

68



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES IZTACALA

“COMPARACION DE LOS PERFILES CROMATOGRAFICOS DE LOS ESTERES METILICOS DE LOS ACIDOS GRASOS DE CEPAS TIPIFICADAS Y AMBIENTALES DE Salmonella spp. PARA DETERMINAR LOS PICOS CARACTERISTICOS DEL GENERO”.

T E S I S

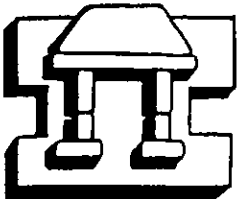
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

PANTOJA CASTRO JULIO CESAR

DIRECTORA DE TESIS: BIOL. BLANCA N. MARTINEZ RODRIGUEZ



IZTACALA

JUNIO DEL 2000



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.

DEDICATORIAS

A mis padres:

Maria de la Luz Castro López, por haberme dado toda la paciencia, apoyo y cariño.

Miguel Pantoja Sánchez, por que a pesar de todo, conté con él.

A mis hermanos:

Luz Maria, por haber sido ella misma.

Migel Angel, por haberme apoyado en todo.

Alejandro, por darme consejos reflexivos.

Patricia, por dejarme meditando.

A mis primos y tíos:

Por su comprensión y convivencia.

A mis abuelos:

Por esos recuerdos y momentos mágicos.

AGRADECIMIENTOS

M. en C. Eric Monroy P., por que en la Universidad se forjan las amistades duraderas.

Q.F.B. Gloria Luz Paniagua C. Por haberme dado una parte de sus conocimientos.

Biol. Blanca N. Martínez R. por haberme asesorado.

M. en C. Pedro Ramírez y Q.F.B. Esperanza Robles V. por haberme facilitado el laboratorio y equipo para la realización de este trabajo.

A mis revisores: Dr. Victor Rivera A., Dr. Salvador Rodríguez Z., y Biol. Graciela Molina G.

A la señora Paulina y a Isac (personal del laboratorio de análisis clínicos de la CUSI Iztacala) por haberme apoyado.

INDICE.

Capítulo	página
1. INTRODUCCIÓN _____	1
1.1. HISTORIA _____	1
1.2. IDENTIFICACIÓN BACTERIANA _____	2
2. JUSTIFICACIÓN _____	5
3. MARCO TEÓRICO _____	6
3.1 ÁCIDOS GRASOS _____	6
3.2 CROMATOGRAFÍA DE GASES _____	8
3.3 GÉNERO <i>Salmonella</i> _____	10
4. ANTECEDENTES _____	14
5. OBJETIVOS _____	18
6. MATERIAL Y MÉTODO _____	19
7. RESULTADOS _____	23
8. DISCUSIÓN _____	30
9. CONCLUSIONES _____	32
10. RECOMENDACIONES _____	33
11. BIBLIOGRAFÍA _____	34
12. APÉNDICE _____	38

I.INTRODUCCIÓN

1.1 HISTORIA

Debido a que las bacterias son organismos de pequeño tamaño (2-10 μm), el hombre no dio cuenta de su existencia hasta el siglo XVII cuando Antonj van Leeuwenhoeck observó, por primera vez, estos microorganismos en una gota de charco mediante un microscópio rudimentario, construido por el mismo. La importancia de los microorganismos en los procesos de descomposición y fermentación se descubrió en el siglo XIX por Luis Pasteur, quién concibió, además, el papel importante que juegan estos en la transmisión de enfermedades, recomendando entonces la asepsia médica. Lord Lister, cirujano inglés aplicó este descubrimiento en la medicina desarrollando técnicas antisépticas.

La diversidad bacteriana es muy amplia e importante pues son organismos esenciales que, si no fuera por estas, los desechos de animales, así como los cuerpos de animales y plantas muertos se acumularían en tal cantidad que los seres vivos morirían por falta de espacio. Además de la degradación de la materia orgánica, el enriquecimiento del suelo depende de ciertas bacterias que fijan el nitrógeno atmosférico, combinándolo para que las plantas verdes lo utilicen en su desarrollo y crecimiento. De igual modo estas son importantes para la producción de alimentos, como la mantequilla y el queso; en la preparación de lino, y en muchos procesos de preparación química. Desgraciadamente hay algunas que atacan a los seres vivos produciéndoles enfermedades; llamándoseles a estos patógenos (Cabello R.1993). Por otro lado, la cromatografía es un método que se utilizó hace tiempo por los griegos, los cuales colocaban tinta negra en un papel y observaban como la tinta al ir ascendiendo por el papel, se separaba en varios colores. Pero su desarrollo es acreditado a Swett, quien en 1903 trabajó separando los componentes de los extractos coloreados de plantas, por cromatografía en columna, de la cual se cree derivó su nombre (cromos=color; grafos=descripción), para 1931 Kuhn y Lederer utilizaron columnas cromatográficas para la separación de carotenos y xantofilas en plantas.

