



Aplicación de la Cromatografía de Gases en la Identificación de *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes* y *Enterobacter agglomerans*

E. ROBLES VALDERRAMA,* P. RAMÍREZ GARCÍA, M. E. GONZÁLEZ ARREAGA, M. G. SÁINZ MORALES, B. MARTÍNEZ RODRÍGUEZ, A. DURÁN DÍAZ Y D. CHÁVEZ RAMÍREZ.

Unidad de Investigación Interdisciplinaria en Ciencias de la Salud y la Educación UNAM Campus Iztacala, México.

*Corresponding author: Cádiz # 104 Col. Alamos, México, D. F. 03400. Fax (525) 390-59-00.
E-mail: erobles@servidor.unam.mx

ABSTRACT. *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter agglomerans* were identified using gas chromatography as a substitution of the traditional techniques. Their acid methyl esters profiles were determined using a gas chromatograph Hewlett Packard 5890A and a RSL-150 heliflex capillary column. A total of 120 samples were analyzed from reference strains (ATCC 13047, 13048, 27155) and environmental isolations, eleven fatty acids were included in the profiles from which cis-9, 10-methyleneoctadecanoic acid (peak 24), cis-9-hexadecenoic acid (peak 14), octadecanoic acid (peak 23) and dodecanoic acid (peak 3), were the most important for the differentiation of the three species analyzed.

Key words: Gas chromatography, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter agglomerans*.

RESUMEN. Con el objeto de identificar *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes* y *Enterobacter agglomerans* utilizando la técnica de cromatografía de gases en sustitución de las pruebas tradicionales, se determinó la composición de los perfiles de ácidos grasos, a través de sus ésteres, para estas especies, por medio de un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890A y una columna capilar RSL-150 heliflex. Se realizaron un total de 120 análisis en muestras tanto de cepas de referencia (ATCC 13047, 13048, 27155), como de aislamientos ambientales, determinándose su perfil cromatográfico constituido por 11 ácidos grasos de los cuales el ácido cis-9, 10-metilen octadecanoico (pico 24), el ácido cis-9-hexadecenoico (pico 14), el ácido octadecanoico (pico 23) y el ácido dodecanoico (pico 3), resultaron ser determinantes para la diferenciación entre las tres especies estudiadas.

Palabras Claves: Gas chromatography, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter agglomerans*.

INTRODUCCION

Las investigaciones sobre los constituyentes de las células bacterianas específicamente el contenido de ácidos grasos, a través de la cromatografía gas-líquido tiene sus inicios en 1952 cuando James y Martin obtuvieron por primera vez la separación de algunos ácidos grasos volátiles.⁹ En 1967 Kaneda realizó el aislamiento e identificación de los ácidos grasos celulares de *Bacillus subtilis*.¹⁰ En 1963 Abel et al sugirieron la clasificación de especies de la familia Enterobacteriaceae mediante el análisis de cromatografía de gases.¹

Posteriormente, este método fue usado por investigadores como: Brooks, et al (1971); Moss y Nufes (1978); Bousfield, et al (1983); Vets, et al (1989); Hidetoshi, et al (1990); Shantha y Napolitano (1992); Srinivas, et al (1994); Murray, et al (1995); Chou, et al (1996).^{2,3,4,8,11,12,14,15,17} La esencia de esta técnica radica en

el análisis de los ácidos grasos de la bacteria cuya composición es característica para cada especie y permite la diferenciación entre éstas. Dentro de las bacterias que tienen más repercusión en salud pública por pertenecer a los indicadores bacterianos de contaminación, están las especies *E. cloacae*, *E. aerogenes* y *E. agglomerans* pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae del género *Enterobacter*, cuya sola presencia indica contaminación y la posible existencia de bacterias patógenas causantes de enfermedades respiratorias, urinarias y gastrointestinales entre otras. Así tenemos que en México los casos nuevos acumulados hasta la semana 40 de 1998 notificados en el Boletín de Epidemiología fueron 4,383,301 para enfermedades diarreicas y 14,816,154 para infecciones respiratorias agudas.¹⁶

En este trabajo se determinaron los perfiles de ácidos grasos de *E. cloacae*, *E. aerogenes* y *E. agglomerans*, y se realizó el análisis comparativo entre estas especies, con el fin de establecer los picos más relevantes para su diferen-



ciación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se usaron 5 cepas puras para cada especie, de las cuales, 3 fueron tipificadas procedentes de la American Type Culture Collection (*E. cloacae*, *E. aerogenes* y *E. agglomerans* (ATCC 13047, 13048, 27155) y 2 aisladas del ambiente (aguas residuales), efectuándose 8 repeticiones a cada una, haciendo un total de 120 cromatogramas por las 3 especies estudiadas.

