

## DIFERENCIACIÓN DE AISLADOS NATIVOS DE *Pseudomonas* DESULFURIZADORAS MEDIANTE EL ESTUDIO DEL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS

Edelberto Silva Gómez\*, Alicia Lucía Morales P.\*\*\*, Solange Callejas Castro, María Cecilia Flórez Sandoval y Wilson Rodríguez

Aprobado: Agosto/2000

**Keywords:** *Pseudomonas*, fatty acids methyl esters, HRGC, molecular characterisation.

### RESUMEN

Utilizando CGAR se determinó el contenido de ácidos grasos celulares de doce aislados colombianos, *Pseudomonas aeruginosa* 17, 18, 19, 20, 21, 22 y 103, *Pseudomonas sp* 23, 24, 25, 26 y 27 con capacidad desulfurizadora, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 y 10145, *Pseudomonas sp* ATCC 39327 y *Pseudomonas fluorescens*. Se encontraron 53 ácidos grasos diferentes, entre saturados e insaturados de cadena lineal, y principalmente hidroxiácidos y ramificados. De éstos, 17 no han sido descritos en la literatura para este género. Un grupo de 6 ácidos se presentó con mayor frecuencia (15:0; 16:0; 16:1; 17:1; 3-OH 16:0 y 2-OH 15:0) en más del 75% de las *Pseudomonas* estudiadas. Los microorganismos estudiados están relacionados porque comparten la presencia de algunos ácidos grasos característicos, lo cual permite asegurar que pertenecen a una misma uni-

dad taxonómica. El análisis de las asociaciones jerárquicas, desarrollado gráficamente en dendrogramas, de los contenidos cualitativos y cuantitativos de los ácidos grasos totales mostró la formación de dos agregados, el I conformado por ATCC 39327 y los aislados 17 y 25, y el II por *Ps. fluorescens* y el aislado 27. En el dendrograma de los hidroxiácidos se ve la formación de cuatro agregados, el I, (aislados 17 y 20), el IIA (aislados 22 y 103), el IIB (aislados 27 y *Ps. fluorescens*) y el agregado III (aislados 18 y 19). En el de los ácidos grasos ramificados se observa la formación de un agregado principal conformado por cuatro subgrupos, el IA (aislado 17), el IB (aislados 18 y 24), el IC (aislados 19 y 25 y *Ps. fluorescens*) y el ID (aislado 27). Esto nos mostró que los aislados 27, 25, 24, 19, 18 y 17, en su orden, tienen estrecha relación con *Ps. fluorescens*.

### ABSTRACT

The content of cellular fatty acids was determined by HRGC of twelve Colombian isolated *Pseudomonas aeruginosa*

\* Departamento de Farmacia. esilva@ciencias.ciencias.unal.edu.co

\*\* Departamento de Química. amorales@ciencias.ciencias.unal.edu.co  
Universidad Nacional de Colombia. A.A. 14490, Bogotá, Colombia.

17, 18, 19, 20, 21, 22 and 103 *Pseudomonas* sp 23, 24, 25, 26 and 27 with desulfurization capacity, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 and 10145, *Pseudomonas* sp ATCC 39327 and *Pseudomonas fluorescens*. Fifty-three different types of fatty acids were found, among saturated and unsaturated of lineal chain, and mainly hydroxyacids and ramified. Of these, 17 have not been described in the literature for this genus. A group of 6 acids was presented with more frequency (15:0; 16:0; 16:1; 17:1; 3-OH 16:0 and 2-OH 15:0) in more than 75% of the *Pseudomonas* studied. The studied microorganisms are related because they share the presence of some characteristic fatty acids, that which allows to assure that they belong to same taxonomic unit. The analysis cluster developed by means of plotting in dendrograms of the qualitative and quantitative contents of the acids fatty totals showed the formation of two attachés, the I conformed by ATCC 39327 and the isolated 17 and 25, and the II by *Ps. fluorescens* and the isolated one 27. The dendrograma of the hydroxyacids shows the formation of four attachés, the I attaché, (isolated 17 and 20), the IIA (isolated 22 and 103), the IIB (isolated 27 and *Ps. fluorescens*) and the attaché III (isolated 18 and 19). In that of the ramified fatty acids the formation of a main attaché is observed conformed by four subgroups, the IA (isolated 17), the IB (isolated 18 and 24), the IC (isolated 19 and 25 and *Ps. fluorescens*) and ID (isolated 27). These results show that the isolated 27, 25, 24, 19, 18 and 17, in their order, have narrow relationship to *Ps. fluorescens*.

## INTRODUCCIÓN

Una de las preocupaciones mundiales radica en que los combustibles generen el menor impacto ambiental, como es el caso de aquellos que presenten bajo contenido de azufre y moléculas azufradas orgánicas e inorgánicas, las cuales van a generar óxidos de azufre después de su combustión, que al combinarse con la humedad de la atmósfera da lugar a la formación de la llamada lluvia ácida que produce un fuerte impacto ambiental a todo nivel. Para disminuir el contenido en combustibles se han empleado métodos químicos y microbiológicos; los últimos, además de ser económicos, constituyen una eliminación real del problema, pues pueden remover tanto el azufre orgánico como el inorgánico, tarea que no se puede realizar con los procesos químicos convencionales, que sólo remueven el azufre pirítico (1), (2).

Para el desarrollo de procesos biológicos se ha estudiado diversidad de microorganismos, de los cuales el género *Pseudomonas* presenta un potencial enorme pues es capaz de atacar compuestos orgánicos derivados de la descomposición de material vegetal o animal y biodegradar cientos de compuestos como insecticidas, pesticidas, herbicidas, plástico, sustancias derivadas del petróleo e hidrocarburos, e interviene activamente en los ciclos del carbono y nitrógeno, además de ayudar a remover el azufre orgánico por oxidación; adicionalmente puede producir tensioactivos, que son útiles en la degradación de compuestos de carácter lipófilo (3), (4). Nuestro grupo de investigación ha decidido estudiar el potencial de este género, por lo que ha emprendido la tarea

de aislar *Pseudomonas* desulfurizadoras y caracterizarlas.