Probablemente, la rama más importante de esta, es la cromatografía gaseosa. Esta técnica, separa compuestos que se encuentran en fase gaseosa, estando basada en el trabajo de investigación de A.J.P. Martin, quien demostró por primera vez, hacia 1941, el gran interés potencial de la cromatografía de reparto para la separación e identificación de aminoácidos. Con anterioridad, eran necesarias operaciones químicas tan complicadas que dichas separaciones

eran prácticamente imposibles. Martin predijo las posibilidades de la cromatografía gas-líquido, pero, sus predicciones fueron ignoradas durante muchos años hasta que se demostró la factibilidad del método. El impacto de los trabajos de Martin A.J.P. y de su colaborador Syngé R.L.M. en bioquímica y química general fue tan grande, que recibieron el premio nobel de química en 1952 (Robinson J.W.1978). Siete años después Wolchow sugirió que la cromatografía se podía aplicar en la diferenciación entre microorganismos, basándose en sus componentes químicos, ya que estos son únicos entre géneros y especies. Pero fue hasta 1963 que K. Abel aplicó la cromatografía de gases en bacterias, encontrando similitudes entre especies de la familia *Enterobacteriaceae*, por medio de la composición química de sus lípidos (Abel K. y col. 1963). Desde el descubrimiento de la cromatografía se han desarrollado cientos de aplicaciones, y el método se ha convertido en la piedra angular de la química analítica molecular (Robinson J.W. 1978).

1.2. IDENTIFICACIÓN BACTERIANA

Debido a que existe un gran número de microorganismos con interrelaciones genéricas estrechas que dificultan su clasificación e identificación, se hace necesario contar con pruebas rápidas y confiables para la determinación taxonómica.

Actualmente hay una gran cantidad de técnicas para reunir información de datos fenéticos, que se basan en clasificaciones morfológicas, fisiológicas y bioquímicas (Austin B. y col. 1992), siendo parte de esta última la Quimiotaxonomía o Quimiosistemática; que se encarga del estudio de las variaciones químicas de los organismos, y el uso de estos caracteres para su reconocimiento. Esto ha permitido ampliar la base de datos en que se apoyan las clasificaciones de las taxas, debido a que la quimitaxonomía opera en niveles diversos de la célula, los cuales son:

1) Célula completa: Se cultivan bacterias en condiciones estandarizadas, degradándose por medio de calor en una atmósfera inerte (pirolisis), los productos proporcionan la huella digital de la célula. Estos perfiles se analizan por cromatografía de gases o espectrometría de masas (Austin B. y col. 1992; Bøe B. y col. 1980).

2) ADN cromosómico: El ADN se separa en hebras sencillas mediante desnaturalización térmica o alcalina, y subsecuentemente se permite que se reasocien o apareen en presencia de una segunda molécula de ADN desnaturalizada. Si las secuencias de nucleótidos de las dos muestras son homólogas formarán hélices dobles híbridas, pero si existen pocas secuencias

en común, habrá una insignificante formación de híbridos, permitiendo por lo tanto calcular la similitud de la secuencia de ADN entre dos organismos, que se calculará en porcentaje de similitud.

3) ARN ribosomal: Hibridación ADN:ARNr, que reside en inmovilizar el ADN cromosómico desnaturalizado en filtros de nitrocelulosa, los filtros se incuban con ARNr marcado con C^{14} . A continuación los filtros se lavan con ARNasa determinándose la homología de la secuencia entre ARNr (16s o 23s) y los cistrones del ARNr dentro del ADN cromosómico de un segundo organismo. La cantidad total unida (μ g de ARN por cada 100μ g de ADN) es el porcentaje de ARNr unido (Austin B. y col. 1992; Galbraith L. y col. 1991).

4) Proteínas: Electroforesis de gel de poliacrilamida, que consta en el rompimiento de las bacterias, y el producto de la lisis se aplica directamente al gel, al que se le incluyen una o dos proteínas de referencia, teñiéndose el gel con algún colorante (azul Coomassie), realizando un trazado densitométrico del gel teñido, que aporta los datos cuantitativos de la bacteria, calculándose la similitud con el coeficiente de Pearson. Otra técnica es el patron Enzimático, que compara las características de una o mas enzimas que son comunes a un grupo, detectándose en geles electroforéticos mediante una reacción específica que origina la formación de color. Así las cepas se clasifican en grupos con base en la presencia o ausencia de enzimas particulares y sus movilidades electroforéticas (Austin B. y col. 1992; Boyd E.F. y col. 1993; Way J.S. y col. 1993; Wyatt G.M. y col. 1993).