Para obtener la cantidad necesaria de biomasa (20 mg), se cultivó cada bacteria en agar nutritivo durante 24 h a 37°C, usando siempre la misma marca del medio de cultivo, con el objeto de evitar interferencias reportadas por otros autores.^{6,13}

Posteriormente se lavó la biomasa con una solución de formaldehído al 0.5%, centrifugándola durante 10 min a 15,000 rpm/min, lavándola nuevamente con NaCl al 0.85%, centrifugando y repitiendo el lavado dos veces más. La biomasa obtenida se liofilizó a -50 °C con un vacío de 25 micrones.^{6,7}

Después de secar la biomasa se procedió a esterificarla con metóxido de sodio según la técnica de Glass.⁵

Los ácidos grasos ya esterificados se extrajeron en hexano, concentrando la solución resultante con gas nitrógeno hasta un volumen aproximado de 10 µl.

Para el análisis cromatográfico se utilizó un cromatógrafo de gases Hewlett Packard (HP 5890 A) con un detector de ionización de flama, una columna capilar heliflex RSL 150, de 30 m. con diámetro interno de 0.25 mm y espesor de película de 0.25 µm.

Las temperaturas del inyector y detector se mantuvieron a 250 °C y la de la columna se programó de 120 a 250 °C con un intervalo de 4 °C/min, usando nitrógeno como gas acarreador con un flujo de 30 ml/min y un volumen de inyección de 1 µl.

La identificación de los ácidos grasos a través de sus ésteres, en las tres especies, se realizó mediante la comparación de sus tiempos de retención con los de la solución patrón (Bact. acid methyl ester mix. 10 mg/ml methyl caproate 1 ml Supelco catálogo No. 4-7080).

Las áreas de cada pico se normalizaron, quedando los valores expresados en porcentajes relativos, tomándose como 100 % el pico correspondiente al ácido hexadecanoico C 16:0, que presentó el área más alta.⁶

Para realizar la comparación de los ácidos grasos obtenidos entre las tres especies y determinar los picos que más las diferencian, se utilizó un análisis discriminante. Este análisis incluyó el cálculo de funciones discriminantes y distancias de Mahalanobis con sus respectivos niveles de significancia, además del diagrama de dispersión de los cromatogramas de las tres especies. El análisis se procesó utilizando el paquete estadístico STATISTICA v. 4.3 para Windows.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En todos los 120 cromatogramas obtenidos para las tres especies, tanto en las muestras de las cepas de referencia como en las ambientales se encontraron 11 picos en relación a los 26 de la solución patrón.

Los picos encontrados fueron: 3 (ácido dodecanoico), 7 (ácido tetradecanoico), 10 (ácido pentadecanoico), 12 (ácido 3-hidroxi-tetradecanoico), 14 (ácido cis-9-hexadecenoico), 15 (ácido hexadecanoico), 17 (ácido cis-9, 10-metilen-hexadecanoico), 18 (ácido heptadecanoico), 22 (ácido trans-9-octadecenoico y ácido cis-11-octadecenoico), 23 (ácido octadecanoico) y 24 (ácido cis-9, 10-metilen-octadecanoico), (Tabla 1).

Con los datos normalizados de las áreas se calculó el valor mínimo, valor máximo, media y desviación estándar. Los picos que presentaron las medias de áreas normalizadas más altas fueron: para *E. cloacae* el pico número 15 con un porcentaje de área normalizada de 100 %, el pico 17 con 48.6 % y el pico 22 con 36.3 %; para *E. aerogenes* fueron: el pico número 15 con el 100 %, el pico 17 con 48.8 % y el pico 22 con 29 %; para *E. agglomerans* el pico número 15 con 100 %, el pico 17 con 50.8 % y el pico 22 con 23.6 %.

