



# La cromatografía gas-líquido con espectrometría de masas en la identificación de levaduras

Fernando Paredes Salido, José Mira Gutiérrez, Primitivo Sasián Macías y Pedro García-Martos

Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Cádiz, España

## Resumen

Los métodos basados en la cromatografía gaseosa se han usado para la identificación de levaduras. De acuerdo con el conocimiento de los patrones obtenidos por este método, hemos sometido a cromatografía y espectrometría de masas, a 44 cepas pertenecientes a 16 géneros y 21 especies de levaduras de colección, identificando los correspondientes picos de 22 ésteres metílicos de ácidos grasos mediante los correspondientes patrones y la confirmación de pesos moleculares por espectrometría de masas. El coeficiente de correlación fue de 0,848965. La técnica cromatográfica parece ser de gran utilidad para la determinación de lipidotipos.

## Palabras clave

Cromatografía gas-líquido, Espectrometría de masas, Lipidotipo, Levaduras

## The gas-liquid chromatography with mass spectrometry for the identification of yeasts

## Summary

Methods based on gas chromatography, have been used for identification of the yeasts. In order to know the value of the patterns obtained by this method, we have used this technique and mass spectrometry on 44 strains belonging to 16 genus and 21 species of collection yeasts, identifying the corresponding peaks to 22 fatty acids methyl esters by means of the reaction times of the corresponding standards and the confirmation of molecular weigh by mass spectrometry. The correlation coefficient was of 0.848965. The chromatographic technique seems of great utility for the determination of lipidotypes.

## Key words

Gas-liquid chromatography, Mass spectrometry, Lipidotype, Yeasts

En la taxonomía de las bacterias, hongos y levaduras, se han utilizado numerosos criterios de clasificación, que aún hoy continuamos utilizando, tales como la morfología, fisiología, actividad enzimática sobre substratos, estructura antigénica y otros recursos que se han ido acumulando empíricamente durante años. Estos criterios han sido muy valiosos para el investigador, pero en tiempos más recientes, en relación con las tecnologías clásicas, se han incorporado otras nuevas, como la quimiota-xonomía, que analiza caracteres específicos de composición química relativos a la estructura de la pared microbiana o de

otros compartimentos celulares para su identificación y clasificación [1,2], y fundamentalmente las técnicas que determinan el polimorfismo de los ácidos nucleicos [3,4].

En el caso de las levaduras, los estudios quimiota-xonómicos se centran, en la mayor parte de los casos, en polisacáridos como la quitina, quitosano, celulosa, glucanos, mananos, o bien en esteroleos estructurales, como el ergosterol y su precursor el zimosterol [5]. Algunos autores han sugerido el estudio de los ésteres metílicos de los ácidos grasos, utilizando la cromatografía en sus diferentes modalidades [6,7]. Los detectores más utilizados en cromatografía de gases son los de ionización de llama, de captura electrónica, de conductividad térmica, de densidad o viscosidad de gases, potenciométrico, o el más selectivo, el espectrómetro de masas [8,9].

Autores como el-Sharkawy [10] y Rezanka [11], estudian los ésteres metílicos de ácidos grasos, fundamentalmente del ácido palmítico en *Sacharomyces cerevisiae* y *Schizosacharomyces octosporus*, utilizando detector de espectrometría de masas.

En este trabajo hemos sometido a cromatografía gas-líquido y espectrometría de masas a 44 cepas de levaduras pertenecientes a 16 géneros y 21 especies, identificando los correspondientes picos de 22 ésteres metílicos de ácidos grasos.

## Dirección para correspondencia:

Dr. Fernando Paredes Salido  
C/ Padilla, nº2, A  
11100 San Fernando, Cádiz, España  
Tel.: +34 956 592 792; Fax: +34 956 897 818

Aceptado para publicación el 25 de Enero de 2001

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se han estudiado 44 cepas de levaduras, la mayoría de colección, pertenecientes a 16 géneros y 21 especies. En la tabla 1 se reflejan las cepas ensayadas.

