15	2.19	15.98
36	0.60	13.66	3.70	0.50	2.51	34.48	100	45.81	3.08	44.10	2.51	16.33
37	0.60	14.17	3.67	0.50	1.94	34.63	100	42.31	2.99	43.21	2.07	16.41
38	0.41	13.39	3.46	0.56	2.23	26.74	100	49.00	2.94	37.83	2.10	21.62
39	0.90	18.30	4.67	1.04	6.54	31.06	100	49.49	3.42	38.42	1.83	19.12
40	0.94	18.49	4.67	1.06	7.70	28.18	100	51.77	3.88	37.80	2.02	22.13
41	1.34	24.62	6.51	3.55	19.63	51.95	100	53.31	2.97	37.84	1.22	13.47
42	2.64	25.39	5.82	5.07	33.73	43.19	100	45.84	3.69	34.94	1.33	14.98
43	5.88	46.16	7.20	6.16	46.12	56.16	100	45.24	0.00	26.22	0.00	9.25
44	0.95	21.14	4.64	0.66	8.15	30.57	100	47.84	3.55	38.56	1.62	19.10
45	1.76	23.07	5.39	0.00	27.81	45.27	100	48.49	2.96	37.21	0.00	15.14
46	2.05	24.53	5.98	5.67	36.33	44.34	100	51.94	3.27	37.10	1.32	17.57
47	0.66	20.65	5.72	0.42	10.12	32.32	100	52.97	3.55	33.40	1.34	16.26
48	0.78	21.79	5.76	0.45	10.55	32.04	100	52.09	3.74	32.19	1.39	16.31
49	0.71	20.96	5.89	0.37	11.14	35.99	100	49.81	3.37	33.83	1.25	13.90
50	0.65	20.52	6.50	0.00	11.24	38.61	100	51.08	3.14	31.86	0.99	11.79
51	0.77	22.92	7.52	0.00	13.76	44.39	100	54.97	3.07	30.55	0.91	10.60
52	0.54	18.58	6.56	0.00	10.93	36.46	100	50.29	3.27	30.79	0.88	12.25
53	0.53	18.32	5.47	0.00	5.93	31.63	100	46.55	3.66	33.35	1.58	15.66
54	0.72	19.62	4.69	0.00	3.68	27.34	100	0.00	3.27	33.65	1.23	18.07

Tabla 3. Areas normalizadas de los ácidos grasos (%) respecto al ácido graso de mayor concentración (C16:0) en *K. oxytoca*.

Tamaño de muestra n = 61	C12:0 AN 3	C14:0 AN 7	C15:0 AN 10	C14:0 3-OH AN 12	C16:1 ^ω AN 14	C16:0 AN 15	C17:0 cis 9,10 AN 17	C17:0 AN 18	C18:1 ^ω C18:1 ¹¹ AN 22	C18:0 AN 23	C19:0 cis 9,10 AN24
1	1.08	6.06	2.69	0.94	14.74	100	65.08	2.83	29.83	2.03	23.45
2	1.10	6.77	3.48	0.59	15.78	100	55.00	1.51	25.90	1.79	17.28
3	2.36	10.77	3.20	5.55	15.61	100	53.12	3.34	25.57	1.87	17.06
4	1.96	7.57	2.66	1.22	17.14	100	56.88	2.65	28.62	2.36	18.18
5	0.93	5.78	2.83	0.96	13.52	100	66.44	2.97	27.07	2.01	25.44
6	0.94	5.89	3.32	0.96	13.59	100	63.33	3.20	27.30	2.20	23.68
7	1.33	6.68	2.91	1.48	15.02	100	64.21	2.87	30.37	2.05	22.35
8	1.28	6.43	3.03	1.07	16.96	100	60.15	3.18	32.43	2.93	20.81
9	0.91	6.06	3.18	0.89	14.78	100	60.50	3.17	28.04	2.26	21.02
10	0.84	5.46	2.82	1.20	11.96	100	66.91	3.30	24.40	2.21	26.94
11	1.18	6.50	3.13	1.16	14.62	100	61.73	2.99	29.66	2.19	22.19
12	0.62	5.25	2.86	0.59	18.46	100	42.71	3.34	24.51	1.88	20.96
13	0.92	6.58	2.90	1.25	15.06	100	60.74	2.85	27.38	1.99	20.45
14	0.94	5.95	3.26	1.84	16.32	100	65.46	3.56	32.36	1.92	25.27
15	0.56	4.89	3.00	0.60	17.73	100	62.39	3.52	34.97	2.02	23.21
16	0.79	5.86	3.51	1.01	16.02	100	62.30	3.56	29.92	1.72	22.48
17	0.80	5.80	2.84	0.98	17.09	100	63.42	2.78	32.92	1.91	22.99
18	0.60	5.06	3.16	0.56	16.82	100	64.04	3.48	34.05	1.92	23.88
19	0.91	6.24	3.30	1.06	20.08	100	56.75	3.54	33.29	1.79	18.28
20	0.64	5.09	2.99	0.45	20.47	100	59.70	3.52	38.10	2.02	21.50
21	1.03	8.02	4.49	0.89	17.00	100	88.31	4.98	33.10	2.77	29.71
22	1.64	6.30	2.81	1.89	14.02	100	53.18	3.30	29.28	3.67	20.12
23	1.55	6.11	2.68	2.02	14.14	100	54.54	3.43	30.49	3.83	21.20
24	1.76	6.34	2.85	1.94	14.34	100	54.03	3.34	29.37	3.32	20.73
25	1.47	6.15	2.79	1.91	13.79	100	52.98	3.37	28.33	4.26	19.87
26	1.52	6.40	2.76	2.60	13.92	100	54.62	3.36	28.72	3.96	20.14
27	2.86	6.51	2.82	2.08	14.10	100	54.47	3.36	28.63	3.51	20.02
28	8.26	8.81	2.84	2.20	14.27	100	41.38	2.72	22.65	2.73	9.86
29	6.06	6.94	2.73	3.61	12.09	100	59.06	3.47	30.95	4.07	21.88
30	6.89	6.51	2.67	2.53	11.01	100	54.61	3.41	30.82	4.04	20.31
31	5.94	5.82	2.41	1.82	13.56	100	50.78	3.31	33.73	4.81	17.52

Tabla 3. Areas normalizadas de los ácidos grasos (%) respecto al ácido graso de mayor concentración (C16:0) en *K. oxytoca*.

32	7.82	6.55	2.49	1.86	15.27	100	46.18	3.11	34.08	4.28	14.02
33	5.35	5.57	2.65	2.20	11.03	100	52.97	3.63	31.16	5.29	20.99
34	1.63	6.99	2.72	2.56	12.44	100	51.55	3.45	29.82	3.80	17.31
35	3.65	9.39	3.37	2.35	17.15	100	53.08	2.81	22.75	1.89	14.49
36	1.75	6.42	2.99	1.60	16.33	100	60.80	3.16	30.55	2.74	19.95
37	2.79	6.44	2.80	2.12	12.91	100	47.99	3.12	28.12	4.61	17.89
38	2.00	7.53	2.91	2.76	13.82	100	49.61	3.20	28.27	4.59	17.40
39	4.17	5.95	2.75	1.57	12.00	100	51.71	3.24	28.83	6.74	16.54
40	1.54	6.89	2.67	1.83	12.91	100	47.87	3.04	28.41	2.86	14.76
41	3.24	6.04	2.59	1.86	13.60	100	46.87	3.17	28.97	5.25	16.37
42	1.37	6.10	2.69	1.84	11.34	100	51.27	3.38	30.21	6.57	17.83
43	7.73	10.26	2.95	5.07	15.31	100	48.41	2.98	26.84	3.74	16.29
44	1.42	6.40	2.56	2.33	13.03	100	52.72	3.29	31.99	5.23	17.69
45	4.38	6.44	2.79	2.36	13.00	100	51.38	3.28	31.31	7.67	17.24
46	1.98	5.70	2.61	1.87	12.74	100	49.03	3.31	30.14	7.02	17.44
47	4.29	5.72	2.85	1.64	12.31	100	50.43	3.29	29.40	7.41	16.85
48	4.15	5.89	2.91	1.33	11.51	100	44.65	3.29	26.76	7.59	15.95
49	1.39	6.14	2.68	2.27	12.60	100	50.82	3.42	27.86	4.64	18.55
50	1.49	6.31	2.88	1.62	16.11	100	61.08	3.34	30.03	2.79	21.77
51	1.23	5.71	2.98	0.99	15.74	100	61.66	3.18	31.59	2.72	21.33
52	3.21	8.78	3.29	3.06	17.23	100	58.20	2.84	26.93	3.22	18.00
53	2.32	7.65	3.08	2.88	16.93	100	61.71	3.12	30.19	3.10	20.25
54	1.67	6.40	2.60	0.92	21.13	100	54.23	2.88	33.75	2.23	15.59
55	1.76	6.38	2.42	1.31	19.59	100	48.33	2.86	33.50	2.75	13.84
56	1.76	6.55	2.64	1.33	21.41	100	53.30	2.91	35.11	2.42	15.86
57	1.76	6.48	2.62	1.01	20.87	100	55.33	3.04	34.26	3.14	16.50
58	1.80	6.20	2.50	1.02	21.37	100	52.96	3.06	37.62	3.97	16.54
59	1.97	6.78	2.60	0.88	21.99	100	53.47	3.01	36.86	4.10	16.35
60	1.78	6.66	2.56	1.20	21.81	100	53.15	2.96	35.32	3.36	15.52
61	1.83	6.74	2.85	1.19	21.54	100	54.71	2.92	33.25	2.52	15.69

Tabla 4. Areas normalizadas de los ácidos grasos (%) respecto al ácido graso de mayor concentración (C16:0) en *K. planticola*.