Para la caracterización de microorganismos, el uso de métodos fenotípicos se ve limitado por la capacidad de un microorganismo para alterar su expresión genética, estos cambios pueden ocurrir como respuesta a un estímulo ambiental o a mutaciones puntuales causando una regulación o función anormal. Dentro de los métodos fenotípicos están los quimiota-xonómicos, los cuales son útiles para obtener información química de bacterias en diferentes sitios o niveles. De éstos, la caracterización del perfil de ácidos grasos, posiblemente es el más útil de todos los criterios no genéticos para la diferenciación celular intra e interespecífica (6), (7), (8). Su poder discriminatorio es suficientemente grande como para ser usado como sistema de tipificación, además de tener ventajas significativas como fácil manejo, reproducibilidad, almacenamiento de información y gran número de microorganismos tipificables (7), (8). Los perfiles de ácidos grasos obtenidos de bacterias se pueden comparar con otros contenidos en una base de datos computarizada para determinar el tipo de microorganismo (6). La identificación de bacterias por medio de perfiles de ácidos grasos ha sido bien establecida ya que realmente diferencian especies aeróbicas y anaerobias (1), (9), (10), (11), (12).

En este trabajo se pretende establecer una diferenciación taxonómica de 12 aislados nativos de *Pseudomonas* con base en el perfil de ácidos grasos analizados como ésteres metílicos por cromatografía de gases de alta resolución. Los aislados de *Pseudomonas* se obtuvieron a partir de muestras contaminadas con petróleo y sus

derivados, los cuales tienen la capacidad de desulfurizar dibenzotiofeno (4).

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Microorganismos:** *Pseudomonas* sp ATCC 39327, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 y 9027, *Pseudomonas fluorescens* (cepario del Laboratorio de Microbiología del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá). Los aislados nativos se obtuvieron a partir de suelos contaminados con petróleo residual, sustancias oleosas y aguas azufradas obtenidas del Complejo Industrial de Barrancabermeja (3), y caracterizados bioquímicamente por el sistema API (13).

**Obtención de biomasa:** Los aislados y cepas de referencia se repican en agar Louria Bertani (LB), y se incuban a 37°C/24 horas, se toma una colonia aislada, se inocula en 20 mL de caldo soya tripticasa (MERCK), y se incuba a 37°C/16 horas. De este cultivo (preinóculo) 10 mL se transfieren a un matraz con 500 mL de caldo soya tripticasa, e incuba a 37°C/22 horas. Luego se centrifuga el cultivo a 4.000 rpm/30 minutos y se descarta el sobrenadante. El paquete celular obtenido se lava con buffer  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.01M pH 7,2 (dos veces). Finalmente las células obtenidas se congelan a -70°C y se liofilizan (14).

**Preparación de ésteres metílicos de ácidos grasos (EMAG):** En un tubo de vidrio de 10 mL, con tapa rosca (recubrimiento en teflón) para centrifuga, se colocan 30 mg de células en peso seco; se adicionan 0,5 mL de acetona, 2 mL del reactivo de saponificación (45 g NaOH, 150 mL de metanol y 150 mL de agua desti-

lada); los tubos se cierran herméticamente y calientan en un baño a ebullición por 30 min, agitando cada 5 min en vórtex. Se enfrían a temperatura ambiente y se adiciona 0,5 mL de acetona, 3 mL del reactivo de metilación (325 mL de HCl 6N y 275 mL de metanol) y se calientan por 10 min a 80°C. Los tubos se enfrían a temperatura ambiente y se adiciona 1,25 mL del reactivo de extracción (n-hexano y metil-terbutil éter 1:1); se agitan en vórtex y se centrifugan a 4.000 rpm/10 min. Se recupera la fase orgánica y se lava con 3 mL del reactivo de lavado (NaOH 0.3 N), se homogeneiza y centrifuga a 4.000 rpm/5 min (dos veces). La fase orgánica se recupera y el solvente se evapora con corriente de nitrógeno. El extracto se conserva a 4°C para posterior análisis por CGL (15).

**Análisis de ácidos grasos por cromatografía gas-líquido:** Los ácidos grasos se analizaron como ésteres metílicos (EMAG) por CGAR en un cromatógrafo de gases Shimadzu CG-8A, equipado con un detector de ionización de llama de hidrógeno. Se utilizó una columna de sílica fundida OV-1 (25 m por 0,2 mm d.i.; df = 0,25 µm) la cual se calentó de 110°C a 220°C a razón de 3°C/min. Las temperaturas del inyector y del detector se mantuvieron a 250°C. Como gas de arrastre se empleó nitrógeno a un flujo de 1 mL/min. La inyección (0,5 µL) se hizo con una relación de split 1:15. El manejo de los datos se realizó en un integrador Chromatopac CR3A Shimadzu. Los extractos de EMAG se disolvieron en 100 µL de hexano inmediatamente antes de la inyección.

El análisis cualitativo se hizo por comparación de las medidas de retención (LCE) con los de muestras auténticas (ésteres metílicos de ácidos grasos saturados

[ácido decanoico, ácido dodecanoico, ácido tetradecanoico, ácido hexadecanoico, ácido octadecanoico y ácido eicosanoico]; ésteres metílicos de ácidos grasos monoinsaturados [ácido tetradecenoico, ácido hexadecenoico, ácido octadecenoico, ácido eicosenoico]; ácidos grasos hidroxilados [ácido 3-hidroxidecanoico, ácido 2-hidroxidodecanoico, ácido 3-hidroxidodecanoico]; un ciclopropano de 19 carbonos y el 14-metil pentadecanoico) o con los valores publicados en la literatura. La cuantificación se realizó por el método de normalización de áreas.

#### **Análisis estadístico multivariado:**

Los datos se analizaron por medio del paquete estadístico IDAMS (16) (*Clusfind*), el cual ejecuta un análisis cluster por partición de un grupo de objetos, determinado por AGNES; un algoritmo basado en un agrupamiento jerárquico a partir de una matriz de similitud que se calcula directamente de datos crudos por medio de distancias euclidianas, donde todas las variables toman el mismo valor.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Análisis de los ácidos grasos**

La obtención de los ésteres metílicos de ácidos grasos (EMAG) a partir de células secas presentó un rendimiento promedio del 40,4% p/p. Evitando las condiciones que pudieran llevar a su descomposición (luz, altas temperaturas, oxígeno) se sometieron a una cromatografía de gases de alta resolución (CGAR) para obtener los perfiles cromatográficos.