5) Productos metabólicos: Las pruebas tradicionales como el rojo de metilo o la reacción de Voges-Proskauer, determinan productos terminales del metabolismo. La mayoría de los métodos (cromatografía líquida, cromatografía de gases, etc.) se concentran en los productos terminales ácidos, en particular ácidos monocarboxílicos como el ácido acético, butírico, etc. (Austin B. y col. 1992; Farmer J.J. y col. 1985; Abel K. y col. 1962; Bergan T. y col. 1984.).

6) Pared y membrana celular: Las bacterias gramnegativas poseen una envoltura doble que comprende la membrana citoplasmática formada por lípidos polares (fosfolípidos, glucolípidos, etc.), una pared celular rígida denominada peptidoglucano y una membrana externa compuesta por lipoproteínas y lipopolisacáridos, la cual puede ser analizada mediante esterificación por cromatografía de gases (Austin B. y col. 1992; Brock T.D. 1987; Kämpfer P. y col. 1996; Jantzen e. y col. 1974,1982; Galbraith L y col.

1991; Alugupalli S. y col. 1994.). Esta técnica permite la separación, cuantificación e identificación de muchos constituyentes orgánicos que se han aprovechado en la rama de la quimiotaxonomía bacteriana. Dentro de estos constituyentes encontramos a los lípidos que proporcionan abundante información, existiendo tres clases importantes: Quinonas isoprenoides, Lípidos polares y Ácidos grasos; estos últimos se liberan de los lípidos polares de la membrana externa mediante esterificación, analizándose por medio de la cromatografía gas-líquido (Austin B. y col. 1992).

La cromatografía gas-líquido de ácidos grasos celulares es un versátil método, que permite identificar tanto cualitativa o cuantitativamente cepas bacterianas, además que es selectivo, sensible y rápido, para usarse en las clasificaciones taxonómicas (Abel K. y col. 1963; Eerola E. y col. 1988; Jantzen E. y col. 1974).

2.JUSTIFICACIÓN

En años recientes la cromatografía ha sido esencial en la separación de sustancias puras de mezclas complejas y de su análisis dentro del área de la investigación, debido a que es un método claro, rápido y preciso, pudiendo por tanto ser una herramienta alternativa y/o complementaria. Estas características son de suma importancia cuando se trata en el área clínica y ambiental de descubrir a los agentes patógenos bacterianos causantes de una enfermedad o contaminación, ya que las pruebas bioquímicas rutinarias requieren 1 semana para su determinación, además de que si la especie a determinar tiene varios serotipos se le tienen que realizar pruebas serológicas que aumentan más el tiempo de identificación microbiana, mientras que en el análisis cromatográfico se tarda 3 días para la obtención de resultados. Sin embargo para poder determinar a un microorganismo se debe contar con un perfil cromatográfico del organismo de interés. Por ello, desde 1990 en el proyecto de Conservación y Mejoramiento del Ambiente (CyMA), implementó la técnica en cromatografía Gas-Líquido, para identificar bacterias coliformes (*Klebsiella*) mediante los patrones de ácidos grasos celulares (perfil cromatográfico), especialmente las de la familia *Enterobacteriaceae*, debido a que estas son mayormente las causantes de enfermedades entéricas. Actualmente se cuenta con 14 perfiles cromatográficos de *Enterobacterias*; siendo necesario seguir determinando más perfiles.

Dentro de la familia *Enterobacteriaceae*, se escogió al género *Salmonella*, debido a que son microorganismos Gram-negativos que contienen gran cantidad de ácidos grasos en su membrana celular. Por otro lado, se tomo a la especie *typhi*, y los serotipos, *Paratyphi* y *typhimurium*, por que son más frecuentes en el ser humano, sobre todo en países en vías de desarrollo, presentandose en forma endémica con brotes epidémicos, las cuales ocasionan Fiebre tifoidea y fiebres entéricas. El presente trabajo es una aportación seguir incrementando dichos perfiles.

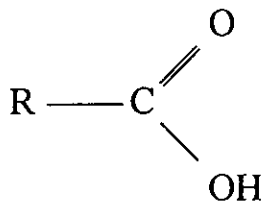
3. MARCO TEÓRICO

3.1 ACIDOS GRASOS

Los lípidos desempeñan diversas funciones biológicas importantes, de la siguiente manera, actúan: 1) Como componentes estructurales de las membranas, 2) Como formas de transporte y almacenamiento de combustible catabólico, 3) Como cubierta protectora sobre la superficie de muchos organismos, y 4) Como componentes de la superficie celular relacionados con el reconocimiento de las células, con la especificidad de especie y la inmunidad en los tejidos. Estos son biomoléculas insolubles en el agua, que se extraen de las células y tejidos mediante solventes no polares, por ejemplo, cloroformo, éter, benceno, etc.