Tamaño de muestra n=53	C12:0 AN 3	C14:0 AN 7	C15:0 AN 10	C14:0 3-OH AN 12	C16:19 AN 14	C16:0 AN 15	C17:0 cis 9,10 AN 17	C17:0 AN 18	C18:19 C18:1'' AN 22	C18:0 AN 23	C19:0 cis 9,10 AN 24
1	2.44	12.14	3.79	7.68	41.84	100	30.29	4.87	56.32	2.06	1.55
2	2.17	11.55	3.55	7.01	40.21	100	29.99	4.61	54.08	1.98	1.56
3	2.37	12.37	3.86	7.79	43.58	100	28.71	5.05	57.79	1.92	1.50
4	2.39	8.19	5.41	6.28	50.88	100	30.78	6.25	56.61	1.62	1.19
5	2.43	13.00	2.98	7.90	38.69	100	32.79	3.73	53.94	2.45	1.85
6	2.82	13.18	3.67	8.34	39.02	100	32.78	4.47	52.29	2.06	1.63
7	2.73	10.90	2.91	6.15	45.63	100	28.93	4.20	62.21	1.98	1.51
8	3.56	13.00	4.02	7.20	45.54	100	30.19	4.43	53.47	1.62	1.29
9	3.67	12.14	3.21	7.70	43.47	100	31.69	4.36	61.62	2.01	1.61
10	1.93	9.26	4.27	4.89	44.69	100	31.38	6.23	66.15	2.43	1.70
11	5.65	16.02	3.76	14.83	42.60	100	23.91	5.29	41.83	1.93	2.03
12	1.99	10.37	4.83	4.26	43.71	100	26.95	6.44	48.35	1.78	1.35
13	4.10	14.97	4.87	9.09	47.75	100	29.26	5.29	51.20	1.59	1.16
14	3.60	15.39	6.21	3.45	60.44	100	38.17	7.26	72.32	2.44	1.65
15	7.13	19.10	4.26	16.21	42.63	100	38.69	3.91	56.75	1.85	2.02
16	6.86	18.03	4.90	17.55	31.98	100	35.41	5.56	65.35	1.77	1.65
17	5.61	16.35	4.29	11.03	45.86	100	36.56	6.17	71.01	2.18	2.54
18	1.89	9.87	3.19	3.92	44.61	100	32.07	4.29	63.84	1.12	1.62
19	2.33	11.18	3.36	4.55	46.59	100	30.03	4.13	59.65	1.81	1.40
20	2.05	9.96	2.99	3.89	45.57	100	30.54	4.04	63.17	2.14	1.53
21	1.81	9.16	4.15	2.23	47.68	100	30.34	5.19	60.98	2.03	1.42
22	1.63	8.84	4.09	2.54	47.35	100	30.44	5.15	61.53	2.06	1.41
23	1.49	8.39	3.49	2.41	43.85	100	32.43	4.61	61.57	2.16	1.61
24	1.92	10.11	3.38	3.35	45.35	100	31.03	4.01	58.39	1.99	1.44
25	1.71	9.10	3.37	3.36	43.41	100	33.33	4.58	33.67	2.24	1.70
26	1.77	9.28	3.01	2.92	44.27	100	32.48	3.90	61.20	2.05	1.55
27	4.90	15.51	4.92	10.92	48.06	100	32.11	6.14	63.55	1.89	1.66
28	2.99	12.09	3.61	7.07	45.03	100	32.26	5.24	67.64	2.12	1.74
29	3.08	11.82	3.69	6.44	42.37	100	35.55	5.52	71.75	2.39	2.28
30	1.57	8.83	3.66	3.90	45.74	100	29.37	5.11	64.01	2.05	1.46
31	1.86	9.65	3.92	4.56	45.50	100	29.89	5.46	61.25	2.06	1.46

Tabla 4. Areas normalizadas de los ácidos grasos (%) respecto al ácido graso de mayor concentración (C16:0) en *K. planticola*.

32	2.01	10.50	2.77	7.47	46.05	100	30.19	4.06	65.60	2.22	1.56
33	2.99	12.52	3.03	9.86	44.76	100	33.66	4.36	67.91	2.15	2.08
34	2.62	12.66	4.96	5.50	56.39	100	36.69	6.70	47.32	2.45	1.77
35	2.90	12.72	6.20	6.40	53.76	100	38.82	8.05	54.13	2.57	1.90
36	1.53	8.35	4.12	2.81	46.89	100	28.23	5.46	61.02	2.11	1.41
37	2.20	10.57	4.05	5.44	44.28	100	31.49	5.34	59.26	2.11	1.56
38	2.37	10.28	3.18	4.84	46.59	100	30.05	4.42	61.60	2.04	1.44
39	2.07	9.69	3.88	4.51	47.48	100	26.88	5.39	62.26	2.02	1.26
40	2.30	10.11	4.33	4.92	45.42	100	29.08	5.90	61.37	2.67	1.47
41	2.22	8.48	3.32	2.27	43.71	100	33.06	4.31	60.83	2.04	1.68
42	2.34	8.55	2.82	2.35	41.27	100	34.65	3.77	57.95	2.08	1.81
43	2.17	8.38	3.05	2.99	39.30	100	37.52	3.92	57.88	2.03	2.03
44	2.63	9.00	2.60	3.06	41.27	100	32.07	3.65	62.53	2.12	1.70
45	3.32	14.06	4.24	6.14	48.77	100	42.73	5.94	73.50	3.16	2.97
46	3.82	13.72	3.16	6.57	51.85	100	45.01	4.51	44.13	2.77	2.37
47	3.10	11.22	2.69	2.66	41.71	100	34.47	3.78	63.22	2.14	1.86
48	3.74	12.83	2.84	8.04	42.39	100	34.59	3.95	58.82	2.06	1.86
49	3.94	16.06	4.51	3.15	64.03	100	60.54	6.32	61.88	3.48	3.41
50	3.33	12.10	3.21	5.13	50.29	100	42.70	4.40	51.49	2.68	2.24
51	4.35	16.11	4.12	8.97	58.49	100	54.15	5.86	62.72	3.42	2.99
52	3.84	10.34	6.78	2.56	35.66	100	53.21	7.61	59.37	2.50	3.38
53	4.93	12.19	7.16	3.32	40.86	100	56.57	8.36	57.63	2.80	3.84

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Tabla 5. Áreas normalizadas de los ácidos grasos (%) respecto al ácido graso de mayor concentración (C16:0) en *K. rhinoscleromatis*.

Tamaño de muestra n=50	C12:0 AN 3	C14:0 AN 7	C15:0 AN 10	C14:0 3-OH AN 12	C16:1 ⁹ AN 14	C16:0 AN 15	C17:0 cis 9,10 AN 17	C17:0 AN 18	C18:2 ^{7,12} AN 20	C18:1 ⁹ C18:1 ¹¹ AN 22	C18:0 AN 23	C19:0 cis 9,10 AN 24
1	1.57	8.07	2.13	2.56	38.79	100	35.16	3.05	0.18	59.18	2.25	2.04
2	1.95	8.31	2.75	2.61	36.24	100	37.62	3.65	0.18	58.39	2.23	2.48
3	1.68	9.05	2.39	2.77	37.11	100	35.28	2.96	0.26	50.34	2.28	2.09
4	2.04	8.57	2.51	2.51	41.58	100	33.53	3.57	0.22	62.54	2.22	1.92
5	1.69	7.97	2.49	2.26	40.48	100	34.46	3.52	0.20	60.42	2.20	1.90
6	1.70	8.02	2.64	2.24	41.99	100	32.86	3.64	0.19	60.33	2.18	1.74
7	1.79	8.21	2.94	2.45	36.90	100	38.85	3.98	0.20	54.72	2.23	2.43
8	1.49	8.23	2.61	2.76	38.28	100	36.35	3.63	0.19	59.49	2.28	2.14
9	2.10	8.45	2.62	2.76	36.74	100	39.10	3.50	0.15	57.45	2.28	2.36
10	1.89	8.32	2.43	2.72	38.75	100	36.82	3.35	0.21	58.65	2.27	2.12
11	1.60	7.70	2.24	1.90	37.75	100	36.41	3.21	0.18	60.11	2.23	2.29
12	2.09	8.75	2.49	2.66	38.98	100	35.70	3.23	0.18	55.47	2.10	1.96
13	1.62	7.74	2.27	2.00	37.64	100	36.17	3.18	0.16	59.29	2.19	2.26
14	1.80	9.19	2.58	3.79	34.62	100	34.28	3.59	0.18	60.23	2.12	1.95
15	0.98	7.02	2.59	1.86	44.67	100	32.28	3.69	0.17	67.17	2.19	1.75
16	1.75	8.64	2.66	3.70	35.88	100	37.52	3.59	0.14	57.12	2.21	2.26
17	1.90	9.37	2.96	4.34	42.85	100	33.18	4.13	0.18	64.56	2.15	1.84
18	2.36	10.63	2.48	5.43	43.13	100	32.61	3.57	0.18	64.10	2.17	1.79
19	1.56	8.55	2.78	3.26	40.64	100	34.57	3.96	0.17	62.90	2.19	2.00
20	3.84	10.00	2.19	5.05	45.18	100	30.76	3.40	0.16	67.53	2.35	1.67
21	4.52	11.24	2.07	5.50	40.78	100	33.95	3.21	0.18	61.99	2.60	2.10
22	5.29	11.86	2.03	5.52	41.54	100	32.72	2.88	0.17	61.97	2.25	1.82
23	2.36	8.63	2.22	2.56	40.69	100	34.73	3.12	0.17	58.89	2.09	1.87
24	3.37	10.02	2.08	3.70	40.92	100	33.08	2.78	0.17	57.63	2.41	1.80
25	3.75	10.30	2.21	3.64	42.53	100	32.82	3.14	0.15	61.42	2.24	1.69
26	3.78	10.46	1.90	4.81	39.05	100	35.14	3.03	0.20	61.01	2.70	2.22
27	3.85	10.45	2.07	4.97	42.62	100	32.16	3.03	0.18	61.51	2.38	1.76
28	3.67	10.19	2.16	4.53	45.19	100	30.88	3.29	0.18	63.60	2.49	1.80
29	5.18	13.62	2.40	8.66	43.08	100	32.42	3.35	0.13	65.67	2.06	1.83
30	3.37	11.90	3.08	6.51	43.27	100	33.24	4.21	0.13	68.11	2.12	1.92
31	2.92	10.10	2.51	3.98	42.55	100	32.33	3.51	0.14	62.03	2.12	1.68

Tabla 5. Areas normalizadas de los ácidos grasos (%) respecto al ácido graso de mayor concentración (C16:0) en *K. rhinoscleromatis*.