El cromatógrafo utilizado fue un Perkin-Elmer modelo 6800, con detector de ionización de llama, inyección en *split* y sistema de registro integrado. La columna fue de *aluminium-oad* BP-1 (Perkin-Elmer Hispania). El cromatógrafo de gases con detector de masas fue un modelo Finnian Voyager GC 8000 Top, dotado con una columna DB1 de 60 metros de longitud y 0,25 micras de diámetro.

Los métodos de esterificación fueron dos: el procedimiento de metanolisis ácida descrito por Luquin y colaboradores [13], y el empleado por Wayne Moss y colaboradores [12].

En todas las cepas se investigaron los ésteres metílicos de los 22 ácidos grasos siguientes: ácido dodecanoico (C12:0), tridecanoico (C13:0), tetradecanoico (C14:1), tridecanoico (C14:0), pentadecanoico (C15:0), hexadecanoico (C16:1), hexadecanoico (C16:0), heptadecanoico (C17:1), heptadecanoico (C17:0), octadecanoico (C18:2), octadecanoico (C18:1), octadecanoico (C18:0), nonadecanoico (C19:1), nonadecanoico (C19:0), eicosanoico (C20:1), eicosanoico (C20:0), eneicosanoico (C21:0), docosanoico (C22:1), docosanoico (C22:0),tricosanoico (C23:0), tetracosanoico (C24:1) y tetracosanoico (C24:0).

Para ver la trazabilidad y la incertidumbre del método utilizado, se repitieron varias veces las cepas, o bien se realizaron los cromatogramas de especies iguales pero correspondientes a cepas de distinta procedencia. También se ensayaron distintas temperaturas para detectar procesos de pirólisis. El método OK utiliza una temperatura de inyección de 225°C, y del detector de 230°C, mientras que en el método denominado MYC la temperatura del inyector es de 325°C, y la del detector de 340°C.

Las levaduras se cultivaron todas en medio de Saboureaud con cloranfenicol, en aerobiosis y a una temperatura comprendida entre 22-25°C.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 2 se recogen los resultados obtenidos en las 44 cepas analizadas por cromatografía con relación a los 22 ésteres metílicos de ácidos grasos investigados. Los resultados fueron sometidos a un proceso de taxonomía numérica, que dio lugar al dendrograma de la figura 1, elaborado según el agrupamiento *Simple-matching Group average clustering*, con un coeficiente de correlación de 0,848965.

Se ha realizado un estudio quimiotaxonómico de los ésteres metílicos estructurales de las levaduras, por un proceso químico (esterificación), seguido de un proceso físico (separación cromatográfica de los mismos) en un espacio de tiempo corto, con un coste bajo y con el concurso de técnicas de taxonomía numérica, que da lugar al dendrograma elaborado según el agrupamiento citado anteriormente.

Se observa, que los ácidos grasos más comunes en las especies estudiadas, son el hexadecanoico y el hexadecanoico, y los que se encuentran en menor número de especies, el ácido eneicosanoico y el tetracosanoico.

Se observa que el máximo de similitud es del 55%. La capacidad discriminatoria de géneros y/o especies con esta técnica responde a los siguientes criterios generales, en las cepas de una misma especie: las cinco cepas de *Candida guilliermondii* se agruparon en un taxón con un