Los lípidos se clasifican: Lípidos sencillos y Lípidos complejos; Los Lípidos sencillos no contienen ácidos grasos, y no son por tanto saponificables, dentro de estos encontramos a los terpenos y esteroides; Los Lípidos complejos se caracterizan por que contienen cadenas de ácidos grasos, los cuales forman jabones por hidrólisis alcalina (saponificación), estos comprenden a los acilglicéridos, fosfoglicéridos, esfingolípidos y ceras.

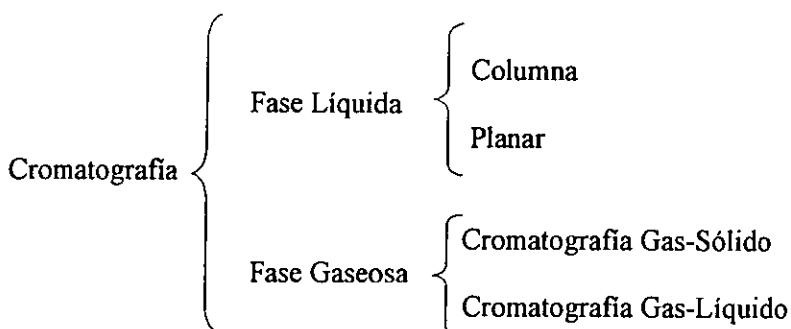
Los ácidos grasos se encuentran en grandes cantidades en los lípidos saponificables, en células y tejidos, en estado libre (no esterificado) aparecen solamente en trazas. Todos ellos poseen una cadena hidrocarbonada larga con un grupo carboxilo terminal.



La cadena hidrocarbonada puede ser saturada (enlace sencillo) C-C, o no saturada (enlaces dobles) C=C; Existiendo unos cuantos con triple enlace. Los ácidos grasos difieren entre sí, por la longitud de la cadena y sus dobles enlaces. Se han aislado unas 100 clases diferentes de estos en animales, vegetales y microorganismos, por ejemplo el ácido acético, fórmico, butírico, palmítico, etc. Las bacterias contienen menos y más simples tipos de ácidos

3.2 CROMATOGRAFÍA DE GASES

La cromatografía es un método físico que se utiliza para separar los componentes de una mezcla. Esta técnica de separación se realiza entre dos fases, una móvil y una estacionaria. La fase móvil puede ser un líquido o un gas, y como su nombre lo indica, se mueve o percola a través de la fase estacionaria, que puede ser un líquido o un sólido que se encuentra en una columna o en un sistema planar el cual, dependiendo de su estructura, absorbe o adsorbe los componentes a separar en menor o mayor grado. Con ello separa los componentes de la muestra en cuestión. La clasificación de los métodos cromatográficos se divide de la siguiente forma:



En la cromatografía de capa fina sobre papel dicha fase se extiende en forma de capa (cromatografía plana), mientras que, en la cromatografía en columna, se empaqueta la fase en una columna, que es un tubo delgado.

En la cromatografía de gases, la fase móvil es un gas inerte y la fase estacionaria puede ser un líquido o un sólido. El proceso de separación es una partición entre las dos fases de los componentes a separar (solutos). Esta partición se realiza en forma diferencial para cada uno de los solutos, dependiendo de su solubilidad con respecto a la fase estacionaria, mientras que en la cromatografía líquida, la fase móvil es un líquido; que se desarrolla en diferentes sistemas en función de la forma física de la fase estacionaria; esta se divide en dos según la polaridad relativa: La primera es la cromatografía en fase inversa; esta se da cuando la fase estacionaria es de naturaleza polar (hidrocarburo) y la fase móvil es un líquido polar, normalmente agua o alcohol; en este caso, cuanto menos polar sea la muestra

mayor será su retención. La segunda se le denomina cromatografía en fase normal, en donde la fase estacionaria es de naturaleza polar (por ejemplo sílice), siendo también polar la fase móvil, por lo que las muestras polares quedan más tiempo retenidas en la columna que las menos polares. La cromatografía es esencial para la separación de sustancias puras de mezclas complejas, y se utiliza extensamente en el análisis de alimentos, principios activos, constituyentes de microorganismos, etc.