32	4.42	11.79	2.58	6.12	49.34	100	29.90	3.22	0.16	68.18	1.99	1.61
33	4.08	11.45	2.51	6.18	48.83	100	30.06	3.26	0.15	68.86	2.02	1.63
34	6.64	15.86	2.40	12.49	42.96	100	30.95	3.40	0.15	61.16	2.00	1.66
35	3.18	11.72	3.06	6.31	42.57	100	33.08	4.21	0.17	67.07	2.20	1.88
36	2.87	10.29	2.55	3.65	42.22	100	32.20	3.53	0.15	61.08	2.15	1.68
37	2.54	10.02	2.50	4.41	39.76	100	32.96	3.50	0.15	62.99	2.22	1.98
38	7.10	16.77	2.68	9.73	43.50	100	30.60	3.41	0.13	58.21	1.82	1.52
39	2.04	10.51	2.34	4.66	41.00	100	31.73	3.25	0.14	61.33	2.17	1.79
40	5.24	13.48	2.41	5.94	46.62	100	27.60	3.19	0.18	60.37	1.90	1.30
41	3.58	10.88	2.37	3.95	43.73	100	30.35	3.19	0.16	59.99	2.00	1.47
42	3.69	11.13	2.40	3.84	43.28	100	30.33	3.14	0.16	60.17	2.09	1.59
43	4.94	15.19	3.34	2.05	62.07	100	41.08	4.52	0.21	34.08	2.70	2.02
44	3.44	10.73	2.36	3.97	42.35	100	30.79	3.24	0.16	60.42	2.23	1.69
45	8.23	18.74	3.82	8.14	75.59	100	48.74	5.57	0.29	71.18	3.63	2.31
46	3.95	10.51	2.67	3.71	44.00	100	31.53	3.87	0.15	15.79	2.09	1.64
47	3.65	9.46	1.85	3.31	39.22	100	26.07	2.17	0.17	57.71	2.29	1.76
48	3.61	10.02	2.73	3.06	43.65	100	22.16	4.05	0.13	37.75	2.03	1.55
49	2.98	8.77	2.30	3.02	33.14	100	30.60	3.45	0.16	43.72	2.27	1.58
50	3.84	11.53	2.86	3.91	61.25	100	39.19	4.07	0.20	46.45	3.15	1.95

Tabla 6. Estadística descriptiva de las áreas de los picos cromatográficos de cada ácido graso, en las cinco especies tipo de *Klebsiella*.

K. ozaenae ATCC 11296

Clasificación de ácidos grasos	Ácido graso		n	Media		Error		Intervalo de confianza			
	(No de carbonos)	Pico		aritmética	Varianza	estándar	Mediana	Mínimo	Máximo	de la media al 95%	
Saturados (23.48 %)	C 12:0	3	50	0.62	0.05	0.03	0.55	0.38	1.60	(0.56, 0.68)	
	C 14:0	7	50	28.86	53.36	1.03	26.96	20.03	63.67	(26.78, 30.93)	
	C 15:0	10	50	3.40	1.18	0.15	3.41	1.45	5.89	(3.09, 3.70)	
	C 17:0	18	50	2.28	0.49	0.10	2.07	1.15	3.66	(2.08, 2.48)	
	C 18:0	23	50	1.48	0.18	0.06	1.38	0.93	3.36	(1.36, 1.60)	
Insaturados (76.25 %)	Monoenoicos	C 16:1 ⁹	14	50	66.37	174.75	1.87	66.71	33.96	98.86	(62.61, 70.12)
		C 18:1 ⁹	21	50	0.42	0.03	0.03	0.39	0.15	1.02	(0.36, 0.47)
	Dienoico	C 18:1 ^{9 y 11}	22	50	39.35	139.48	1.67	30.91	0.27	97.34	(35.99, 42.70)
		C 18:2 ^{9 12}	20	50	0.21	0.01	0.01	0.21	0.06	0.51	(0.19, 0.23)
	Hidroxiácidos	C 14:0 2-OH	11	50	1.95	0.80	0.13	1.69	0.66	4.72	(1.70, 2.21)
C 14:0 3-OH		12	50	10.65	23.69	0.69	10.01	0.07	24.62	(9.27, 12.03)	
Ciclopropanos (0.27 %)	C 17:0 Δ	17	50	0.42	0.09	0.04	0.39	0.10	2.02	(0.34, 0.51)	
	C 19:0 Δ	24	*	*	*	*	*	*	*	*	

n = tamaño de muestra / * = ausencia de ácido graso en la especie

K. pneumoniae ATCC 13882

Clasificación de ácidos grasos	Ácido graso		n	Media		Error		Intervalo de confianza			
	Ácido graso	Pico		aritmética	Varianza	estándar	Mediana	Mínimo	Máximo	de la media al 95%	
Saturados (18.12 %)	C 12:0	3	54	1.25	0.76	0.12	1.09	0.41	5.88	(1.01, 1.49)	
	C 14:0	7	54	20.41	41.87	0.88	20.58	10.68	46.16	(18.64, 22.17)	
	C 15:0	10	54	4.02	1.84	0.18	3.66	2.12	7.52	(3.65, 4.38)	
	C 17:0	18	54	2.86	0.56	0.10	3.07	0.00	3.88	(2.65, 3.06)	
	C 18:0	23	54	1.91	0.84	0.12	1.90	0.00	4.12	(1.66, 2.16)	
Insaturados (43.52 %)	Monoenoicos	C 16:1 ⁹	14	54	29.03	82.00	1.23	28.62	16.29	56.16	(26.56, 31.50)
		C 18:1 ⁹	21	*	*	*	*	*	*	*	*
	Dienoico	C 18:1 ^{9 y 11}	22	54	32.25	63.49	1.08	33.38	16.52	44.10	(30.07, 34.42)
		C 18:2 ^{9 12}	20	*	*	*	*	*	*	*	*
	Hidroxiácidos	C 14:0 2-OH	11	54	1.56	2.43	0.21	0.95	0.00	6.16	(1.13, 1.98)
C 14:0 3-OH		12	54	10.30	83.90	1.25	8.35	0.51	46.12	(7.80, 12.80)	
Ciclopropanos (38.36 %)	C 17:0 Δ	17	54	45.73	64.13	1.09	46.20	0.00	54.97	(43.54, 47.91)	
	C 19:0 Δ	24	54	18.74	17.87	0.58	18.55	9.25	26.99	(17.59, 19.90)	

n = tamaño de muestra / * = ausencia de ácidos grasos en la especie

***K. oxytoca* ATCC 13182**

Clasificación de		Media			Error			Intervalo de confianza			
ácidos grasos	Ácido graso	Pico	n	aritmética	Varianza	estándar	Mediana	Mínimo	Máximo	de la media al 95 %	
Saturados (13.06 %)	C 12:0	3	61	2.34	3.67	0.25	1.67	0.56	8.26	(1.85, 2.83)	
	C 14:0	7	61	6.55	1.24	0.14	6.40	4.89	10.77	(6.27, 6.84)	
	C 15:0	10	61	2.88	0.11	0.04	2.83	2.41	4.49	(2.80, 2.97)	
	C 17:0	18	61	3.19	0.16	0.05	3.20	1.51	4.98	(3.09, 3.29)	
	C 18:0	23	61	3.45	2.55	0.20	2.93	1.72	7.67	(3.04, 3.86)	
Insaturados (33.72 %)	Monoenoicos	C 16:1 ⁹	14	61	15.56	9.18	0.39	15.02	11.01	21.99	(14.78, 6.33)
		C 18:1 ⁹	21	*	*	*	*	*	*	*	*
	Dienoico	C 18:1 ^{9 y 11}	22	61	30.27	11.44	0.43	30.03	22.65	38.10	(29.41, 31.14)
		C 18:2 ^{9,12}	20	*	*	*	*	*	*	*	*
	Hidroxiácidos	C 14:0 2-OH	11	*	*	*	*	*	*	*	*
		C 14:0 3-OH	12	61	1.72	0.92	0.12	1.60	0.45	5.55	(1.47, 1.96)
Ciclopropanos (53.22 %)	C 17:0 Δ	17	61	55.81	55.07	0.95	54.47	41.38	88.31	(53.91, 57.71)	
	C 19:0 Δ	24	61	19.24	12.45	0.45	18.55	9.86	29.71	(18.33, 20.14)	