**Tabla 1.** Cepas de levaduras sometidas a cromatografía gaseosa y espectrometría de masas

Géneros y especies	Procedencia
<i>Candida albicans</i>	CECT1002
<i>Candida albicans</i> 1	CECT1392
<i>Candida albicans</i> 2	CECT1439
<i>Candida albicans</i> 3	CECT1439
<i>Candida albicans</i> 4	CECT1677
<i>Candida albicans</i> 5	CECT1687
<i>Candida guilliermondii</i>	CECT1020
<i>Candida guilliermondii</i> 1	CECT1021
<i>Candida guilliermondii</i> 2	CECT1170
<i>Candida guilliermondii</i> 3	CECT1387
<i>Candida guilliermondii</i> 4	CECT1438
<i>Candida kefir</i>	CECT1436
<i>Candida tropicalis</i>	CECT1005
<i>Candida tropicalis</i> 1	CECT1400
<i>Candida tropicalis</i> 2	CECT1427
<i>Candida tropicalis</i> 3	CECT1688
<i>Cryptococcus neoformans</i>	CECT1078
<i>Debaryomyces polymorphus</i>	CECT1132
<i>Dipodascus magnusii</i>	CECT1453
<i>Geotrichum lactis</i>	CECT1360
<i>Hortaea werneckii</i>	Muestra clínica
<i>Myxozyma melibiosii</i>	CECT1104
<i>Pichia anomala</i>	CECT1110
<i>Pichia membranaefaciens</i>	CECT1115
<i>Pichia membranaefaciens</i> 1	CECT1115
<i>Pichia membranaefaciens</i> 2	CECT1473
<i>Pichia membranaefaciens</i> 3	CECT1473
<i>Pichia subpelliculosa</i>	CECT1118
<i>Pichia subpelliculosa</i> var. <i>jerezana</i>	CECT1116
<i>Pichia subpelliculosa</i> var. <i>jerezana</i> 1	CECT1116
<i>Pichia subpelliculosa</i> var. <i>Jerezana</i> 2	CECT1117
<i>Pichia subpelliculosa</i> var. <i>jerezana</i> 3	CECT1117
<i>Rhodotorula rubra</i>	CECT1158
<i>Rhodospodium toruloides</i>	CECT1499
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CECT1170
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CECT1319
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CECT1320
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CECT1347
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CECT1384
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CECT1588
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	CECT1376
<i>Sporopachidermia lactativora</i>	CECT1094
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	CECT1450
<i>Zygosaccharomyces veronae</i>	CECT1679

\* CECT = Colección Española de Cultivos Tipo.

rango de similitud del 79-100%, pudiéndose en principio considerar la existencia de cuatro lipidotipos; las cuatro cepas de *Pichia subpelliculosa* var. *jerezana* se agruparon en un mismo taxón con 95% de similitud y dos lipidotipos, uno de los cuales se sale del taxón; las seis cepas de *Candida albicans* aparecen agrupadas en el mismo taxón con un rango de similitud del 88-96% y tres lipidotipos: las cuatro cepas de *Pichia membranaefaciens* se agrupan en un mismo taxón con elevada similitud y un lipidotipo; igual ocurre con las cuatro cepas de *Candida tropicalis*, agrupadas en un solo taxón y con un solo lipidotipo; *Saccharomyces cerevisiae*, en cambio, presenta tres lipidotipos en las seis cepas estudiadas.

De las analizadas como cepa única, *Candida kefir* es la más diferenciada del grupo, con una similitud del 55%. *Geotrichum lactis* prácticamente está integrada en el taxón de *C. guilliermondii*. *R. toruloides* se diferencia bien, así como *Cryptococcus neoformans*, *Debaryomyces polymorphus* y *Rhodotorula rubra*. Igual ocurre con *Zygosaccharomyces veronae*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Sporopachidermia lactativora*, con similitudes que van desde el 78 al 96%. *Myxozyma melibiosii* y *Torulaspota delbrueckii*, se encuentran bien diferenciadas. Finalmente *Dipodascus magnusii* y *Hortaea werneckii*, poseen un grado de similitud, que va del 60 al 76%.