La cromatografía de Gas-Líquido consiste en inyectar una muestra hacia un alineador de vidrio que contiene un bloque metálico, el cual la evapora 30° C por encima del punto de ebullición de la misma. Esto garantiza que el líquido vaporice instantáneamente, formando un "tapón" de vapor, que es conducido por un gas acarreador inerte (fase móvil), como helio, argón, nitrógeno o hidrógeno, hacia una columna capilar, que es un tubo construido de sílice fundida (vidrio de muy alta pureza), que tiene un grado de entrecruzamiento en la matriz de silicón-oxígeno mucho mayor que el vidrio ordinario. La columna se encuentra rellena con una fase líquida (fase estacionaria), que es sólida a temperatura ambiente, y que esta hecha de polidimetilsiloxano, que se encuentra entrelazado y distribuido uniformemente. Las características principales de esta columna son: Químicamente inerte, menos tiempos de retención, mayor inatacabilidad, duración prolongada, menor sangrado, mayor eficiencia y mejor reproducibilidad. Este polímero es líquido a altas temperaturas, y su función en estas condiciones es separar la muestra en sus componentes por solubilización diferencial con base en su polaridad, y después se eluyen diferencialmente en función de la presión de vapor; esto debido a que los componentes con poca capacidad para disolverse se mueven rápidamente a través de la columna, mientras que otros son disueltos y retenidos pero finalmente eluidos de la columna, llamandosele a esto energía de interacción fase-analito. De este modo los tiempos de retención (TR) varían de acuerdo con la interacción relativa que un componente de la muestra tiene con la fase estacionaria. Los TR señalan donde aparecerán los compuestos en un cromatograma respecto a alcanos de cadena recta que se inyectan junto con la muestra. Cuando los fenómenos antes descritos se realizan en forma eficiente, el perfil de la dispersión de las moléculas es una curva Gaussiana.

La eficiencia de la columna esta dada por la capacidad para separar los componentes de una mezcla y la unidad utilizada para expresar dicha eficiencia se le denomina plato teórico. Este considera que cada uno de estos representa una distribución de equilibrio del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria. Por lo tanto, a mayor número de platos teóricos, mayor será la oportunidad de que se realice la separación de los compuestos.

Una vez separados los solutos, salen de la columna, siendo registrados y medidos por un detector de ionización de flama, que es muy sensible a compuestos orgánicos (10^{-12} g/s); esto es, 106 veces más sensible que los detectores de conductividad térmica. El detector consta de unos electrodos filiformes en los que se establece una diferencia de potencial constante de unos 400 v, y por otro lado, consta de un mechero donde el hidrógeno se mezcla con los gases procedentes de la columna, la mezcla fluye hacia la llama oxhídrica del mechero, donde se quema escindiéndose en fragmentos (el compuesto orgánico), dando como resultado iones altamente conductores y fácilmente detectables por el cambio de flujo de corriente entre electrodos. La cantidad de iones producidos depende del tipo y cantidad de compuestos presentes, siendo el número de iones en la llama directamente proporcional a la conductividad, y a la masa del compuesto estudiado. Así pues los cromatogramas resultantes son la representación del voltaje frente al tiempo (De Gracia 1973; Bender G.T. 1987; Gonzáles A.M.E. 1987; Robinson J.W. 1978; Willard H.H. y col. 1991; Maya Y.M. y col. 1999).

Un cromatograma está formado por diversos picos que son una representación de cada uno de los componentes eluidos, siendo el centro de este pico la representación de la velocidad promedio de las moléculas del soluto. Las desviaciones del valor de la media son consecuencia de variaciones en la transferencia de masa del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria, dándonos por lo tanto información del tiempo de retención (TR); y el área (A) de estos picos; informándonos de la cualidad y cantidad de ácidos grasos que se encuentran en una muestra.

3.3 GÉNERO *Salmonella*

La familia enterobacteriaceae ha sido centro de diversos estudios para determinar por medio de cromatografía gas-líquido sus ácidos grasos celulares (Asten van A.J.A.M. y col. 1973, 1995, Bergan T. y col. 1984; Häusler J. 1987; Ryll M. y col. 1996; Steele M. y col. 1997). Dentro de esta familia encontramos al género *Salmonella*, que en algunas ocasiones suele ser habitante normal del tracto intestinal de animales y humanos. Algunas de estas especies son patógenas para el ser humano, (Burnett G.W. y col. 1988.).

Estas bacterias se caracterizan por ser bacilos gram-negativos no esporulados de 1 a 3 μm de largo por 0.6 μm de ancho, presentan movilidad en su mayoría debido a flagelos peritricos (Austin B. y col. 1992.). Las colonias son circulares de 2 a 3 mm de diámetro con borde ligeramente ondulado, convexoaplanadas, de color gris blanquecino brillante y poco transparente (Bøe B. y col. 1980; Burnett G.W. y col. 1988; Divo A. 1990;

Drucker D.B. 1987.). Son aerobias y anaerobias facultativas. Su temperatura más favorable para el crecimiento es a 37° C; el pH óptimo varía entre 6.8 y 7.6. El calor las mata a 55° C durante una hora y en 20 minutos a 60° C ; el ácido fénico al 5% las destruye en 30 minutos y la luz del sol directa las aniquila en unas horas, pero al abrigo de este sobreviven durante varios días. Resisten la acción inhibitoria de algunos colorantes y sustancias químicas a determinadas concentraciones las cuales se utilizan en la preparación de medios selectivos para el aislamiento y diferenciación de los agentes entéricos, Así, tenemos que el verde brillante, sulfito de bismuto, verde de malaquita, las sales de selenito y el desoxicolato sódico, agregado al medio, inhiben gran parte de la flora intestinal permitiendo el desarrollo de *Salmonella*. Las sustancias como el tetrionato sódico, favorecen su crecimiento a expensas del bacilo *Escherichia coli*, por cuanto reduce el tetrionato utilizándolo en beneficio de su propia energía. Ninguna licúa la gelatina ni fermenta la lactosa (Excepto *Salmonella arizonae*), son positivas al rojo de metilo, pero acidifican (con producción de gas, excepto *Salmonella typhi*) la glucosa, maltosa, manitol, y sorbitol. Son negativas al indol y al Voges-Proskauer (Burnett G.W. y col. 1988; Divo A. 1990.).