n - tamaño de muestra / * = ausencia de ácidos grasos en la especie

***K. planticola* ATCC 33631**

Clasificación de		Media			Error			Intervalo de confianza			
ácidos grasos	Ácido graso	Pico	n	aritmética	Varianza	estándar	Mediana	Mínimo	Máximo	de la media al 95 %	
Saturados (15.01 %)	C 12:0	3	53	2.97	1.69	0.18	2.44	1.49	7.13	(2.61, 3.32)	
	C 14:0	7	53	11.70	7.24	0.37	11.22	8.19	19.10	(10.96, 12.44)	
	C 15:0	10	53	3.94	1.04	0.14	3.76	2.60	7.16	(3.66, 4.22)	
	C 17:0	18	53	5.12	1.29	0.16	5.05	3.65	8.36	(4.81, 5.44)	
	C 18:0	23	53	2.18	0.18	0.06	2.06	1.12	3.48	(2.06, 2.29)	
Insaturados (64.09 %)	Monoenoicos	C 16:1 ⁹	14	53	45.57	31.45	0.77	45.03	31.98	64.03	(44.02, 47.11)
		C 18:1 ⁹	21	*	*	*	*	*	*	*	*
	Dienoico	C 18:1 ^{9 y 11}	22	53	59.36	55.55	1.02	61.02	33.67	73.50	(57.30, 61.41)
		C 18:2 ^{9,12}	20	*	*	*	*	*	*	*	*
	Hidroxiácidos	C 14:0 2-OH	11	*	*	*	*	*	*	*	*
		C 14:0 3-OH	12	53	6.01	11.87	0.47	5.13	2.23	17.55	(5.06, 6.96)
Ciclopropanos (20.90 %)	C 17:0 Δ	17	53	34.43	55.96	1.03	32.11	23.91	60.54	(32.37, 36.49)	
	C 19:0 Δ	24	53	1.82	0.33	0.08	1.65	1.16	3.84	(1.67, 1.98)	

n - tamaño de muestra / * = ausencia de ácidos grasos en la especie

K. rhinoscleromatis ATCC 1884

Clasificación de		Ácido graso	Pico	n	Media		Error			Intervalo de confianza de la media al 95%	
ácidos grasos					aritmética	Varianza	estándar	Mediana	Mínimo		Máximo
Saturados (13.36 %)		C 12:0	3	50	3.19	2.42	0.22	3.08	0.98	8.23	(2.75, 3.63)
		C 14:0	7	50	10.37	5.79	0.34	10.06	7.02	18.74	(9.68, 11.05)
		C 15:0	10	50	2.50	0.13	0.05	2.49	1.85	3.82	(2.40, 2.61)
		C 17:0	18	50	3.48	0.26	0.07	3.41	2.17	5.57	(3.34, 3.63)
		C 18:0	23	50	2.25	0.09	0.04	2.21	1.82	3.63	(2.17, 2.34)
Insaturados (64.93 %)	Monoenoicos	C 16:1 ⁹	14	50	42.71	49.80	1.00	42.11	33.14	75.59	(40.70, 44.71)
		C 18:1 ⁹	21	*	*	*	*	*	*	*	*
	Dienoico	C 18:1 ^{9 y 11}	22	50	58.81	87.75	1.32	6.40	15.79	71.18	(56.14, 61.47)
		C 18:2 ^{9,12}	20	50	0.17	0.00	0.00	0.17	0.13	0.29	(0.16, 0.18)
	Hidroxiácidos	C 14:0 2-OH	11	*	*	*	*	*	*	*	*
Ciclopropanos (21.71 %)		C 14:0 3-OH	12	50	4.25	4.50	0.30	3.75	1.86	12.49	(3.65, 4.85)
		C 17:0 Δ	17	50	33.54	16.20	0.57	33.02	22.16	48.74	(32.39, 34.68)
		C 19:0 Δ	24	50	1.88	0.07	0.04	1.84	1.30	2.48	(1.81, 1.96)

n = tamaño de muestra / * = ausencia de ácidos grasos en la especie

Tabla 7 Distribución de grupos de ácidos grasos identificados en las diferentes especies tipo de *Klebsiella* analizadas.

Especies	Ácidos grasos*		
	Saturados	Insaturados	Ciclopropanos
<i>K. ozaenae</i>	23.5	76.3	0.3
<i>K. pneumoniae</i>	18.1	43.5	38.4
<i>K. oxytoca</i>	13.1	33.7	53.2
<i>K. planticola</i>	15.0	64.0	21.0
<i>K. rhinoscleromatis</i>	13.4	65.0	22.0

* Expresados en porcentajes

Tabla 7 A. Distribución de áreas y porcentajes¹ de ácidos grasos insaturados identificados en las diferentes especies tipo de *Klebsiella* analizadas.

Especies	Insaturados											
	monoenoicos						dienoico		hidroxiácidos			
	C16:1 ⁹		C18:1 ⁹		C18:1 ¹¹ cis		C18:2 ^{9,12}		C14:0 2OH		C14:0 3OH	
área	%	área	%	área	%	área	%	área	%	área	%	
<i>K. ozaenae</i>	66.37	55.80	0.42	0.35	39.35	33.08	0.21	0.18	1.95	1.64	10.65	8.95
<i>K. pneumoniae</i>	29.03	39.73	*	-	32.25	44.09	*	-	1.56	2.10	10.30	14.08
<i>K. oxytoca</i>	15.56	32.7	*	-	30.27	63.7	*	-	*	-	1.72	3.61
<i>K. planticola</i>	45.57	41.08	*	-	59.36	53.5	*	-	*	-	6.01	5.42
<i>K. rhinoscleromatis</i>	42.71	40.32	*	-	58.81	55.51	0.17	0.16	*	-	4.25	4.01

¹Tomando como 100% la suma de las áreas de los insaturados

* Ausencia

Tabla 9. Matriz de varianzas-covarianzas de las áreas normalizadas de los ácidos grasos comunes a las especies de *Klebsiella*

	Saturados					Insaturados			Ciclopropano C17:0Δ
	C12:0	C14:0	C15:0	C17:0	C18:0	hidroxiácidos	monoénicos		
						C14:0 3-OH	C16:1 ⁹	C18:1 ⁹ trans C18:1 ¹¹ cis	
C12:0	1.78689	2.26057	0.09967	0.04169	0.35412	2.54973	1.10771	-0.23902	-0.73785
C14:0	2.26057	21.17541	0.60156	-0.18250	-0.00045	17.5327	6.15210	2.64023	4.58068
C15:0	0.09967	0.60156	0.84316	0.43106	-0.13251	0.87101	3.11931	1.15892	1.37194
C17:0	0.04169	-0.18250	0.43106	0.54604	0.10459	-0.50801	1.24263	1.07851	1.16269
C18:0	0.35412	-0.00045	-0.13251	0.10459	0.83432	-0.52199	-0.01890	0.65196	-0.79258
C14:0 3-OH	2.54973	17.5327	0.87101	24.7176	8.30874	3.82953	-0.50801	0.08170	-0.52199
C16:1 ⁹	1.10771	6.15210	3.11931	1.24263	-0.01890	8.30874	66.6726	6.85836	5.59088
C18:1 ⁹ trans C18:1 ¹¹ cis	-0.23902	2.64023	1.15892	1.07851	0.65196	0.08170	6.85836	68.7221	-1.81849
C17:0Δ	-0.73785	4.58068	1.37194	1.16269	-0.79258	3.82953	5.59088	-1.81849	39.5848

Tabla 10 Valores de los coeficientes no estandarizados para las 4 funciones discriminantes

		1	2	3	4
Saturados	C12:0	-0.24652	0.28999	-0.20348	-0.14469
	C14:0	0.17480	-0.14198	0.06522	-0.07184
	C15:0	-0.07901	-0.93460	0.28114	-0.06084
	C17:0	0.13065	1.16006	0.93415	0.88566
	C18:0	-0.16334	-0.40488	-0.32519	0.50730
Insaturados	hidroxiácido				
	C14:0 3OH	-0.07359	0.09125	0.06955	0.03105
	m				
	C 16 1 ⁹	0.06102	0.03839	-0.0463	0.00575
monocíclico	C18:1 ⁹ trans	-0.00956	0.07002	0.00039	-0.07333
	C18:1 ¹¹ cis				
Ciclopropano	C17:0Δ	-0.13152	-0.02305	0.00062	-0.05439
Constante		1.18163	-2.62582	-2.84246	2.10174

Tabla 11 Análisis discriminante para las cinco especies

Función discriminante	Eigenvalor	Porcentaje de varianza acumulado	Correlación canónica
1	21.555986	71.78	0.97758
2	7.353846	24.49	0.93824
3	0.778732	2.59	0.66167
4	0.343942	1.15	0.50589

Tabla 12 Valor de los centroides para cada una de las cinco especies

Especie	Grupo centroide	Función 1	Función 2
<i>K. ozaenae</i>	1	8.69619	-1.40284
<i>K. pneumoniae</i>	2	-1.12431	-3.11534
<i>K. oxytoca</i>	3	-5.43105	-1.68212
<i>K. planticola</i>	4	-0.25794	3.61565
<i>K. rhinoscleromatis</i>	5	-0.58265	2.98701

Tabla. 13. Áreas normalizadas de los ácidos grasos (%) respecto al ácido graso de mayor concentración (C 16:0) en un aislamiento ambiental (agua) de *Klebsiella pneumoniae* (087380).