En la tabla 1 se presentan los EMAG identificados en los doce aislados, de

Tabla 1. Perfiles de ácidos grasos de *Pseudomonas* (los valores se dan como porcentaje relativo).

<i>Pseudomonas</i>	10:0	11:0	12:0	13:0	14:0	15:0	16:0	17:0	18:0	19:0	20:0	14:1	15:1	16:1	17:1	18:1	19:1	20:1
<i>aeruginosa</i> ATCC 9027	0,32		3,09			0,77	26,79		1,57		1,34	0,80	0,48	4,59	1,67	29,49		
<i>aeruginosa</i> ATCC 10145				7,18	0,65	17,89	4,25						2,20	0,80	2,03			3,54
<i>sp.</i> ATCC 39327		5,2		0,96		0,34												
<i>fluorescens</i>							7,83		9,47						1,84			
<i>aeruginosa</i> 17		2,19				1,16	5,72							0,63	2,10	0,68		0,81
<i>aeruginosa</i> 18						2,08	13,43	3,91	5,8	1,21				1,37	3,12	1,74		0,63
<i>aeruginosa</i> 19						1,94	2,52	3,77	12,00	0,43			2,11	1,97	0,85	0,75		1,13
<i>aeruginosa</i> 20		4,12		0,58		3,36	2,57						5,86	2,16	4,20	3,37		0,52
<i>aeruginosa</i> 21				1,15			0,93		1,71	1,25	0,93			26,38				
<i>aeruginosa</i> 22					1,38	1,23	20,27	0,53	1,47				1,18	2,29	3,09	3,98		3,22
<i>sp</i> 23		0,44			6,6	0,59			0,94			4,91	3,49	3,99	4,51	2,03		
<i>sp</i> 24							0,39		0,42	2,11	0,55		0,35	42,72	0,52	3,73	0,80	
<i>sp</i> 25							10,54					3,25			0,90			
<i>sp</i> 26		4,27		3,92		6,10					1,11	1,36		2,26	1,13			1,81
<i>sp</i> 27		2,50				0,49									1,64	0,62	0,48	0,68
<i>aeruginosa</i> 103		3,50				0,67	0,80	0,49	0,70	1,03			0,46	2,05	1,70	0,68		

(continúa)

Tabla 1. Perfiles de ácidos grasos de *Pseudomonas* (los valores se dan como porcentaje relativo).

<i>Pseudomonas</i>	3-OH 10:0	3-OH 11:0	2-OH 12:0	3-OH 12:1	3-OH 12:0	2-OH 13:0	2-OH 14:0	3-OH 14:0	2-OH 15:0	2-OH 16:1	2-OH 16:0	3-OH 16:0	2-OH 18:1	cyc 17:0	cyc 19:0	! 11:0
<i>aeruginosa</i> ATCC 9027	1.22		3.53		0.53		0.40		0.35	0.75	3.14		0.49		2.01	0.87
<i>aeruginosa</i> ATCC 10145	0.45			1.74	0.86	0.97	1.14	0.72						1.05	1.16	0.53
<i>sp. ATCC 39327</i>	2.09	1.35		0.62	4.34				2.70		0.47					1.03
<i>fluorescens</i>									2.74	1.84		22.33	3.00			
<i>aeruginosa</i> 17	0.80				2.77	1.32				1.99		4.21	3.20	1.35	0.63	
<i>aeruginosa</i> 18				0.68		0.69	0.77	0.78	1.4		6.5	8.04			0.7	0.78
<i>aeruginosa</i> 19	0.57				1.40	0.94		4.74	0.71		4.37	6.71		2.19	0.79	0.44
<i>aeruginosa</i> 20	0.61					2.87	0.62	0.64	2.18	7.11		1.11	10.71	0.63		0.45
<i>aeruginosa</i> 21	4.13		0.38					9.60	1.47			29.73		3.75		2.01
<i>aeruginosa</i> 22					0.98	0.55	1.04	2.14	2.12	8.18		0.63	0.84		3.27	3.54
<i>sp</i> 23	1.76						0.84	0.46	24.33	0.88		0.60	0.54	3.40	2.76	
<i>sp</i> 24		1.28	0.86			1.66	0.42		18.25	17.79		0.43	0.41		0.33	
<i>sp</i> 25	9.56								1.96	1.79		11.53	3.65			
<i>sp</i> 26	2.84				1.33		3.09		6.75	2.63	3.76					
<i>sp</i> 27					0.93				16.00	1.34		13.50	2.46			
<i>aeruginosa</i> 103	1.09	0.52			0.53		0.67	0.61	10.47	2.05		0.98	0.84		0.67	0.63

(continúa)

Tabla 1. Perfiles de ácidos grasos de *Pseudomonas* (los valores se dan como porcentaje relativo).

<i>Pseudomonas</i>	! 13:0	! 14:0	! 15:1	! 15:0	a 15:0	! 16:0	a 16:0	! 17:1	a 17:1	! 17:0	a 17:0	n-CH3 17:0	! 18:0	a 18:0	n-CH3 18:0	8,12,16-CH3 17:0	! 19:0	! 20:0
<i>aeruginosa</i> ATCC 9027					0,87	0,78	7,77	0,65		1,33	1,98	0,55			0,65		0,51	
<i>aeruginosa</i> ATCC 10145	4,55	15,28	1,01	4,71		5,74		0,81										
<i>sp. ATCC</i> 39327	0,74		0,81		0,38					25,29		1,75	0,90		0,68			
<i>fluorescens</i>		1,26						26,90		1,09				0,87	1,30	1,17		1,35
<i>aeruginosa</i> 17		1,27				0,63				28,03	1,16	0,85		1,95	1,48	1,27		1,82
<i>aeruginosa</i> 18			0,72	0,45	0,68		2,19			2,11	1,29	0,99	0,81	1,00	0,5	1,54		0,63
<i>aeruginosa</i> 19		0,83	0,46	0,42				22,53		1,39		0,79	0,46		1,35	0,96		
<i>aeruginosa</i> 20			1,00		0,45	0,88	0,48	15,30	0,77	1,86		3,57			1,55		1,40	1,25
<i>aeruginosa</i> 21		0,88				0,75		1,91	2,00							5,59		3,42
<i>aeruginosa</i> 22	3,44	2,22	0,81	9,09		2,06	1,22	1,41	2,80	5,05		1,38	1,60	1,46	0,62	1,00		
<i>sp</i> 23	6,63				7,81			1,06		1,19		3,91	0,48		2,55			
<i>sp</i> 24						1,96		0,39			0,71	1,58						
<i>sp</i> 25	0,87				0,88		2,93	18,20		0,95					0,83			
<i>sp</i> 26	1,58							24,19				12,93	3,75		1,20			
<i>sp</i> 27	0,57						2,90	33,14			0,89	0,46			0,92		0,71	
<i>aeruginosa</i> 103			3,29	0,38	0,44	0,87	0,51			29,47		17,30		2,92	3,12			