Las Salmonelas están formadas de una pared rígida y muy delgada, hecha de peptidoglucanos (10 a 20%) que a veces reciben el nombre de mureína o mucopéptido, compuesta de dos derivados de carbohidratos, la N-acetilglucosamina y el ácido N-acetilmurámico, así como un pequeño grupo de aminoácidos, formando una estructura llamada tetrapéptido glucano, y por una membrana externa de naturaleza lipopolisacárida (80 a 90 %); que consta de un núcleo polisacárido de glucosa, galactosa y N-acetilglucosamida. A este núcleo se conecta un polisacárido O, que usualmente contiene galactosa, glucosa, ramnosa y manosa, al que se denomina antígeno somático (O), el cual es termoestable, hacia el interior de esta membrana se encuentra un lípido, que contiene ácidos grasos principalmente (β -hidroximirístico, láurico, mirístico y palmítico). Estos se encuentran conectados por enlaces éster con la N-acetilglucosamina. Hacia la capa externa del lipopolisacárido se asocian los fosfolípidos para formar la porción externa de la unidad de membrana. Los lipopolisacáridos son responsables de la toxicidad en algunas especies, denominándose antígeno de virulencia (Vi) o de cubierta "K", el cual es termolábil. Finalmente las *salmonellas* contienen flagelos, denominados antígeno flagelar (H), que es termolábil y está compuesto de proteínas fibrosas (flagelinas) que se encuentran asociadas, en su región basal, al lipopolisacárido de la membrana y al peptidoglucano de la pared celular (Brock T.D. 1987; Mandell y col. 1991; Ryll M. y col. 1996; Steele M. y col. 1997.).

El género *Salmonella* se le divide en tres especies: *S. cholerae-suis*, *S. typhi* y *S. enteritidis*, con más de 1500 (Divo A. 1990) o 2000 (Cabello R. 1993) serotipos, perteneciendo la mayoría a esta última especie. El "grupo Arizona" se considera miembro de este grupo (también llamada *Arizona hinshawii* 23:24:31). La clasificación con base en los serotipos, esta basada en las realizada por Kauffman y White. Esta tiene como base a los antígenos H, O y Vi, y sus respectivos anticuerpos. El antígeno somático que es monofásico, y que, al tener variación en sus componentes antigénicos, permite dividir al género en 42 agrupaciones señaladas con letras mayúsculas de la A hasta la Z, y desde el 51 al 65 (en la actualidad se indican con números arábigos); por otro lado tenemos al antígeno flagelar que es difásico, siendo una de las fases designadas con el número 1 (originalmente llamada específica) y la otra con el número 2 (de grupo). La fase 1, al igual que la fase 2, posee variada composición de porciones antigénicas, las cuales son más específicas en la 1 que en la 2. Los antígenos de la fase 1 se indican con letras minúsculas: a, b, c, etc.; los correspondientes a la fase 2, con números arábigos: 1, 2, 5, 6, 7 y letras minúsculas solas o numeradas (Burnett G.W. y col. 1988; Boyd E.F. y col. 1993; Asten van A.J.A.M. y col. 1995).

Cuadro 1. Formúla antigénica representiva

Serogrupo	Serotipo y/o especie	Antígeno O	Antígeno H	
			Fase 1	Fase 2
A	<i>Salmonella paratyphi</i>	1, 2, 12	a	-
B	<i>Salmonella typhimurium</i>	1, 4, 5, 12	i	1, 2
C	<i>Salmonella typhi</i>	9, 12, Vi	d	-

Los serotipos que infectan al hombre provocan tres diferentes entidades clínicas: 1) fiebre entérica, como fiebre tifoidea; 2) septicemias; y 3) gastroenteritis aguda del tipo de envenenamiento alimenticio en niños y adultos. A continuación trataremos las infecciones causadas por las especies en estudio:

Samonella typhi

Esta se adquiere por la ingestión de alimentos contaminados y el periodo de incubación varia de 7 a 14 días.

Las manifestaciones clínicas son: Fiebres que en el transcurso de los días aumenta hasta 40° C o más, estreñimiento, el abdomen es muy sensible a la exploración. Después del cuarto día se observan manchas rosadas, dolores musculares, astenia, adinamia y diarrea.