**Tabla 2.** Ésteres metílicos de 22 ácidos grasos en 44 cepas de levaduras.

Acidos grasos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
<i>Candida albicans</i>	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans 1</i>	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans 2</i>	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans 3</i>	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans 4</i>	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans 5</i>	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Candida guilliermondii</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-
<i>Candida guilliermondii 1</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-
<i>Candida guilliermondii 2</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
<i>Candida guilliermondii 3</i>	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-
<i>Candida guilliermondii 4</i>	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-
<i>Candida kefyr</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
<i>Candida tropicalis</i>	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida tropicalis 1</i>	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida tropicalis 2</i>	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida tropicalis 3</i>	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cryptococcus neoformans</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Debaromyces polymorphus</i>	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-
<i>Dipodascus magnusii</i>	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Geotrichum lactis</i>	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-
<i>Hortae werneckii</i>	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-
<i>Myxozyma melibiosi</i>	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pichia anomala</i>	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Pichia membranaefaciens</i>	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pichia membranaefaciens 1</i>	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pichia membranaefaciens 2</i>	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pichia membranaefaciens 3</i>	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pichia subpelliculosa</i>	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Pichia subpelliculosa jer</i>	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>Pichia subpelliculosa jer. 1</i>	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>Pichia subpelliculosa jer. 2</i>	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>Pichia subpelliculosa jer. 3</i>	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Rhodospidium toruloides</i>	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+
<i>Rhodotorula rubra</i>	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae 1</i>	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae 2</i>	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae 3</i>	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae 4</i>	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae 5</i>	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Sporopachydermia lactativora</i>	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Torulopsis delbrueckii</i>	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Zigosaccharomyces veronae</i>	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-

1 = ácido dodecanoico (C12:0), 2 = tridecanoico (C13:0), 3 = tetradecanoico (C14:1), 4 = tridecanoico (C14:0), 5 = pentadecanoico (C15:0), 6 = hexadecanoico (C16:1), 7 = hexadecanoico (C16:0), 8 = heptadecanoico (C17:1), 9 = heptadecanoico (C17:0), 10 = octadecanoico (C18:2), 11 = octadecanoico (C18:1), 12 = octadecanoico (C18:0), 13 = nonadecanoico (C19:1), 14 = nonadecanoico (C19:0), 15 = eicosanoico (C20:1), 16 = eicosanoico (C20:0), 17 = eneicosanoico (C21:0), 18 = docosanoico (C22:1), 19 = docosanoico (C22:0), 20 =tricosanoico (C23:0), 21 = tetracosanoico (C24:1), 22 = tetracosanoico (C24:0).

Todas las cepas de un determinado agrupamiento, se caracterizan por la presencia de uno o de varios ácidos grasos comunes en su estructura.

## DISCUSIÓN

La elección de la columna es muy importante para el análisis cromatográfico. Las características de eficiencia, bajo sangrado, duración de la columna e inercia química, son necesarias para obtener separaciones de alto rendimiento y resultados reproducibles. Por los óptimos resultados alcanzados en nuestra experiencia, se propone la elección de columnas capilares de 12-15 metros de longitud y 0,22  $\mu\text{m}$  de diámetro, para la separación cualitativa y cuantitativa de ésteres metílicos de las levaduras ensayadas.