acuerdo con la comparación del valor de LCE con el valor obtenido para compuestos patrón o con los valores presentados en la literatura. En la tabla 1 también se presenta el porcentaje relativo de cada ácido. Se puede observar que en *Pseudomonas* se encuentran ácidos de cadena lineal, de cadena ramificada, hidroxiácidos, ácidos saturados e insaturados y ciclopropil ácidos, entre 10 y 20 átomos de carbono.

Hasta donde se tiene conocimiento, de los 53 ácidos grasos detectados, 17 es la primera vez que se identifican en *Pseudomonas* (en la tabla 1). De estos ácidos los más frecuentes (presentes en más del 62%) en las cepas estudiadas son los ácidos con estructuras metil ramificadas de 17 y 18 carbonos y el ácido 2-hidroxi pentadecanoico.

Los ácidos grasos característicos de especie, como 9-metil decanoico (i11:0), 13-metil tetradecanoico (i15:0) y el 15-metil heptadecanoico (a18:0) se encontraron en todos los aislados identificados bioquímicamente como *Ps. aeruginosa* y en las dos cepas de referencia, pero no se encontraron ni en la *P. fluorescens*, ni en los aislados *Pseudomonas* sp. Comparando estos resultados con los de la literatura (17, 18, 19, 21, 22, 23), vemos que los dos primeros (i11:0 y i15:0) están descritos como característicos de *P. maltophilia*, mientras que el tercero (a18:0) no tiene ningún antecedente. Estas diferencias pueden ser resultado de la interacción de los aislados con el medio ambiente del cual provienen.

Los hidroxiácidos, que son característicos en la clasificación taxonómica de *Pseudomonas*, se encontraron en todos

los perfiles en proporciones significativas estimadas entre el 5,88% y el 45,31%, principalmente los ácidos 3-hidroxi hexadecanoico (3-OH 16:0) y el 2-hidroxi pentadecanoico (2-OH 15:0); además los aislados nativos 18, 19, 26, *Ps. aeruginosa* ATCC 10145 y *Pseudomonas* sp ATCC 39327 mostraron un tipo especial de hidroxiácido ramificado el 2-hidroxi 14-metil pentadecanoico no reportado anteriormente. Los ácidos grasos 2-hidroxi 11-metil dodecanoico, 2-hidroxi 13-metil tetradecanoico y 3-hidroxi heptadecanoico característicos de algunas especies de *Pseudomonas maltophilia*, *P. alcaligenes*, *P. putida* y *P. multivorans*, no se encontraron en los aislados estudiados (17, 18, 19, 21, 22, 23).

En *Pseudomonas* los ácidos grasos ramificados se hallaron en altas proporciones. Se identificaron 19 diferentes de ácidos grasos ramificados iso, anteiso, y n-metil ramificados, siendo los más representativos: el 15-metil hexadecanoico (i17:1), el 15-metil hexadecanoico (i17:0) y el n-metil heptadecanoico. Los ácidos ciclopropanos 9-10 metilen hexadecanoico y 9-10 metilen octadecanoico, están presentes en bajas cantidades sólo en algunas de las cepas estudiadas.

La presencia de los ácidos grasos saturados, insaturados, hidroxilados y ramificados desempeñan un papel estructural importante como constituyentes de la membrana controlando su fluidez. Los dos primeros son característicos de todas las bacterias, mientras que los ramificados se presentan especialmente en bacterias gram positivas y algunas gram negativas (familia Pseudomonadaceae) mientras que los hidroxilados son propios de *Pseudomonas* y *Serratia*, lo cual los



hace marcadores moleculares de estos dos géneros bacterianos; además son de utilidad en estas *Pseudomonas* como mecanismo de defensa temporal contra el aumento de fluidez producido por compuestos orgánicos, como es el caso de la contaminación con petróleo, para mantener su viabilidad y actividad biológica sobre los mismos (24).

Todas las cepas estudiadas presentaron en común ácidos grasos hidroxilados, lo cual permite asegurar que pertenecen a una misma unidad taxonómica. Sin embargo los perfiles cromatográficos presentan diferencias en cuanto a tipo y abundancia de señales; por tanto los aislados corresponden a microorganismos diferentes. Las diferencias cualitativas encontradas en los perfiles de ácidos grasos permitieron en primera instancia la diferenciación de los aislados, lo que no coincide con resultados obtenidos en trabajos similares, en los que la diferenciación de microorganismos de la misma especie sólo era posible con base en las diferencias cuantitativas.

Los aislados en estudio tienen perfiles de ácidos grasos complejos (ramificados e hidroxilados) y diferentes (cuali y cuantitativamente). Lo anterior puede ser producto de su permanente contacto con agentes xenobióticos (petróleo crudo) que inducen cambios en la composición de los ácidos grasos de estos aislados, dándole la posibilidad de sobrevivir en estos ambientes contaminados con petróleo, lo cual explica por qué los aislados nativos presentan composiciones de ácidos grasos muy complejas.

## Análisis Cluster

Con los resultados obtenidos (diferencias cualitativas y cuantitativas) se elaboraron gráficas de los dendrogramas representados como distancias euclidianas, que son una medida del grado de semejanza (a menor distancia, menor diferencia) de las unidades por clasificar.