La patogenia se da cuando las bacterias penetran por la pared del intestino a los ganglios linfáticos del mesenterio, donde se reproducen en forma abundante. De ahí drenan por el conducto torácico a la circulación sanguínea produciendo una bacteremia, predominando esta en las placas de Peyer, en donde dan lugar a úlceras. Otros tejidos colonizados son la vesícula biliar, hígado, huesos, pulmones y pleura, baso y en pocos casos las meninges y articulaciones.

Cuando el padecimiento avanza en forma natural sin la formación de una respuesta inmune oportuna se produce:

- a) Hemorragia; salida de sangre a la luz del intestino.
- b) Perforación intestinal; producidas a partir de las úlceras asentadas.
- c) Colecistitis; inflamación de la vesícula biliar.
- d) Abscesos en diferentes órganos.

Salmonella paratyphi

Semejante a la tifoidea, pero de carácter más leve; el cuadro clínico es de menor intensidad (con menor tendencia a la ulceración) y de más corta duración, el periodo de incubación es de unos 10 días.

Salmonella typhimurium

Padecimiento muy similar al producido por *S. paratyphi*, siendo la diferencia que esta produce enteritis o gastroenteritis, que se manifiesta a las 24 o 48 horas por comienzo repentino de dolor abdominal, náusea, vómito, diarrea. Generalmente no hay fiebre pero puede haber febrícula.

Estas se localizan exclusivamente en el intestino, siendo enteroinvasiva ya que tienen la capacidad de colonizar la pared intestinal en donde dan lugar a desprendimientos de la mucosa y en ocasiones producen pequeñas úlceras que pueden sangrar. La materia fecal es semilíquida o líquida, fétida y espumosa. Este padecimiento es autolimitante, después de tres a cuatro días el paciente empieza a mejorar (solo en pocos casos la diarrea se prolonga por más de una semana), finalmente el padecimiento se resuelve en menos de una semana de evolución.

La fiebre tifoidea es un padecimiento que se encuentra en todas las latitudes y en todos los países del mundo, pero es más frecuente en los países en desarrollo como el nuestro, encontrándose en forma endémica, con brotes epidémicos. Datos preliminares de una encuesta seroepidemiológica nacional mostraron que alrededor del 8.8% de la población nacional, tienen anticuerpos con títulos altos contra *Salmonella typhi* (Cabello R. 1993; García J.A. y col. 1992; Mandell y col. 1991).

4. ANTECEDENTES

Si bien, aunque el método cromatográfico se usa desde tiempos antiguos, el desarrollo de la cromatografía es acreditado a Swett, quién en los años 1903-1906 trabajó la cromatografía de columna, separando los componentes de los extractos coloreados de donde derivó su término cromatografía. Siguiendo el estudio con plantas, Kuhn y Lederer en 1931 separaron carotenos y xantofilas en columnas cromatográficas a partir de extractos líquidos, siendo hasta 1941 en que Martin y Singe esbozaron la idea de cromatografía de gases (Burchfield P. y col. 1962; Maya M. y col. 1999).

De 1949 a 1952 Martin y James pusieron en juego la idea de cromatografía de gases, desarrollándola en el campo teórico práctico, aplicando esta en la separación de algunos ácidos volátiles (Burchfield P. y col. 1962; De Gracia 1973; Drucker D.B. 1987; Maya Y.M. y col. 1999).

Wolchow (1959) sugirió que los microorganismos pueden ser diferenciados con base en sus compuestos químicos, que son únicos entre especies y géneros (Abel K. y col. 1963).

Para 1961, Desty, Goldupjand y Levelock, propusieron que más de 100 diferentes compuestos pueden ser separados por cromatografía en columna, pudiendo separar concentraciones tan pequeñas como 10^{-13} g del componente, además de que muestras complejas pueden ser separadas en minutos, y muestras simples pueden ser detectadas en segundos (Drucker D.B. 1987).

Pero fue K. Abel y col. en 1963 quién, estudió las diferencias entre las diversas familias de microorganismos, encontrando además, similitudes de especies de la familia Enterobacteriaceae, por medio del análisis de la composición química de sus lípidos; utilizando la cromatografía de gases.

En 1968, Buford y Gardner compararon varias cepas de *Vibrio*, de acuerdo con su antígeno de superficie, identificándose ésteres metílicos de ácidos grasos a través de la cromatografía de gases, observando que la distribución de fosfolípidos, ácidos grasos y grasas neutras eran similares entre cepas, sin embargo, encontraron pequeñas diferencias entre sus porcentajes (Jostonsen J.P. y col. 1996).

Amstein C.F. y Hartman P.A. en 1973 estudiaron la composición de ácidos grasos en varias cepas de Enterococos por cromatografía de gases. Encontraron patrones similares de ácidos grasos y diferencias significativas en el carbono 19:0, siendo estas pruebas suficientes para considerarse como criterio taxonómico.