Los picos que presentaron las medias de área normalizada más bajas fueron: para *E. cloacae*; el pico número 3 con 2.89 %, el pico 24 con 4.33 % y el pico 18 con 4.72 %; para *E. aerogenes* el pico número 23 con 1.51%, el pico 3 con 1.99 % y el pico 18 con 3.58 %; para *E. agglomerans* el pico número 3 con 1.39 %, el pico 23 con 1.98 % y el pico 18 con 2.76 %. (Tabla 2).

Los valores altos de las desviaciones estándar en las áreas de algunos picos de una misma especie, podrían indicar la posible diferenciación hasta subespecie como lo reporta Häusler.⁶ Por ejemplo en los 40 cromatogramas de *E. aerogenes* la media del área del pico 12 fue de 13.8 con una desviación estándar de 10.5, la cual es muy alta. Si observamos el intervalo para este pico tenemos que el valor de área más bajo fue de 2.81 y el valor de área más alto fue de 17.63. Si analizamos los datos de este pico y los ordenamos en intervalos más pequeños podríamos formar 3 grupos: el primero con un intervalo de 2.81 a 4.01, con 8 cromatogramas; el segundo intervalo de 5 a 7 con 21 cromatogramas y el tercer intervalo de 8 a 17 con 11 cromatogramas. Esto daría como resultado una disminución en la desviación estándar. Sin embargo este procedimiento requiere de una investigación más profunda para que podamos pensar en una técnica de identificación de Enterobacterias por cromatografía de gases no sólo hasta especie, sino quizá hasta subespecies.

Para obtener el perfil de ácidos grasos de cada especie se graficaron las medias de las áreas normalizadas y los tiempos de retención como se muestra en la fig. 1, donde se observan las diferencias existentes entre las áreas de los picos de las tres especies estudiadas.

Para apreciar dichas diferencias se realizó un análisis



Tabla 1. Comparación de los ácidos grasos de *E. cloacae*, *E. aerogenes* y *E. agglomerans* en relación a los de la solución .

Número de Pico	Ácidos grasos del estándar	Ácidos grasos de <i>E. cloacae</i>	Ácidos grasos de <i>E. aerogenes</i>	Ácidos grasos de <i>E. agglomerans</i>
1	C 11: 0			
2	2-OH C10:0			
3	C 12: 0	X	X	X
4	C 13: 0			
5	2-OH C 12: 0			
6	3-OH C 12:0			
7	C 14: 0	X	X	X
8	i - C 15: 0			
9	a - C 15: 0			
10	C 15: 0	X	X	X
11	2-OH C 14: 0			
12	3-OH C 14: 0	X	X	X
13	i - C 16: 0			
14	C 16: 1 ⁹	X	X	X
15	C 16: 0	X	X	X
16	i - C 17: 0			
17	C 17: 0	X	X	X
18	C 17: 0	X	X	X
19	2-OH C 16: 0			
20	C 18: 2 ^{9,12}			
21	C 18: 1 ⁹			
22	C 18: 1 ^{9,11}	X	X	X
23	C 18: 0	X	X	X
24	C 19: 0	X	X	X
25	C 19: 0			
26	C 20: 0			

Tabla 2. Medidas descriptivas para las áreas normalizadas de los cromatogramas de *Enterobacter* spp.

Especie	Número de Pico	Valor mínimo	Valor máximo	Media	Desviación Estándar
<i>E. cloacae</i> n= 40	3	1.08	7.38	2.89	1.06
	7	10.0	26.0	15.8	2.76
	10	3.42	9.5	5.60	1.37
	12	4.11	29.6	14.3	6.06
	14	19.0	42.2	29.8	5.11
	15	100	100	100	0.0
	17	36.2	64.7	48.6	6.13
	18	2.24	7.87	4.72	1.09
	22	24.7	46.2	36.3	6.18
	23	3.34	8.96	5.49	1.38
	24	1.55	7.10	4.33	1.30
<i>E. aerogenes</i> n=40	3	0.0	5.67	1.99	1.34
	7	14.0	33.1	20.6	5.60
	10	0.0	9.35	5.47	1.43
	12	4.01	36.3	13.8	10.5
	14	11.3	33.0	21.9	7.66
	15	100	100	100	0.0
	17	41.6	57.9	48.8	4.64
	18	2.65	5.28	3.58	0.646
	22	11.1	42.7	29.0	9.38
	23	0.0	2.66	1.51	0.71
	24	9.15	22.1	14.2	4.05
<i>E. agglomerans</i> n= 40	3	0.61	3.78	1.39	0.643
	7	15.2	27.0	19.8	3.0
	10	3.72	7.31	5.13	1.07
	12	2.17	18.0	6.34	4.13
	14	12.6	26.1	18.5	3.03
	15	100	100	100	0.0
	17	45.9	55.8	50.8	2.17
	18	1.99	3.51	2.76	0.445
	22	19.2	35.2	26.3	4.04
	23	1.16	3.16	1.98	0.559
	24	11.2	17.9	14.6	1.64