Tamaño de Muestra n=30	C12:0	C14:0	C15:0	C14:0	C14:0	C16:1 ⁹	C16:0	C17:0	C17:0	C18:1 ⁹	C18:0	C19:0
				2-OH	3-OH			cis 9,10		C18:1 ¹¹		cis 9,10
	AN 3	AN 7	AN 10	AN 11	AN 12	AN 14	AN 15	AN 17	AN 18	AN 22	AN 23	AN 24
1	0.60	12.49	2.58	0.65	9.08	35.68	100	34.77	4 15	69.25	4.84	17 60
2	0.32	14.62	2.75	1.18	9.69	33.50	100	36.40	5.70	63.71	5.43	15.93
3	0.41	12.86	2.72	0.73	9 16	35.59	100	34.63	4.02	68.83	5.09	17.45
4	0.54	7.48	3.10	0 45	5.44	33.76	100	36.01	4.26	66.75	3.26	18.29
5	0.57	16.02	3.28	1.01	10.56	36 11	100	34.88	4.72	66.63	5.16	16.83
6	0.49	10.26	4.65	0.46	5.09	29.08	100	43.40	6.49	56 30	3.57	21.45
7	0.50	15.02	3.46	1.20	10.83	38.99	100	35.42	5 20	66.69	4.65	17.05
8	0.69	14.56	2.69	1.24	10.25	33.51	100	35.43	4.12	66.48	7.72	17.91
9	0.53	15.40	4.12	1.56	10.92	32.18	100	32.89	5.74	67.79	4.92	19.16
10	0.39	9.40	3.97	0.50	5.59	29.44	100	43.61	6.06	60.60	3.29	21.74
11	0.47	12.93	2.70	1.16	9.41	33.09	100	37.63	5 17	63.68	5.47	18.16
12	0.99	9.67	4.11	1.75	5.73	29.18	100	42.77	5.95	58.39	8.96	20.28
13	0.77	15.01	2.83	1.52	9.58	33.47	100	36.24	4.31	61.29	5 18	17.71
14	0.56	10.52	3.48	0.31	5.18	33.28	100	37.50	4 70	63.77	3.09	18.68
15	0.52	14.66	3.19	1.23	9.94	35.95	100	35.55	4.71	67.68	4.52	17.41
16	0.56	15.20	4.00	1.45	10.30	31.94	100	40.23	5.87	64.99	4.83	20 92
17	0.69	14.85	3.74	1.38	11.02	34 18	100	38.05	5 69	66 07	5 18	18 84
18	0.58	11.39	3.08	0.61	6.22	34 65	100	36.26	5.00	62 46	2.87	17.47
19	0.48	10.66	3.50	1.42	4.98	32 53	100	36.93	4.60	60.85	2.91	17.38
20	0.93	10.99	3.57	0.56	5.15	33 02	100	36.75	4.56	60 59	2.87	17.25
21	1.02	10.86	2.94	0.86	4.70	33.67	100	35.89	3 82	59.50	2.68	16.67
22	0.41	10.18	3.41	1.02	7.73	27.23	100	44 52	4.82	54 66	3.75	22.42
23	0.43	9.58	3 80	0.71	6 15	30 78	100	43.04	5.92	64.61	3.32	22.04
24	0.42	8.62	3.67	0.52	4.96	31.21	100	42.74	6 17	66.12	4.26	22.44
25	0.33	8.68	3.45	0 32	3.57	19 02	100	48.27	5.50	41 51	3 76	27.77
26	0.48	9 23	3.60	0.60	4.70	20.11	100	50 21	5.86	43.15	3 55	28.67
27	0 34	10.10	3.95	0.64	6.04	26.46	100	44.41	5 11	53.53	3.58	22.59
28	1.31	11.60	3.65	1.36	4.97	33.20	100	35.79	4 39	56 83	2 57	15 16
29	2.00	9.95	3 35	2.24	7.29	26.04	100	45.97	4 96	52 61	9.09	23.80
30	0.77	9.12	3.71	1 51	4.78	20 08	100	49 89	5 90	42 69	3 80	27 77

Tabla 14. Áreas normalizadas de los ácidos grasos (%) respecto al ácido graso de mayor concentración (C 16:0) en un aislamiento ambiental (aire) de *Klebsiella pneumoniae* (O89711).

Tamaño de Muestra n=30	C12:0	C14:0	C15:0	C14:0	C14:0	C16:1 ⁹	C16:0	C17:0	C17:0	C18:1 ⁹	C18:0	C19:0
				2-OH	3-OH			cis 9,10		C18:1 ¹¹		cis 9,10
	AN 3	AN 7	AN 10	AN 11	AN 12	AN 14	AN 15	AN 17	AN 18	AN 22	AN 23	AN 24
1	0.62	12.77	3.29	1.08	7.21	25.05	100	46.57	4.72	46.26	3.59	24.05
2	0.81	12.95	2.94	1.06	8.21	26.44	100	46.40	4.50	52.29	4.32	25.32
3	1.49	9.17	2.93	1.85	5.18	24.44	100	45.23	4.59	51.29	4.04	24.79
4	0.70	13.30	2.84	1.24	10.11	25.36	100	48.11	4.53	52.47	4.08	45.91
5	0.60	11.57	3.15	0.86	6.96	27.17	100	45.83	4.90	56.48	4.26	25.23
6	0.74	12.63	3.31	1.05	8.87	26.78	100	49.72	5.19	51.18	4.52	29.32
7	0.91	9.41	0.94	3.99	5.31	24.38	100	47.25	6.36	48.85	3.81	24.34
8	1.11	9.71	3.42	3.60	6.10	24.94	100	45.74	5.10	50.20	3.92	24.26
9	0.66	12.11	3.41	0.82	7.36	24.63	100	49.37	5.47	51.01	3.65	27.77
10	0.93	6.69	0.32	4.08	6.15	23.77	100	46.53	5.73	45.10	4.22	22.54
11	0.65	12.64	3.01	1.04	8.38	26.16	100	48.59	4.86	55.25	4.18	28.26
12	0.91	9.33	2.56	1.83	4.73	24.22	100	45.38	4.57	51.73	3.93	25.26
13	1.87	9.79	6.08	3.01	5.85	23.14	100	47.73	4.90	49.23	3.83	24.66
14	0.66	11.43	3.64	1.99	5.63	25.18	100	46.44	5.45	52.13	3.87	23.35
15	0.62	10.16	3.09	1.47	5.05	22.58	100	48.13	4.97	46.31	3.71	25.66
16	1.86	14.03	2.69	1.52	9.07	23.38	100	47.65	4.92	48.88	4.16	26.45
17	1.80	9.55	4.10	0.00	4.13	24.15	100	46.56	6.32	46.43	3.58	24.13
18	0.61	13.86	2.84	0.86	9.89	24.24	100	41.53	4.41	55.50	3.67	19.54
19	1.88	15.04	2.78	1.27	10.29	27.16	100	43.60	4.21	48.89	3.86	20.66
20	0.54	13.52	2.81	0.00	8.80	31.22	100	40.92	4.46	57.68	3.70	18.58
21	0.64	12.09	2.84	0.85	9.05	30.43	100	43.36	4.72	60.91	4.06	20.60
22	0.37	12.17	2.81	0.82	8.89	27.93	100	44.97	4.70	55.50	3.82	23.11
23	1.00	12.93	2.73	1.12	10.32	27.46	100	45.07	4.85	56.94	4.85	17.35
24	0.81	14.43	1.03	1.10	8.48	31.81	100	99.56	8.81	51.69	4.74	22.51
25	0.76	11.73	2.08	2.77	7.15	27.45	100	44.38	5.79	56.08	5.33	27.42
26	1.41	13.04	3.20	0.77	8.26	27.31	100	43.97	5.08	55.93	4.31	23.02
27	1.24	13.26	2.70	0.00	8.90	26.15	100	46.44	4.62	4.81	4.81	25.04
28	1.12	12.76	2.49	0.00	8.91	26.27	100	46.64	1.43	54.44	4.47	24.79
29	2.02	13.69	3.06	0.00	7.54	26.13	100	42.11	4.71	47.76	4.14	19.52
30	2.38	15.78	3.27	0.00	9.34	26.68	100	43.79	5.53	58.04	4.10	23.02

un aislamiento ambiental (agua) de *Klebsiella pneumoniae* (087685).