La figura 1 representa el dendrograma general de relaciones de todos los ácidos grasos. Al realizar un corte a una distancia euclidiana de 11.4, se observan dos agregados principales: el primero, formado por los aislados de *Pseudomonas* sp 25, 27 y ATCC 39327 (identificada en el cluster con el número 3), *Ps. aeruginosa* 17 y *Ps. fluorescens* (identificada en el cluster con el número 4) y el segundo agregado constituido por los aislados de *Pseudomonas aeruginosa* 18 y 19.

En el primer agregado (I) todos tienen en común el ácido n-metil de 18 carbonos; a su vez se divide en dos subgrupos (IA y IB) el IA esta conformado por la *Ps. aeruginosa* 17 y la *Pseudomonas* sp ATCC 39327 parecidas en los ácidos undecanoico, 3-hidroxi decanoico, 3-hidroxi dodecanoico, 15-metil hexadecanoico y n-metil heptadecanoico; el subgrupo IB, constituido por *Pseudomonas* sp 25 y 27 y la *Ps. Fluorescens*, mantiene en común los ácidos heptadecenoico, 2-hidroxi hexadecenoico, 3-hidroxi hexadecenoico y n-metil octadecanoico en bajos niveles, 2-hidroxi hexadecanoico y 15-metil hexadecenoico en niveles altos y el ácido 2-hidroxi pentadecanoico encontrado en un 16,0% en *Pseudomonas* sp 27 y niveles bajos para las otras dos; la mayor divergencia se presenta por la ausencia del ácido hexadecanoico en la *Pseudomonas* sp

27, el cual está presente en altos niveles en las otras dos.

El segundo agregado conformado por los aislados *Ps. aeruginosa* 18 y 19, los cuales difieren por la ausencia del ácido graso pentadecenoico en este último, y por la gran diferencia en cuanto al contenido del ácido hexadecanoico (13,43% y 2,52% respectivamente) y del ácido octadecanoico (5,8% y 12%, respectivamente). Las semejanzas se presentan con relación a los hidroxiacidos (2-hidroxi tridecanoico, 3-hidroxi tetradecanoico, 2-hidroxi pentadecanoico, 2-hidroxi hexadecanoico y 2-hidroxi 14-metil pentadecanoico) y los ramificados (9-10 metilen octadecanoico, 9-metil decanoico, 13-metil tetradecanoico, 13-metil tetradecenoico, 15-metil hexadecanoico, entre otros).

Las otras especies de *Pseudomonas* se unen individualmente a los dos agregados anteriores; esto se presenta porque cada

uno de los aislados tiene diferencias importantes cuali y cuantitativas en su composición de ácidos grasos. Por ejemplo, la *Ps. aeruginosa* 20 se une a los agregados I y II a una distancia un poco mayor debido a la presencia del ácido 2-hidroxi hexadecenoico en una proporción mayor a los agregados anteriores; la *Ps. aeruginosa* 103 se aleja por tener el ácido 13-metil tetradecenoico, el n-metil heptadecanoico y n-metil octadecanoico como principales componentes en un alto porcentaje con respecto a los demás, también, por la ausencia del 15-metil hexadecenoico.

La mayor distancia se encuentra entre la *Ps. aeruginosa* ATCC 9027 y la *Ps. aeruginosa* 17, las cuales presentan discrepancias en el contenido total de ácidos grasos saturados, insaturados y ramificados. En la *Ps. aeruginosa* ATCC 9027 los ácidos saturados están en una proporción de 33,08%, fundamentalmente de 12 y 16

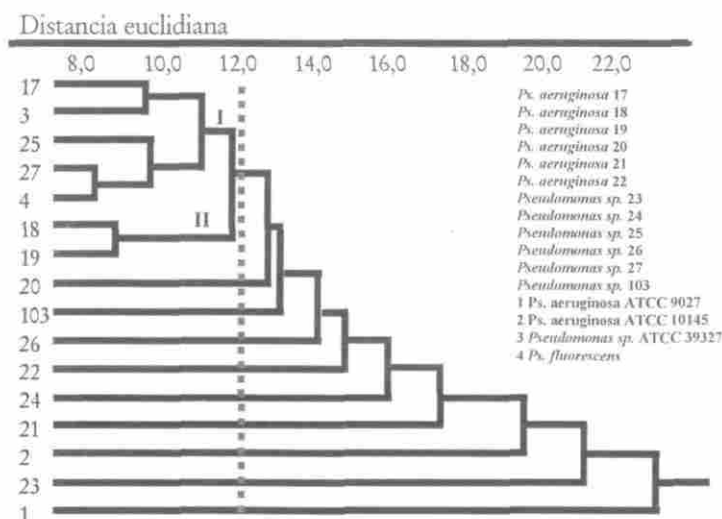


Figura 1. Dendrograma de las *Pseudomonas* spp. Basado en los perfiles de los ácidos grasos celulares.

carbonos; 37,03% para los insaturados, predominantemente de 16 y 18 carbonos y un 15,96% para los ramificados, principalmente el anteiso de 16 carbonos; mientras que el aislado de *Ps. aeruginosa* 17 tiene un 9,07% de ácidos grasos saturados, esencialmente de 11 y 16 carbonos; un 4,22% de insaturados, especialmente el de 17 carbonos; ácidos grasos ramificados en un 38,36%, primordialmente el iso de 17 carbonos.

Para establecer la influencia de los ácidos grasos ramificados y los hidroxiácidos en la clasificación, se construyeron adicionalmente 2 dendrogramas de acuerdo con el tipo de ácido graso. En el dendrograma de la figura 2 se ven tres grupos importantes al realizar un corte a una distancia euclidiana de 5,5; el primer grupo por los aislados nativos de *Ps. aeruginosa* 17 y 3; el segundo grupo por *Ps. aeruginosa* 25, 27 (subgrupo IIA) *Ps. fluorescens* 4 y *Ps. aeruginosa* 18 (subgrupo IIB) y el tercer grupo por los aislados nativos de *Ps. aeruginosa* 19 y 20.