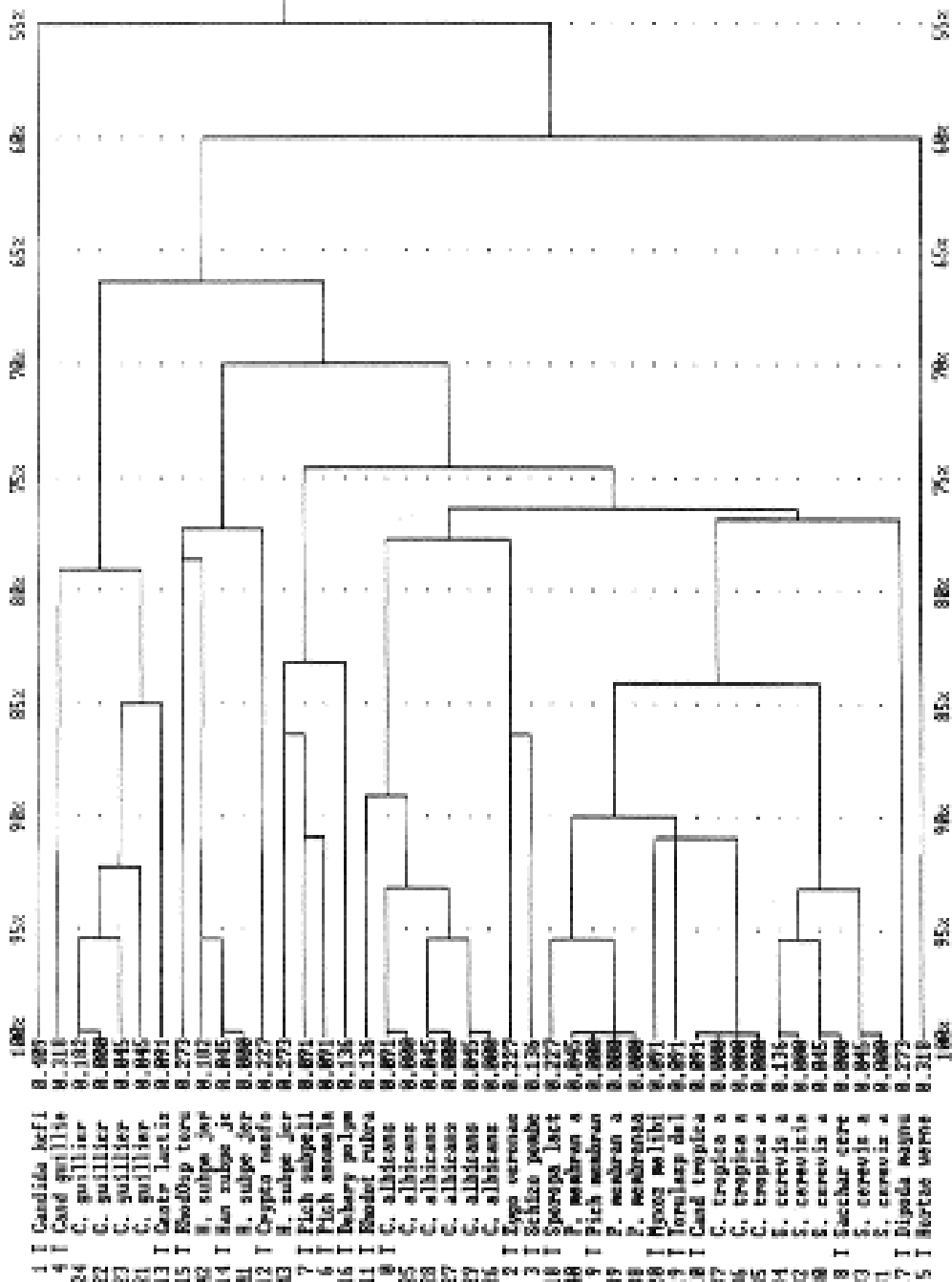
La conjunción de cromatografía de gases con el detector selectivo de masas, nos permite añadir una serie de ventajas adicionales: la determinación de los pesos moleculares de cada uno de los ésteres aislados, así como las fragmentaciones producidas que recogen la relación carga/ masa y su abundancia relativa.

La confirmación irrevocable de la naturaleza de estos ésteres metílicos, no está basada ya en tiempos de retención relativos, sino en sus fragmentaciones moleculares.

Ampliar el campo de acción no sólo a los 22 ésteres estudiados, sino a ergosteroles o ésteres de ácidos grasos superiores ofrece mejor rendimiento, ya que el espectrómetro, posee en memoria miles de compuestos orgánicos con los que podemos comparar el resultado de nuestra separación cromatográfica.

El método de esterificación que nos dio mejores resultados para la obtención de los ésteres metílicos de los ácidos grasos fue el método descrito por Wayne Moss y colaboradores [12]. Es un método eficaz y simple que proporciona resultados aceptables. Por contra y en nuestra experiencia, los métodos de saponificación básica ensayados resultaron ser más complejos, consumiendo más tiempo de análisis y los resultados cromatográficos que se obtuvieron no fueron reproducibles. Este método de esterificación con metanol en presencia de tricloruro de boro, es igual de eficaz que el utilizado por Luquin y colaboradores [13], aunque es más engorroso para la extracción, ya que deja abundantes sedimentos.

Hay que hacer constar el hecho de que cepas de una misma especie, no presentan el mismo perfil de ésteres metílicos, si bien es cierto que el porcentaje de similitud es mayor entre las cepas de una misma especie, aunque existen casos como el del *Geotrichum lactis*, en el que esto no se cumple.