Tamaño de Muestra n = 32	C12:0	C14:0	C15:0	C14:0 2-OH	C14:0 3-OH	C16:1 ⁹	C16:0	C17:0 cis 9,10	C17:0	C18:1 ⁹	C18:0	C18:1 ¹¹	C19:0 cis 9,10
	AN 3	AN 7	AN 10	AN 11	AN 12	AN 14	AN 15	AN 17	AN 18	AN 22	AN 23	AN 24	AN 24
1	2.02	17.69	3.61	1.22	13.02	36.23	100	41.59	5.43	70.64	7.19		20.48
2	1.22	16.76	3.40	2.00	13.71	31.74	100	46.57	5.62	67.70	2.97		24.85
3	1.92	16.48	3.56	0.00	11.28	34.66	100	41.91	4.98	65.29	3.49		19.46
4	1.59	16.04	1.17	4.49	10.59	34.39	100	43.71	5.93	70.34	4.16		22.07
5	1.55	17.15	3.47	1.50	13.12	35.27	100	43.16	5.31	72.55	3.41		22.19
6	2.97	16.65	2.82	0.00	10.05	34.15	100	42.36	5.49	67.25	4.28		20.72
7	1.03	12.83	3.60	1.23	10.02	32.24	100	45.57	6.00	61.67	4.14		25.48
8	0.60	10.52	2.16	0.30	4.59	45.66	100	24.48	3.62	90.08	3.23		10.38
9	0.59	10.39	2.88	0.39	5.92	40.06	100	33.44	5.42	81.64	3.26		15.49
10	0.63	10.47	2.14	0.26	4.00	45.04	100	24.37	3.64	89.71	3.37		10.49
11	0.52	10.27	3.45	0.67	8.52	33.24	100	45.70	5.61	71.52	2.53		23.98
12	0.52	10.27	3.45	0.67	8.52	33.24	100	45.70	5.61	71.52	3.26		23.98
13	1.61	16.02	3.50	1.51	11.45	34.79	100	42.99	5.40	72.10	3.84		21.60
14	0.55	10.54	2.92	0.48	6.05	39.27	100	33.24	5.02	77.77	3.23		15.11
15	1.28	17.94	2.94	1.66	11.35	35.86	100	35.16	4.35	71.69	2.88		14.98
16	1.31	17.82	3.05	2.38	15.14	33.23	100	45.01	5.10	71.36	2.91		23.57
17	1.76	20.15	3.48	1.88	13.79	35.63	100	40.74	4.93	66.50	2.57		18.71
18	3.46	17.49	2.36	0.00	12.75	33.69	100	36.99	4.50	64.65	3.28		16.85
19	1.36	17.72	2.28	1.64	10.72	41.28	100	29.66	3.79	77.30	2.89		12.56
20	0.78	14.82	1.88	2.26	8.77	36.19	100	34.20	5.10	77.23	3.50		15.96
21	0.85	15.11	1.91	2.24	8.82	36.60	100	33.83	5.00	73.13	3.63		15.25
22	1.25	20.23	3.40	2.49	15.01	33.18	100	42.84	5.66	60.21	2.63		19.12
23	0.98	19.12	2.50	1.75	10.99	35.49	100	35.21	3.98	65.15	2.95		16.10
24	0.96	16.66	2.25	1.26	9.92	38.40	100	31.83	3.90	71.89	3.01		13.89
25	0.93	16.70	3.40	2.16	15.87	33.96	100	40.29	5.04	67.08	2.88		19.55
26	0.86	17.89	3.43	2.11	12.36	33.02	100	44.42	5.31	65.08	2.90		21.66
27	1.12	18.34	2.36	1.57	10.66	41.56	100	30.54	4.29	79.94	3.16		12.89
28	1.07	18.67	3.55	2.38	16.14	35.81	100	41.24	4.99	64.69	2.25		18.41
29	1.02	15.80	3.69	1.55	11.29	34.84	100	42.98	5.51	70.53	4.02		21.43
30	0.47	9.89	3.38	0.55	6.71	32.32	100	37.51	5.53	70.40	30.00		23.40
31	0.58	10.64	2.30	0.47	5.32	73.19	100	35.69	4.04	66.97	3.16		15.64
32	0.82	14.96	2.34	1.56	10.82	35.44	100	35.28	4.13	69.01	3.23		16.50

Tabla 16. Áreas normalizadas de los ácidos grasos (%) respecto al ácido graso de mayor concentración (C 16:0) en un aislamiento clínico de *Klebsiella oxytoca*.

Tamaño de Muestra n = 31	C12:0 AN 3	C14:0 AN 7	C15:0 AN 10	C14:0 3-OH AN 12	C16:1 ⁹ AN 14	C16:0 AN 15	C17:0 cis 9,10 AN 17	C17:0 AN 18	C18:1 ⁹ C18:1 ¹¹ AN 22	C18:0 AN 23	C19:0 cis 9,10 AN24
1	0.71	15.52	3.05	9.22	15.12	100	71.12	2.91	39.13	2.17	7.20
2	0.94	15.74	2.98	12.61	16.92	100	69.63	3.00	39.25	2.30	0.92
3	1.00	15.64	3.05	13.73	14.98	100	71.23	2.99	37.91	2.01	7.48
4	6.70	16.58	3.02	13.66	17.19	100	70.69	2.68	40.70	1.89	6.60
5	1.01	13.13	2.76	9.02	16.42	100	69.00	2.66	40.50	1.73	6.39
6	0.79	13.81	2.67	7.40	17.42	100	68.56	2.80	40.87	2.13	6.11
7	3.18	13.64	4.68	8.34	9.15	100	60.00	4.63	35.92	3.68	30.62
8	0.94	17.27	2.96	15.90	16.87	100	70.46	2.73	39.41	1.72	6.60
9	0.91	15.36	2.99	13.04	16.98	100	70.19	2.85	40.94	1.73	6.84
10	5.22	13.83	2.88	10.89	17.13	100	68.73	2.63	40.97	1.91	6.16
11	5.14	14.57	2.83	11.94	16.37	100	70.27	2.81	40.24	1.72	6.69
12	0.93	12.02	2.94	7.84	14.99	100	69.30	2.94	39.10	1.86	7.25
13	2.51	18.93	4.02	13.65	20.18	100	51.25	4.18	45.79	2.64	21.44
14	1.27	16.70	3.61	16.19	25.41	100	48.81	5.32	55.00	3.13	21.45
15	1.28	18.13	3.15	14.57	16.75	100	70.76	2.85	38.20	2.13	6.92
16	4.02	12.29	3.94	9.50	9.81	100	85.02	4.04	29.66	5.12	0.84
17	4.12	10.66	3.13	7.32	8.99	100	73.83	3.33	26.28	4.58	0.68
18	1.30	10.61	3.13	6.86	5.06	100	73.92	3.32	26.00	3.89	0.74
19	1.40	10.83	3.38	8.72	8.49	100	69.82	3.51	24.71	4.53	0.64
20	1.32	10.70	3.37	7.73	8.12	100	73.92	3.48	23.77	4.39	0.75
21	1.17	7.30	2.23	6.55	12.68	100	72.40	3.65	47.52	3.29	1.12
22	0.61	6.12	2.18	5.27	13.48	100	69.12	3.65	49.64	3.35	1.11
23	1.26	7.19	4.58	5.91	12.46	100	61.98	3.24	44.13	3.18	0.93
24	2.60	6.73	2.15	5.56	12.54	100	69.73	3.85	46.75	3.29	2.73
25	0.93	5.04	1.50	3.36	11.03	100	45.87	2.71	31.88	4.98	0.71
26	0.83	5.85	2.04	6.55	10.01	100	56.45	3.05	37.07	2.73	0.93
27	1.32	10.72	3.45	8.66	6.80	100	71.40	3.33	18.57	3.85	0.64
28	1.60	11.28	3.25	9.09	9.02	100	72.51	3.34	24.21	4.31	0.49
29	1.00	6.23	2.39	5.11	10.21	100	72.36	4.25	42.69	3.32	1.10
30	1.14	6.81	2.46	5.49	10.18	100	72.94	4.23	42.12	3.35	1.16
31	1.24	10.89	3.19	7.86	10.03	100	73.10	3.39	27.17	4.23	0.53

ambiental (aire) de *Klebsiella oxytoca* (097806).

Tamaño de Muestra n=33	C 12:0 AN3	C 14:0 AN7	C 15:0 AN10	C 14:0 3-OH AN12	C 16:1 ⁹ AN14	C 16:0 AN15	C 17:0 cis 9,10 AN17	C 17:0 AN18	C 18:1 ⁹ C 18:1 ¹¹ AN22	C 18:0 AN23	C 19:0 cis 9,10 AN24
1	2.25	12.29	2.86	10.23	21.02	100	64.44	3.69	44.04	2.07	6.41
2	2.02	12.15	3.66	9.89	20.20	100	66.66	4.65	43.36	2.29	7.95
3	2.02	12.56	3.54	9.82	20.73	100	63.83	4.34	41.96	2.17	6.90
4	2.18	12.58	3.54	7.33	19.67	100	65.04	4.35	42.55	2.31	10.45
5	1.90	10.86	2.85	8.81	19.02	100	67.77	4.13	44.52	2.18	7.66
6	2.18	12.58	3.54	7.33	19.67	100	65.04	4.35	42.55	2.31	10.45
7	1.98	11.21	3.31	7.10	18.04	100	66.42	4.39	42.29	2.21	8.11
8	2.50	12.97	3.23	9.21	19.34	100	66.38	4.02	41.31	1.97	7.32
9	3.63	16.37	3.75	8.52	20.89	100	56.14	3.28	28.29	1.30	3.68
10	1.58	10.57	3.18	7.86	19.13	100	70.31	4.70	46.59	2.40	8.92
11	2.17	11.97	3.51	7.46	17.93	100	66.95	4.65	39.56	2.22	9.19
12	1.82	11.37	3.30	7.17	18.87	100	66.86	4.53	43.52	2.35	8.30
13	2.02	12.46	3.59	7.15	19.96	100	65.01	4.49	41.14	2.22	7.15
14	1.06	9.87	3.03	5.92	19.16	100	67.15	4.44	46.85	2.41	7.94
15	1.51	11.19	3.18	7.15	19.43	100	67.27	4.29	46.42	2.27	8.59
16	1.75	11.87	3.14	7.94	21.09	100	65.08	3.76	44.71	2.08	6.89
17	2.26	14.24	2.96	12.67	22.01	100	63.47	3.21	47.89	2.36	7.95
18	2.64	14.60	2.87	15.53	21.73	100	79.96	3.36	44.13	2.51	6.47
19	2.67	14.24	3.37	10.97	22.36	100	64.50	3.37	45.19	2.28	6.82
20	2.64	14.49	2.82	16.47	23.15	100	66.70	3.03	49.29	1.93	5.48
21	1.49	12.24	3.14	11.25	20.12	100	65.97	3.18	48.01	2.35	5.67
22	2.13	12.85	2.26	10.68	22.64	100	65.77	2.99	49.53	2.51	5.61
23	2.29	14.01	2.85	15.57	21.02	100	64.38	2.80	42.15	4.35	5.27
24	2.40	14.49	3.03	12.05	22.88	100	61.89	2.87	44.04	4.35	5.25
25	2.26	13.51	2.53	11.43	23.08	100	66.04	2.63	49.57	2.02	5.24
26	2.45	14.16	3.01	10.03	23.12	100	65.58	2.79	51.26	2.25	6.94
27	2.57	14.32	2.69	10.36	21.45	100	65.08	3.01	44.32	2.58	6.17
28	2.04	12.78	2.82	9.23	20.59	100	67.23	3.25	48.41	2.38	6.09
29	2.25	13.70	2.56	11.42	22.13	100	67.01	3.02	49.17	2.29	5.69
30	2.08	12.68	3.24	10.32	22.66	100	64.49	3.24	47.65	2.24	5.40
31	1.23	12.93	3.00	9.33	22.80	100	55.14	5.75	48.74	3.94	21.95
32	2.08	13.78	3.02	10.97	23.87	100	62.90	3.31	46.99	2.59	8.44
33	1.22	12.74	2.22	8.92	22.66	100	56.76	6.11	52.68	4.17	24.08