El primer grupo aislado de muestras líquidas de petróleo de la ciénaga 6 del Complejo Industrial de Barrancabermeja, tiene la capacidad de degradar hidrocarburos (antraceno, fenantreno) y dibenzotiofeno (DBT). Se distingue por tener niveles importantes de los ácidos 2-hidroxi tridecanoico, 2-hidroxi hexadecenoico, 2-hidroxi hexadecanoico, 2-hidroxi octadecenoico y 3-hidroxi decanoico, con respecto a las otras *Pseudomonas*. Sin embargo, presenta marcadas diferencias cualitativas en los ácidos grasos 3-hidroxi dodecanoico, 2-hidroxi tetradecanoico, 3-hidroxi tetradecanoico y el 2-hidroxi pentadecanoico presentes en sólo una de ellas y cuantitativas reflejadas en el conte-

nido total de hidroxiácidos, 15,64% en la *Ps. aeruginosa* 17 y 26,48% en la *Ps. aeruginosa* 20.

El segundo agregado, constituido por los subgrupos IIA y IIB, se caracteriza por tener altos niveles del 2-hidroxi pentadecanoico, bajos niveles del 2-hidroxi hexadecenoico, 2-hidroxi hexadecanoico y el 3-hidroxi hexadecanoico y la habilidad de desulfurizar dibenzotiofeno; además, el subgrupo IIA conformado por las *Ps. aeruginosa* 25 y 27 que degradan antraceno, fenantreno exhibe niveles medios de los ácidos 2-hidroxi tetradecanoico, 3-hidroxi tetradecanoico y el 3-hidroxi dodecanoico, a diferencia del IIB que tiene el 3-hidroxi decanoico y el 3-hidroxi 9-metil decanoico.

El último grupo se forma a una distancia euclidiana de 4,20 entre las *Ps. aeruginosa* 19 y 20, que se aislaron de muestras líquidas de petróleo de la ciénaga 6 del Complejo Industrial de Barrancabermeja, las cuales tienen en común el contenido total de hidroxiácidos, 18,86% y 19,44% respectivamente, en especial de los ácidos 2-hidroxi 14-metil pentadecanoico, 2-hidroxi tridecanoico, 3-hidroxi tetradecanoico, el 2-hidroxi pentadecanoico y el 3-hidroxi hexadecanoico, con algunas diferencias cualitativas y la capacidad de degradación de hidrocarburos (fenantreno y antraceno) y DBT.

Las *Pseudomonas* de referencia presentan diferencias cualitativas entre sí en los ácidos grasos 2-hidroxi dodecanoico, 2-hidroxi pentadecanoico, 2-hidroxi hexadecenoico, 2-hidroxi 14-metil pentadecanoico y el 2-hidroxi octadecenoico presentes en la *Ps. aeruginosa* ATCC 9027 y el 3-hidroxi dodecanoico, el 2-hidroxi tri-

## Distancia euclidiana

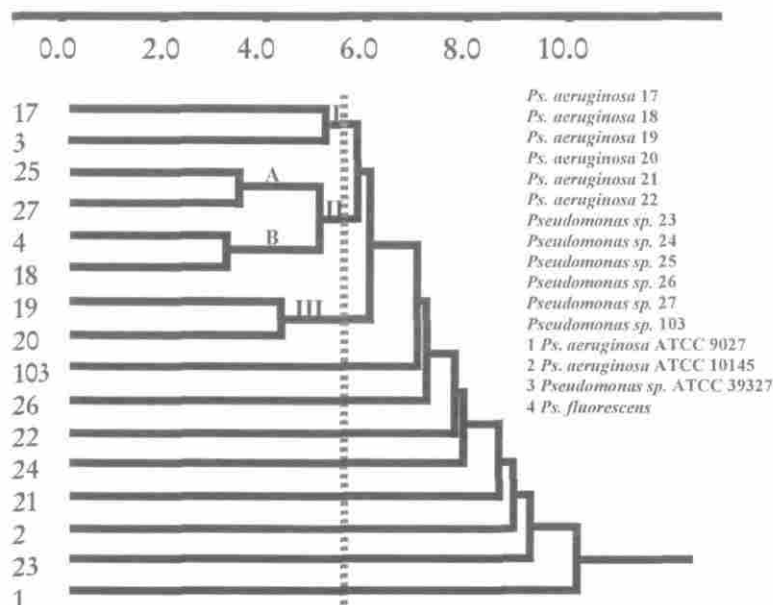


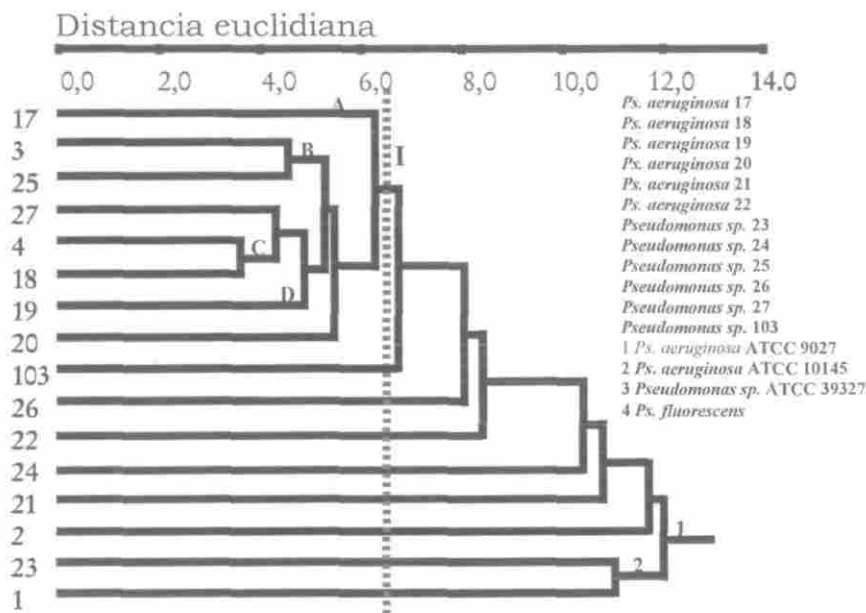
Figura 2. Dendrograma de las *Pseudomonas* spp. Basado en los perfiles de los hidroxiácidos.

decanoico y el 3-hidroxi tetradecanoico en la *Ps. aeruginosa* ATCC 10145, entre los cuales, hasta donde se conoce no han sido reportados en la literatura el 2-hidroxi tridecanoico, el 2-hidroxi 14-metil pentadecanoico y el 2-hidroxi pentadecanoico. Las *Pseudomonas* restantes se van uniendo al cluster principal de manera individual a distancias diferentes. La mayor distancia se encuentra entre las *Ps. aeruginosa* 17 y 21, cuyos perfiles presentan variaciones importantes en el contenido total de hidroxiácidos, que en *Ps. aeruginosa* 21 es de 45,39%, mientras que el aislado nativo de *Ps. aeruginosa* 17 tiene un 15,64%, especialmente el 2-hidroxi hexadecanoico.