Tabla 3. Resultados del análisis discriminante de los cromatogramas de las 3 especies de *Enterobacter*.

Función	Valor característico	Lambda de Wilks	χ^2	Nivel de significancia	Variables discriminantes	% de varianza explicada
1	18.53	0.0435	362.1	0.00001	Picos 23 y 24	99.1
2	0.1774	0.8493	18.9	0.0264	Picos 3 y 14	0.99

Tabla 4. Resultados del análisis discriminante (parte 2), de los cromatogramas de las 3 especies de *Enterobacter*.

Especies	Distancia de Mahalanobis	Nivel de significancia
<i>E. aerogenes</i> - <i>E. agglomerans</i>	1.14	0.0279
<i>E. aerogenes</i> - <i>E. Cloacae</i>	82.09	0.0001
<i>E. agglomerans</i> - <i>E. cloacae</i>	87.43	0.0001

AREA NORMALIZADA

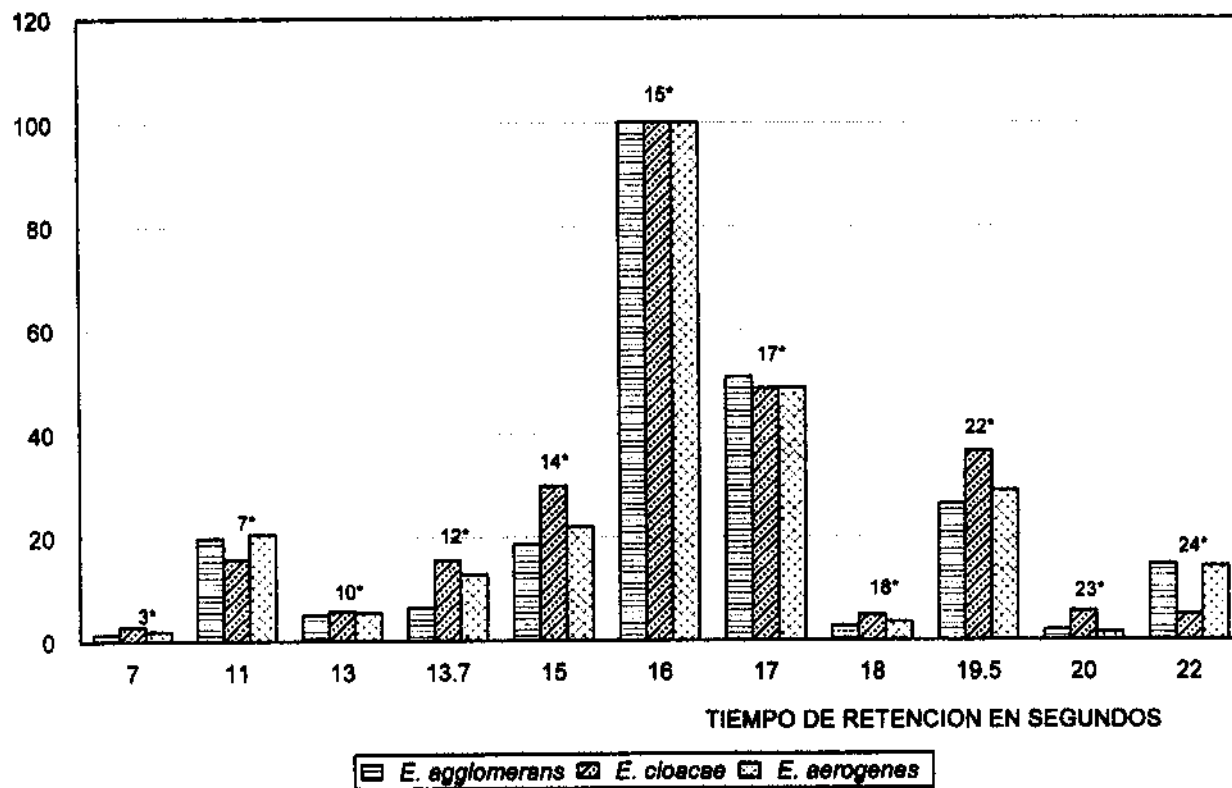


Fig. 1. Comparación de los perfiles de ácidos grasos de *E. Agglomerans*, *E. Aerogenes* y *E. cloacae*