K. pneumoniae 087380 (aislamiento ambiental de agua) sp6

Clasificación de					Media		Error			Intervalo de confianza	
ácidos grasos		Ácido graso	Pico	n	aritmética	Varianza	estándar	Mediana	Mínimo	Máximo	de la media al 95%
Saturados (13.73%)		C 12:0	3	30	0.64	0.12	0.06	0.54	0.32	2	(0.52, 0.76)
		C 14:0	7	30	11.73	6.29	0.46	10.93	7.48	16.02	(10.83, 12.63)
		C 15:0	10	30	3.44	0.26	0.09	3.47	0.258	4.65	(3.26, 3.62)
		C 17:0	18	30	5.12	0.56	0.14	5.06	3.82	6.49	(4.85, 5.39)
		C 18:0	23	30	4.47	2.79	0.31	4.03	2.57	9.09	(3.87, 5.07)
Insaturados (54.14)	Monoenoicos	C 16:1 ⁹	14	30	31.23	23.66	0.89	33.06	19.02	38.99	(29.49, 33.29)
		C 18:1 ⁹	21	*	*	*	*	*	*	*	*
	Dienoico	C 18:1 ^{9 y 11}	22	30	60.60	58.51	1.40	63.08	41.51	69.25	(57.86, 63.34)
		C 18:2 ^{9,12}	20	*	*	*	*	*	*	*	*
		C 14:0 2-OH	11	30	1.01	0.23	0.09	1.02	0.31	2.24	(0.84, 1.18)
Hidroxiácidos	C 14:0 3-OH	12	30	7.30	6.00	0.45	6.19	3.57	11.02	(6.42, 8.18)	
	C 17:0 Δ	17	30	39.54	24.50	0.90	37.22	32.89	50.21	(3.77, 41.31)	
Ciclopropanos (32.13%)		C 19:0 Δ	24	30	19.89	12.69	0.65	18.49	15.16	28.67	(18.62, 21.16)

n = tamaño de muestra / * = ausencia de ácidos grasos en la especie

K. pneumoniae 089711 (aislamiento ambiental del aire) sp7

Clasificación de					Media		Error			Intervalo de confianza	
ácidos grasos		Ácido graso	Pico	n	aritmética	Varianza	estándar	Mediana	Mínimo	Máximo	de la media al 95%
Saturados (13.80%)		C 12:0	3	30	1.06	0.28	0.10	0.86	0.37	2.38	(0.87, 1.25)
		C 14:0	7	30	12.05	4.15	0.37	12.64	6.79	15.78	(11.32, 12.78)
		C 15:0	10	30	2.88	0.98	0.18	2.89	0.32	6.08	(2.53, 3.23)
		C 17:0	18	30	5.01	1.22	0.20	4.88	1.43	8.81	(4.61, 5.41)
		C 18:0	23	30	4.12	0.18	0.08	4.07	3.58	5.33	(3.97, 4.27)
Insaturados (46.58)	Monoenoicos	C 16:1 ⁹	14	30	25.17	21.20	0.84	25.75	3.43	31.81	(23.52, 26.82)
		C 18:1 ⁹	21	*	*	*	*	*	*	*	*
	Dienoico	C 18:1 ^{9 y 11}	22	30	50.64	91.11	1.74	51.71	4.81	60.19	(47.22, 54.06)
		C 18:2 ^{9,12}	20	*	*	*	*	*	*	*	*
		C 14:0 2-OH	11	30	1.34	1.32	0.21	1.07	0	4.08	(0.93, 1.75)
Hidroxiácidos	C 14:0 3-OH	12	30	7.67	3.23	0.33	8.24	4.13	10.32	(7.03, 8.31)	
	C 17:0 Δ	17	30	47.59	101.09	1.84	46.42	40.92	99.56	(43.99, 51.19)	
Ciclopropanos (39.62%)		C 19:0 Δ	24	30	24.55	24.27	0.90	24.30	17.35	45.91	(22.79, 26.31)

n = tamaño de muestra / * = ausencia de ácidos grasos en la especie

Clasificación de ácidos grasos		Ácido graso	Pico	n	Media		Error			Intervalo de confianza	
					aritmética	Varianza	estándar	Mediana	Mínimo	Máximo	de la media al 95%
Saturados (13.88)		C 12:0	3	32	1.19	0.46	0.12	1.03	0.47	3.46	(0.96, 1.42)
		C 14:0	7	32	15.38	10.78	0.58	16.57	9.89	20.23	(14.24, 16.52)
		C 15:0	10	32	2.89	0.44	0.12	3.00	1.17	3.69	(2.66, 3.12)
		C 17:0	18	32	4.94	0.49	0.12	5.07	3.62	6.00	(4.70, 5.18)
		C 18:0	23	32	4.19	22.90	0.85	3.23	2.25	30.00	(2.53, 5.85)
Insaturados (58.49)	Monoenoicos	C 16:1 ⁹	14	32	37.18	55.26	1.31	35.36	31.74	73.19	(34.60, 39.76)
		C 18:1 ⁹	21	*	*	*	*	*	*	*	*
		C 18:1 ^{9 y 11}	22	32	71.33	48.57	1.23	70.59	60.21	90.08	(68.92, 73.74)
	Dienoico	C 18:2 ^{9,12}	20	*	*	*	*	*	*	*	*
		Hidroxiácidos	C 14:0 2-OH	11	32	1.39	0.94	0.17	1.53	0..	4.49
	C 14:0 3-OH		12	32	10.54	10.39	0.57	10.77	4.00	16.14	(9.42, 11.66)
Ciclopropanos (27.63%)		C 17:0 Δ	17	32	38.38	37.90	1.09	40.52	24.37	46.57	(36.25, 40.51)
		C 19:0 Δ	24	32	18.52	17.85	0.75	18.92	10.38	25.48	(17.06, 19.98)

n = tamaño de muestra / * = ausencia de ácidos grasos en la especie

K. oxytoca (de un aislamiento clínico) sp 9

Clasificación de ácidos grasos		Ácido graso	Pico	n	Media		Error			Intervalo de confianza	
					aritmética	Varianza	estándar	Mediana	Mínimo	Máximo	de la media al 95%
Saturados (14.87)		C 12:0	3	31	1.88	2.44	0.28	1.26	0.61	6.70	(1.33, 2.43)
		C 14:0	7	31	11.94	16.29	0.73	12.02	5.04	18.93	(10.52, 13.36)
		C 15:0	10	31	3.03	0.48	0.12	3.02	1.50	4.68	(2.79, 3.27)
		C 17:0	18	31	3.37	0.43	0.12	3.32	2.63	5.32	(3.14, 3.60)
		C 18:0	23	31	3.07	1.16	0.19	3.18	1.72	5.12	(2.69, 3.45)
Insaturados (38.20%)	Monoenoicos	C 16:1 ⁹	14	31	13.25	19.81	0.80	12.68	5.06	25.41	(11.68, 14.82)
		C 18:1 ⁹	21	*	*	*	*	*	*	*	*
		C 18:1 ^{9 y 11}	22	31	37.29	74.05	1.55	39.25	18.57	55.00	(34.26, 40.32)
	Dienoico	C 18:2 ^{9,12}	20	*	*	*	*	*	*	*	*
		Hidroxiácidos	C 14:0 2-OH	11	*	*	*	*	*	*	*
	C 14:0 3-OH		12	31	9.28	11.90	0.62	8.66	3.36	16.19	(8.07, 10.49)
Ciclopropanos (46.93)		C 17:0 Δ	17	31	68.21	65.00	1.45	70.27	45.87	85.02	(65.37, 71.05)
		C 19:0 Δ	24	31	5.28	50.48	1.28	1.16	0.49	30.62	(2.78, 7.78)

n = tamaño de muestra / * = ausencia de ácidos grasos en la especie

Clasificación de ácidos grasos		Ácido graso	Pico	n	Media aritmética	Varianza	Error estándar	Mediana	Mínimo	Máximo	Intervalo de confianza de la media al 95%
Saturados (14.03%)		C 12:0	3	33	2.10	0.25	0.09	2.13	1.06	3.63	(1.93, 2.27)
		C 14:0	7	33	12.87	1.91	0.24	12.74	9.87	16.37	(12.40, 13.34)
		C 15:0	10	33	3.08	0.14	0.07	3.03	2.22	3.75	(2.95, 3.21)
		C 17:0	18	33	3.82	0.73	0.15	3.69	2.63	6.11	(3.53, 4.11)
		C 18:0	23	33	2.48	0.48	0.12	2.29	1.30	4.35	(2.24, 2.72)
Insaturados (43.76%)	Monoenoicos	C 16:1 ⁹	14	33	20.98	2.71	0.29	21.02	17.93	23.87	(20.42, 21.54)
		C 18:1 ⁹	21	*	*	*	*	*	*	*	*
	Dienoico	C 18:1 ^{9 y 11}	22	33	45.11	19.35	0.77	44.71	28.29	52.68	(43.61, 46.61)
		C 18:2 ^{9,12}	20	*	*	*	*	*	*	*	*
	Hidroxiácidos	C 14:0 2-OH	11	*	*	*	*	*	*	*	*
C 14:0 3-OH		12	33	9.88	6.50	0.44	9.82	5.92	16.47	(9.01, 10.75)	
Ciclopropanos (42.21%)		C 17:0 Δ	17	33	65.25	17.46	0.73	65.58	55.14	79.96	(63.82, 66.68)
		C 19:0 Δ	24	33	8.01	17.41	0.73	6.94	3.68	24.08	(6.59, 9.43)

n = tamaño de muestra / * = ausencia de ácidos grasos en la especie

a 19. Distribución de los grupos de ácidos grasos identificados en las diferentes especies de *Klebsiella* aisladas del ambiente.