Coefficiente de Simple-matching. Group-averaging clustering. Ref 8984/2.1  
r=0.84875

Figura 1. Dendrograma obtenido en 44 cepas de levaduras, considerando los ésteres metílicos de 22 ácidos grasos.

Al contrario que con otros géneros y especies bacterianas, en nuestro estudio con levaduras el método de pirólisis aportó poco a la información dada por el método sin pirólisis.

Los resultados obtenidos por el proceso de taxonomía numérica según el agrupamiento *Simple \_machching Group average clustering*, con un coeficiente de correlación de 0,848965, puso de manifiesto que el máximo de similitud es del 55%. Este método de agrupamiento obtiene la disimilaridad entre dos grupos y selecciona la disimilaridad mínima ( $D_{ij} = 1 - S_{ij}$ ) entre los elementos que configuran ambos grupos.

El espectro de ésteres metílicos de ácidos grasos de C12:0-C24:0 de las levaduras ensayadas, parece proporcionar una variedad suficientemente amplia para identificar géneros y especies mediante esta técnica. El estudio de

un mayor número de cepas permitirá refrendar esta hipótesis, e incluso introducir el concepto de lipidotipo con fines de identificación de cepas o como marcador epidemiológico.

Como conclusión final podemos afirmar que la aplicación de la cromatografía de gases a la identificación de levaduras puede representar una solución para el análisis rutinario de las mismas, por su simplicidad técnica, bajo coste económico y alta reproducibilidad de los resultados. Como se puede apreciar, los porcentajes de ácidos grasos son muy diferentes dentro de un mismo género, pudiéndose separar las distintas especies de levaduras.

## Bibliografía

1. Nygaard AP, Hall BD. A method for detection of RNA:DNA complexes. *Biochem Biophys Res Comm* 1963; 12: 98-104.
2. Bicknell JN, Douglas HC. Nucleic acid homologies among species of *Saccharomyces*. *J Bacteriol* 1970; 101: 505-512.
3. Ausabel FM, Brent R, Kingston RE, et al. *Protocols in Molecular Biology*. Nueva York, John Wiley and Sons, 1987.
4. Dattagupta N, Rae PM, Huguenel ED, et al. Rapid identification of micro-organisms by nucleic acid hybridation after labelling the test sample. *Analytical Biochemistry* 1989; 177: 85-89.
5. Minnikin DE, O'Donnell AG. *The Biology of the Actinomycetes*. Londres, Academic Press, 1984; 337-388.
6. Gutteridge CS, Norris JR. *Biotechnology*. Londres, Ouline Publications, 1983; 919-929.
7. Gangopadhyay PK, Thadepalli I. Identification of species of *Candida*, *Cryptococcus* and *Torulopsis*, by gas-liquid chromatography. *J Infect Dis* 1979; 140: 952-958.
8. Hughes JC, Wheals BB, Whitehouse MJ. Simple technique for the pyrolysis mass spectrometry of polymeric materials. *Analyst* 1977; 102: 143-144.
9. Kowalsky BR. Measurement analysis by pattern recognition. *Anal Chem* 1975; 47: 1152-1162.
10. el-Sarkawy SH, Dostal L, Rosazza JP. Microbiological transformation of lipids: acyl-specific hydrolysis of lard by yeast. *Appl Environ Microbiol* 1993; 59:725-8.
11. Rezanka T. Analysis of sterol esters from alga and yeast by high-performance liquid chromatography and capillary gas chromatography-mass spectrometry with chemical ionization. *J Chromatogr* 1992; 15: 219-26.
12. Wayne Moss C, Shinoda T, Samuels W. Determination of cellular fatty acid compositions of various yeasts by gas-liquid chromatography. *J Clin Microbiol* 1982; 16: 1073-1079.
13. Luquin M, Ausina V, López Calahorra F, et al. Evaluation of practical chromatographic procedures for identification of clinical isolates of mycobacteria. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 120-130.