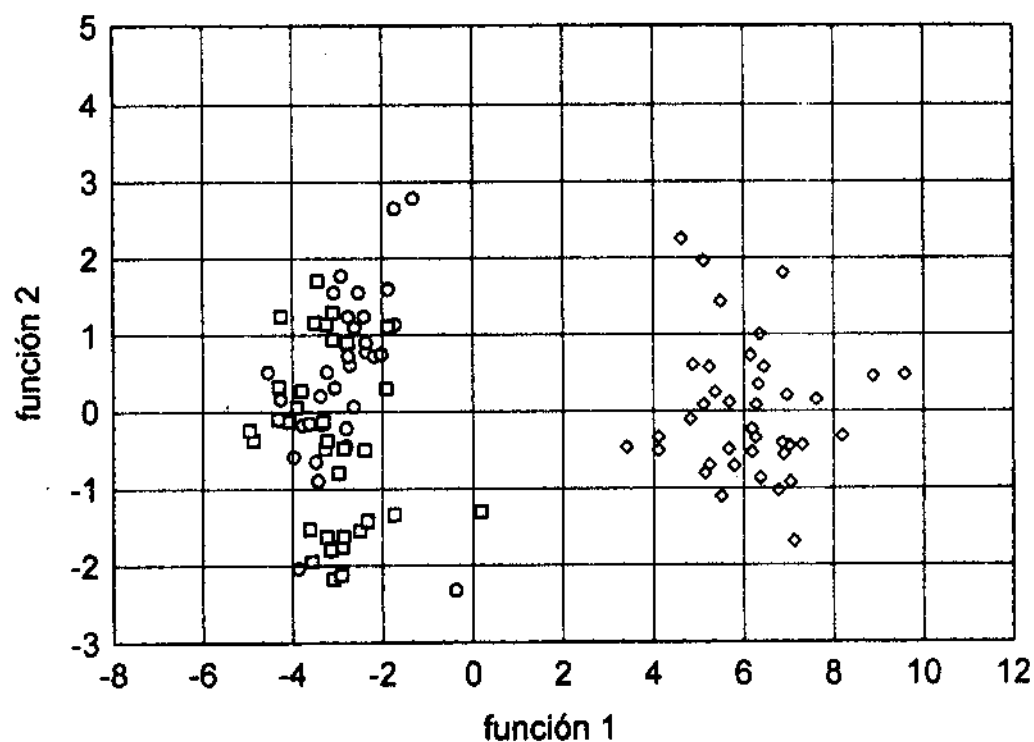


Fig. 2. Diagrama de dispersión de los cromatogramas de las tres especies de *Enterobacter*.



discriminante cuyos resultados se muestran en la Tabla 3. De acuerdo a los valores de la Lambda de Wilks y de χ^2 la función 1 quedó formada por los picos 23 y 24 y explicó el 99.1% de la variación total de los datos, la función 2 quedó constituida por los picos 3 y 14 explicando prácticamente el 1 % de la variación, ambas funciones resultaron estadísticamente significativas y las variables que formaron cada función fueron las que más discriminaron a las 3 especies.

Para determinar diferencias entre las especies, se obtuvieron las distancias de Mahalanobis (Tabla 4). Por los niveles de significancia ($p < 0.05$), se pudo observar que las distancias entre los centroides de las tres especies resultaron estadísticamente significativas, es decir, que las 3 especies son diferentes en las áreas de los picos.

Finalmente para tener una descripción gráfica de lo anterior, se obtuvo el diagrama de dispersión de los cromatogramas de las 3 especies, de acuerdo a las dos funciones discriminantes obtenidas (fig. 2), donde se muestra que los cromatogramas de la especie 3, *E. cloacae* están claramente diferenciados de los de la especie 1, *E. aerogenes* y de los de la especie 2, *E. agglomerans*. Los cromatogramas de estas dos últimas especies están intermezclados, lo que significa que éstas son parecidas, aún cuando sus centroides son estadísticamente diferentes.