Al cortar el dendrograma de la figura 3 (construido transformando las diferencias

cualitativas y cuantitativas encontradas en los perfiles de ácidos grasos ramificados en distancias euclidianas) a una distancia euclidiana de 6,5 se observa un aglomerado principal formado por cuatro subgrupos: el subgrupo A, constituido por la *Ps. aeruginosa* 17; el subgrupo B, por la *Pseudomonas* sp. ATCC 39327 y la *Pseudomonas* sp. 25; el subgrupo C, por la *Pseudomonas* sp. 27, *Ps. fluorescens* 4 y la *Ps. aeruginosa* 18, y el subgrupo D, constituido por la *Ps. aeruginosa* 19.

Los microorganismos que presentan menor diferencia son la *Ps. aeruginosa* 18 y la *Ps. fluorescens* (subgrupo IC); se caracterizan por niveles altos del ácido 15-metil hexadecenoico, en menor grado, los ácidos 15-metil hexadecanoico y



**Figura 3.** Dendrograma de las *Pseudomonas* spp. Basados en los perfiles de los ácidos grasos ramificados.

n-metil octadecanoico; además, no presentan ácidos grasos con ciclopropanos; los aislados de *Pseudomonas* sp 25 y *Pseudomonas* sp ATCC 39327 (subgrupo IB), y la *Ps. aeruginosa* 19 (subgrupo ID) cuentan con una composición similar; adicional a los anteriores, la *Ps. aeruginosa* 19 presenta los dos ciclopropanos. Todos los subgrupos anteriores son similares a la *Ps. aeruginosa* 17 en el alto contenido de iso de 17 carbonos y en el ácido n-metil octadecanoico.

Las *Pseudomonas* de referencia presentan diferencias cualitativas en los ácidos 12-metil tetradecanoico, 14-metil pentadecanoico, 15-metil hexadecanoico, 17-metil octadecanoico y n-metil de 17 y 18 carbonos, que están presentes sólo en la *Ps. aeruginosa* ATCC 9027; el ciclo de 17 carbonos, el 11-metil dodecanoico, el

13-metil tetradecanoico y el 13-metil tetradecanoico presentes en la *Ps. aeruginosa* ATCC 10145, de los cuales el 13-metil tetradecanoico, el 17-metil octadecanoico y n-metil de 17 y 18 carbonos no se han reportado en la literatura hasta donde se conoce.

En los dendrogramas podemos observar que las diferencias entre los aislados son pequeñas probablemente porque todas éstas proceden de muestras de petróleo crudo tomadas del Centro de Producción del Complejo Industrial de Barrancabermeja. Éstas se encuentran relacionadas con la *Ps. fluorescens*, especialmente las *Pseudomonas* sp 25 y 27.

Los aislados de *Ps. aeruginosa* 17, 18, 19, 20, 21, 22 y 103 y las cepas de referencia de *Ps. aeruginosa* ATCC 9027 y

10145, presentan diferencias importantes con respecto a la literatura (17), (18), (19), (21), (22), (23) para esta especie, lo que confirma que existen diferencias entre ellas, que se trata de diferentes microorganismos del mismo género y especie. Estas diferencias se pueden deber a que las cepas reportadas en la literatura son aislados provenientes de clínicas o de ambientes no modificados, cosa diferente a las cepas que estamos estudiando, las cuales provienen de ambientes muy contaminados, que generan cambios en los microorganismos, los cuales son necesarios para su supervivencia y desarrollo.

Comparando los resultados obtenidos con una clasificación de *Pseudomonas* realizada con base en perfiles de ADN (6) se encuentran asociaciones similares, mostrando estrechas relaciones entre *Ps. aeruginosa* y *Ps. fluorescens*.

En un trabajo previo (4) los aislados de *Pseudomonas* sp. 25 y 27 bioquímicamente podrían ser *Ps. fluorescens* o *Ps. putida*. Debido a que se agruparon en un mismo cluster la *Ps. fluorescens* y los aislados 25 y 27, podríamos catalogar estos dos como *Ps. fluorescens*, por lo que el perfil de ácidos grasos se convierte en una técnica complementaria para definir el grupo taxonómico. Los aislados de *Pseudomonas* sp ATCC 39327, 23, 24 y 26 están asociados a las *Ps. fluorescens* y *Ps. aeruginosa*; sin embargo, con los resultados obtenidos no podemos catalogarlas en alguna de las dos especies.

## CONCLUSIONES

1. No se pudo establecer una característica común en todas las *Pseudomonas* de estudio. Sin embargo, existen algunos

ácidos grasos comunes presentes en la mayoría de ellas.

2. El hallazgo de los ácidos grasos ramificados: i 15:1, a 16:0, a 17:1, n-CH<sub>3</sub> 17:0, i 18:0, a 18:0, n-CH<sub>3</sub> 18:0, 8,12,16-CH<sub>3</sub> 17:0, i 19:0 y i 20:0; hidroxiácidos 2-OH 13:0, 2-OH 15:0 y 2-OH 16:0; monoinsaturados 14:1, 19:1 y 20:1 y el saturado 20:0, no reportados anteriormente en la especie, constituyen un aporte importante en la diferenciación de *Pseudomonas*.

3. Las diferencias cualitativas y cuantitativas en los ácidos grasos saturados, insaturados, ramificados e hidroxilados permitieron la diferenciación de las *Pseudomonas aeruginosa* 17, 18, 19, 20, 21, 22, 103, ATCC 9027 y ATCC 10145 y las *Pseudomonas* sp. 23, 24, 25, 26, 27 y ATCC 39327.