Especies	Ácidos grasos*		
	Saturados	Insaturados	Ciclopropanos
<i>neumoniae</i> (sp 2)**	18.1	43.5	38.4
<i>neumoniae</i> (sp 6)	13.7	54.1	32.1
<i>neumoniae</i> (sp 7)	13.8	46.6	39.6
<i>neumoniae</i> (sp 8)	13.9	58.5	27.6
<i>xytoca</i> (sp 3)**	13.1	33.7	53.2
<i>xytoca</i> (sp 9)	14.9	38.2	46.9
<i>xytoca</i> (sp 10)	14.0	43.8	42.2

Expresados en porcentajes
Especie tipo

la 19 A. Distribución de áreas y porcentajes¹ de ácidos grasos insaturados identificados en las diferentes especies de *Klebsiella* aisladas del ambiente y la clínicas.

Especies	Insaturados							
	monoenoicos				hidroxiácidos			
	C16:1 ⁹		C18:1 ⁹ trans C18:1 ¹¹ cis		C14:0 2OH		C14:0 3OH	
	área	%	área	%	área	%	área	%
<i>neumoniae</i> (sp 2)**	29.03	39.73	32.25	44.09	1.56	2.10	10.30	14.08
<i>neumoniae</i> (sp 6)	31.23	31.20	60.60	60.52	1.01	1.00	7.30	7.28
<i>neumoniae</i> (sp 7)	25.17	29.67	50.64	59.70	1.34	1.58	7.67	9.04
<i>neumoniae</i> (sp 8)	37.18	30.87	71.33	59.22	1.39	1.15	10.54	8.75
<i>xytoca</i> (sp 3)**	15.56	32.70	30.27	63.70	*	-	1.72	3.61
<i>xytoca</i> (sp 9)	13.25	22.15	37.29	62.34	*	-	9.28	15.51
<i>xytoca</i> (sp 10)	20.98	27.62	45.11	59.38	*	-	9.88	13.00

Tomando como 100% la suma de las áreas de los insaturados
Ausencia
Especie tipo

Tabla 20 Valores de los coeficientes no estandarizados para las 4 funciones discriminantes (especies tipificadas y ambientales)

		1	2	3	4
Saturados	C12:0	-0.259	0.327	-0.491	0.285
	C14:0	0.570	-1.130	0.685	0.449
	C15:0	-0.248	-0.423	0.259	-0.173
	C17:0	0.558	0.289	0.304	-0.451
	C18:0	0.075	-0.011	0.195	-0.205
Insaturados	hidroxiácido				
	C14:0 3OH	-0.139	0.924	0.168	-0.169
	m				
	C16:1 ⁹	0.412	-0.191	-0.700	0.223
Ciclopropano	o				
	C18:1 ⁹ trans	0.338	0.474	0.405	0.493
	C18:1 ¹¹ cis				
	C17:0Δ	-0.596	0.287	0.195	0.633

Tabla 21 Análisis discriminante para las 8 especies

Función discriminante	Eigenvalor	Porcentaje de varianza acumulado	Correlación canónica
1	8.142	54.0	0.944
2	3.452	76.8	0.881
3	2.681	94.6	0.853
4	0.699	99.2	0.641

Tabla 22 Valor de los centroides para cada una de las ocho especies de *Klebsiella* estudiadas

Especie	Grupo centroide	Función 1	Función 2	Función 3	Función 4
<i>K. pneumoniae</i> *	2	-8.944E-02	-4.005	.598	.156
<i>K. oxytoca</i> *	3	-3.530	0.454	-1.218	-.889
<i>K. rhinoscleromatis</i> *	5	2.461	.345	-3.095	.608
<i>K. pneumoniae</i> (agua)	6	2.975	.751	1.181	-1.183
<i>K. pneumoniae</i> (aire)	7	1.374	.998	1.216	-.979
<i>K. pneumoniae</i> (agua)	8	4.461	1.084	1.374	.338
<i>K. oxytoca</i> (clínica)	9	-3.581	1.225	1.417	.826
<i>K. oxytoca</i> (aire)	10	-1.972	1.400	1.121	1.279

* Especies tipo

Tabla 23.

Presencia de los ácidos grasos celulares en ocho especies de *Klebsiella*, 3 tipificadas, 1 clínica y 4 ambientales (media \pm desviación estándar)

Grupos de ácidos grasos		Ácido graso	Pico cromat.	<i>K. pneumoniae</i> (sp 2) ¹	<i>K. pneumoniae</i> (sp 6)	<i>K. pneumoniae</i> (sp 7)	<i>K. pneumoniae</i> (sp 8)	<i>K. rhinoscleromatis</i> (sp 5) ¹	<i>K. oxytoca</i> (sp 3) ¹	<i>K. oxytoca</i> (sp 9)	<i>K. oxytoca</i> (sp 10)
Saturados		C12:0	3**	1.25 \pm 0.87	0.64 \pm 0.35	1.06 \pm 0.53	1.19 \pm 0.68	3.19 \pm 1.55	2.34 \pm 1.91	1.88 \pm 1.56	2.10 \pm 0.5
		C14:0	7**	20.41 \pm 6.47	11.73 \pm 2.51	12.05 \pm 2.04	15.38 \pm 3.28	10.37 \pm 2.40	6.55 \pm 1.11	11.94 \pm 4.04	12.87 \pm 1.38
		C15:0	10**	4.02 \pm 1.36	3.44 \pm 0.51	2.88 \pm 0.99	2.89 \pm 0.66	2.50 \pm 0.36	2.88 \pm 0.33	3.03 \pm 0.70	3.08 \pm 0.37
		C16:0*	15**	100	100	100	100	100	100	100	100
		C17:0	18**	2.86 \pm 0.75	5.12 \pm 0.75	5.01 \pm 1.10	4.94 \pm 0.70	3.48 \pm 0.51	3.19 \pm 0.40	3.37 \pm 0.65	3.82 \pm 0.85
		C18:0	23**	1.91 \pm 0.92	4.47 \pm 1.67	4.12 \pm 0.42	4.19 \pm 4.78	2.25 \pm 0.30	3.45 \pm 1.60	3.07 \pm 1.07	2.48 \pm 0.70
Insaturados	Monoenoicos	C16:1 ⁹	14**	29.03 \pm 9.05	31.23 \pm 4.86	25.17 \pm 4.60	37.18 \pm 7.43	42.71 \pm 7.05	15.56 \pm 3.03	13.25 \pm 4.45	20.98 \pm 1.65
		C18:1 ⁹	21	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	Dienoico	C18:1 ^{9,11}	22**	32.25 \pm 7.97	60.60 \pm 7.65	50.64 \pm 9.54	71.33 \pm 6.97	58.81 \pm 9.36	30.27 \pm 3.40	37.29 \pm 8.60	45.11 \pm 4.40
		C18:2 ^{9,12}	20	-----	-----	-----	-----	0.17 \pm 0.0	-----	-----	-----
	Hidroxiácidos	C14:0 2 OH	11	1.56 \pm 1.56	1.01 \pm 0.48	1.34 \pm 1.15	1.39 \pm 0.97	-----	-----	-----	-----
C14:0 3 OH		12	10.30 \pm 9.16	7.30 \pm 2.45	7.67 \pm 1.80	10.54 \pm 3.22	4.25 \pm 2.12	1.72 \pm 0.96	9.28 \pm 3.45	9.88 \pm 2.55	
Ciclopropanos		C17:0 Δ	17**	45.73 \pm 8.00	39.54 \pm 4.95	47.59 \pm 10.05	38.38 \pm 6.16	33.54 \pm 4.02	55.81 \pm 7.42	68.21 \pm 8.06	65.25 \pm 4.18
		C19:0 Δ	24**	18.74 \pm 4.22	19.89 \pm 3.56	24.55 \pm 4.93	18.52 \pm 4.22	1.88 \pm 0.26	19.24 \pm 3.53	5.28 \pm 7.10	8.01 \pm 4.17

* El ácido graso C16:0 representa el pico de mayor área, representado como el 100%, los demás valores de área están normalizados con respecto a este

** Ácidos grasos comunes

*** La ausencia de ácidos grasos en cada especie está representada por la línea punteada (-----)

t Especie tipo