CONCLUSIONES

Al realizar el análisis comparativo de los perfiles concluimos que los ácidos grasos determinantes para la identificación de las 3 especies son:

El ácido octadecanoico (pico 23), el ácido cis-9, 10-metilen octadecanoico (pico 24), el ácido dodecanoico (pico 3) y el ácido cis-9-hexadecenoico (pico 14).

Los perfiles de los ácidos grasos obtenidos para las tres especies estudiadas se podrán utilizar como patrones de referencia en la identificación de muestras ambientales mediante la comparación de los cromatogramas de los perfiles de éstas con los de referencia.

Se puede decir que esta técnica en comparación con las técnicas tradicionales ofrece mayor rapidez y exactitud en la identificación de Enterobacterias.

REFERENCIAS

1. Abel, K. 1963. Classification of microorganisms by analysis of chemical composition feasibility utilizing gas chromatography. *J. Bacteriol.* 85:1039-1044.
2. Bousfield J., G. L. Smith, T. R. Dando y G. Hobbs. 1983. Numerical analysis of total fatty acids profiles in the identification of coryneforme, nocardioform and some other bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 128:375-394.
3. Brooks, J., D. S. Kellogg, L. Thacker y E. M. Tuner. 1971. Analysis by gas chromatography of fatty acids in whole cultural extracts of *Neisseria* species. *Can. J. Microbiol.* 17:537-543.
4. Chou, S., P. Chedore, A. Haddad, N. R. Paul y Kasatiya. 1996. Direct identification of *Mycobacterium* sp. In Bactec 7H12B medium by gas-liquid chromatography. *J. Clin. Microbiol.* 34:1317-1320.
5. Glass, R. L. 1971. Alcoholysis, saponification and preparation of fatty acids methyl esters. *Lipids* 6:919
6. Häusler, J. y V. Richter. 1983. Identification of bacteria of family Enterobacteriaceae by gas chromatography. Publishing House of the Hungarian Academy of Sciences Budapest.
7. Häusler, J. y V. Richter. 1989. Identificación de *Pseudomonas* aisladas de agua por cromatografía de gases. V Simposium Internacional sobre Biología de la Contaminación. UNAM Iztacala. México.
8. Hidetoshi, O., S. Shoji, H. Shoichi y Norio M. 1990. A trans-unsaturated fatty acid in psychrophilic bacterium, *Vibrio* sp. Strin ABE-1. *J. Bacteriol.* 172: 3515-3518.
9. James, A. T. and A. J. T. Martin. 1952. Gas-liquid partition chromatography: the separation and microestimation of volatile fatty acids from formic to dodecanoic acid. *J. Biochem.* 50:679-690.
10. Kaneda, T. 1967. Fatty acids in genus *Bacillus*, iso and anteiso fatty acids as characteristic constituents of lipids in 10 species. *J. Bacteriol.* 93:894-903.
11. Moss, C. W. y O. L. Nuñez-Montiel. 1978. Analysis of short-chain acids from bacteria by gas-liquid chromatography with a fused silica capillary column. *J. Chem. Microbiol.* 15: 308-311.
12. Murray, R. P., E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover y R. H. Tenover. 1995. Manual of clinical microbiology. p. 1452. 6ª ed. ASM Press, Washington D. C.
13. Robles, V. E., A. M. E. González, M. M. G. Sáinz, G. P. Ramírez y R. B. Martínez. 1994. Determination of cellular fatty acids of *Klebsiella ozaenae* by gas chromatography. *Rev. Roum Biochim.* 31:51-55.
14. Shantha N. C. y G. Napolitano. 1992. Review gas chromatography of fatty acids. *J. Chromatogr.* 624:37-51.
15. Alugapalli, F. Portaels y L. Larsson. 1994. Systematic study of the 3 hidroxy fatty acids composition of *Mycobacteria*. *J. Bacteriol.* 176:2962-2969.
16. SSA. 1998. Boletín semanal de epidemiología. 15 (1,1):4.
17. Vets, D., W. Callewaert, F. Waelkens y K. Van Den Abbeele. 1989. Application of gas-liquid chromatography to the routine identification of non fermenting Gram-negative bacteria in clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 7:1538-1542.