4. La utilización de perfiles de ácidos grasos hizo posible la diferenciación de especies de *Pseudomonas*, aportar en su caracterización fenotípica y precisar la relación existente en la *Pseudomonas* sp ATCC 39327 con las especies *aeruginosa* y *fluorescens*. En general se puede concluir que en los aislados y cepas de referencia existen en tres grupos diferentes estrechamente relacionados *Ps. aeruginosa*, *Ps. fluorescens* y *Pseudomonas* sp.

5. El análisis de ácidos grasos celulares tiene importantes ventajas desde el punto de vista de manejo y discriminación comparado con las pruebas bioquímicas convencionales, ya que se lograron establecer diferencias entre los aislados que mediante las pruebas bioquímicas no eran evidentes, sin embargo, los dos son necesarios en el proceso de caracterización. Lo anterior nos permitió implementar una herramienta

ta de caracterización molecular y conocer más a fondo nuestra biodiversidad.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado con recursos del Fondo para el Desarrollo de la Educación Superior FODESEP.

Se agradece la valiosa colaboración del Laboratorio de Aromas del Departamento de Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Grady, C.P. (1985). Biodegradation: Its measurement and microbiological basis. *Biotechnology and Bioengineering*. 27, 660-674.
2. Mortimer, G., Heinz, S. and Hans, G. (1986). *The prokaryotes, a handbook on habitats, isolation and identification of bacteria*. Springer-Verlag. Alemania.
3. Acosta A. C. (1996). *Desulfurización de dibenzotiofeno a partir de Pseudomonas nativas y la cepa ATCC 39327 como primera etapa en la eliminación de azufre en combustibles*, Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Química. Santafé de Bogotá.
4. Araújo S., Barajas G. (1997). *Determinación de la capacidad biotransformadora de azufre orgánico por aislados nativos de Pseudomonas spp.* Colegio Mayor de Cundinamarca. Programa de Bacteriología. Santafé de Bogotá D.C.
5. Krieg, R. N., Hoh, J. (1984). *Systematic Bacteriology of Bergey's*, Williams and Wilkins Eds. USA.
6. Logan, N. (1994). *Bacterial Systematic*, Blackwell Scientific Publications Oxford.
7. Veys A., Callewaert, W., Waelkens, E., Van de Abbelle. (1989). Application of gas-liquid chromatography to the routine identification of nonfermenting-gram negative bacteria in clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, pp. 1538-1542.
8. Welch, D. (1991). Applications of cellular fatty acid analysis. *Clinical Microbiology Reviews*. 4(4) 422-438.
9. Allen, J. A., Siders, J. A., Riddell, M. J., Fill, J. A., Wegener, W. S. (1995). Cellular Fatty Acid Analysis in the differentiation of *Clostridium* Species in the Clinical Microbiology Laboratory. *Clinical Infectious Diseases*. 20, S198-S201.
10. Anderson J., Korver J., Luchsinger Y. (1994). Use the fatty acids (Microbial Identification System) for the identification of *Clostridium difficile*. *Clinical Infectious Diseases*. 20, (suppl. 2) S202.
11. O'Donnell A. G., Goodfellow M., Minnikin D. E. (1982). Lipids in the classification of Nocardioidea: Reclassification of *Arthrobacter simplex* (Jensen) Lochhead in the genus Nocardioidea (Prauser) renamed as *Nocardioidea simplex* comb. *Archives of Microbiology*. 133, 323-329.
12. O'Donnell, A. G., Nahaie, M. R., Goodfellow, M., Minnikin, D. E.,

- Hajek, V. (1985). Numerical Analysis of Fatty Acid Profiles in the Identification of Staphylococci. *Journal of General Microbiology*. 131, 2023-2033.
13. Birnbaum, D., Herwaldt, L., Low, D. E., Noble, M., Pfaller, M., Sherertz, R., Crow, A. W. (1994). Efficacy of Microbial Identification System for Epidemiologic Typing of Coagulase-Negative Staphylococci *Journal of Clinical Microbiology*. 32, 2113-2119.
  14. Rabon, M., Upegui E. (1996). Tesis de Grado. Departamento de Farmacia. Universidad Nacional de Colombia.
  15. Microbial I. D. Inc. (1995). *Microbial Identification System Operating Manual Version 4*. Microbial I. D. Inc., Newark, Del.
  16. UNESCO. (1996). *IDAMS User Manual* part I, II y III.
  17. Dees, S. B., Moss, C. W., Hollis, D., Weaver, R. E. (1979). "Cellular Fatty Acids Composition of *Pseudomonas paucimobilis* and group II K-2, Ve-1, Ve-2. *Journal of Clinical Microbiology*. 10(2), 206-209.
  18. Gill, C. O. (1977). Suisted, J. The effects of temperature and growth rate on the proportion of unsaturated fatty acids in bacterial lipids. *Journal of General Microbiology*. 104, 31-36.
  19. Lipski, A., Klatte, S., Bernd, B., Karlheinz, A. (1992). Differentiation of gram negative, non fermentative bacteria isolated from biofilters on the basis of Fatty Acid composition, quinone system and physiological reaction profiles. *Applied and Environmental Microbiology*. 58(6), 2053-2065.
  20. Madico, G., Akopyants, N., Breg, D. (1995). Arbitrarily primed PCR DNA Fingerprinting of *Escherichia coli* strains by using templates from boiled cultures. *Journal of Clinical Microbiology*. 33, 1534-1536.
  21. Moss, C. W., Samuels, S. B., Weaver, R. E. (1973). The fatty acids of *Pseudomonas Multivorans*. *Pseudomonas cepacia*. *Pseudomonas kKingii*. *Journal of General Microbiology*. 74, 275-279.
  22. Moss, C. W., Samuels, S. B., Weaver, R. E. (1964). Cellular acid fatty composition of selected *Pseudomonas* species. *Applied Microbiology*. 24, 596-598.
  23. Osterhout, G., Shull, V., Dick, J. (1991). Identification of clinical isolates of gram negative non fermentative bacteria by an automated cellular fatty acid identification system. *Journal of Clinical Microbiology*. 29(9) 1822-1830.
  24. Baer, S. H., Blasher, H., Smith, T. L. (1987). Effect of butanol challenge and temperature on lipids composition and membrane fluidity of butanol tolerant *Clostridium acetobutylcum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 53 (12) 2854-2861.