Mitruka B.M. en 1975 aplicó la técnica de la cromatografía de gases para el análisis de células microbianas y productos metabólicos.

Años más tarde (1980) Bøe B. y Gjerde J. clasificaron a varios representantes de la familia *Enterobacteriaceae* y *Vibrionaceae* por medio de patrones de ácidos grasos de la pared celular, para esto utilizaron una columna de vidrio en el cromatógrafo. En ese mismo año Moss y col. realizaron estudios comparativos de la eficiencia de dos diferentes columnas en dos especies bacterianas, analizando sus ésteres metílicos de ácidos grasos, y encontrando que una columna capilar de vidrio tiene menos ventajas que una columna capilar de sílica flexible (Willard H.H. y col. 1991).

En 1982 Jantzen E., Knudsen E. y Winsnes R. realizaron una diferenciación entre especies de *Bordetella* y *Brucella*, por medio de sus ácidos grasos, en especial los que contienen ácidos hidroxilados de C₁₆ a C₁₉ en *Brucella*, mientras que *Bordetella* contiene ambos ácidos grasos no hidroxilados de C₁₀ a C₁₉.

Lambert A. y Moss en 1983 compararon los efectos de la hidrólisis básica y ácida en hidroxiácidos grasos y ciclopropano en bacterias. Cuatro años más tarde (1987) el mismo Lambert A. y col., basados en sus trabajo anterior determinaron las diferencias en 6 grupos de *Campylobacter* por medio de los perfiles de sus ácidos grasos. Durante 1987 Häuler J. y col. propusieron el uso de la cromatografía gas-líquido como un método rápido en la determinación de los ácidos grasos bacterianos por medio de una esterificación.

En septiembre de 1988, Eerola E. y Lehtone O.P. aplicaron un procedimiento para procesar datos en la identificación automática bacteriana de sus ácidos grasos. En ese mismo año Lynn y col. establecieron la composición de ácidos grasos de *Kingella*, *Cardiobacterium hominis* y *Eikenella corrodens*, encontrando que hay diferencias básicas que, complementándose con pruebas bioquímicas ayudan a una diferenciación más precisa.

Veys A. y col. en 1989 identificaron 35 especies de bacterias gram-negativas no fermentativas, a través de la composición de sus ácidos grasos celulares; dividiéndolas en 19 grupos cromatográficos. Este análisis sirvió como un criterio para la diferenciación e identificación taxonómica, pudiéndose adaptar a laboratorios clínicos. En ese año Cookson y col. trabajaron con 21 cepas de *Streptococcus milleri* (que aislaron de cultivos vaginales y orales) y, utilizando el método de la cromatografía gas-líquido encontraron 11 ácidos grasos de cadenas entre 11 y 18 carbonos, proponiendo que este método rápido y reproducible, pudiendo utilizarse en la taxonomía y

sistemática bacteriana. Por ese mismo año Wada M. y col. utilizaron la cromatografía gas-líquido en *Pseudomona* sp (cepas E-3), ensayando tanto en vitro como en vivo, dándose cuenta que en condiciones anaeróbicas y aeróbicas, existe biosíntesis para convertir ácidos grasos saturados en ácidos grasos insaturados. Por 1990 Okuyama y col. mediante la cromatografía gas-líquido, detectaron que a diferentes temperaturas se pueden modificar el contenido de ácidos grasos y la configuración de estos; además de detectar ácidos grasos transinsaturados en *Psychrophilic bacterium* y *Vibrio* sp.

En el año 1991 Galbraith L. y Stephen G.W. identificaron por medio de cromatografía gas-líquido lípidos polares y ácidos grasos en *Pseudomona caryophylli*, *P. gladioli* y *P. picketti*.

Al año siguiente 1992 Shantha N.C. y Napolitano G.E. realizaron una revisión sobre el análisis cromatográfico de los ácidos grasos, mencionando diversos métodos de trabajo, viendo sus ventajas y desventajas, así como la aplicación en la industria alimenticia, microbiológica, producción de aceites vegetales etc.

En 1993 Orgambide G.G. y col. obtuvieron ácidos grasos característicos de *Rhizobium* y *Escherichia coli* por cromatografía gas-líquido, utilizando la metanólisis alcalina de la transesterificación.

Bowers J.H. y col. (1995) descubrieron, por medio de la cromatografía gas-líquido, que introduciendo patógenos de *Streptomyces* en comunidades nativas de *Streptomyces*, se operaban cambios en sus ácidos grasos celulares. En ese año Murray y col. aseguraron que la cromatografía de gases es una alternativa en la identificación de los diversos componentes microbianos (ácidos grasos). Alugupalli S. y col. reportaron la presencia de 3-Hidroxi de ácidos grasos como productos de la metanólisis de diferentes especies de mycobacterias, lo que sugirió el posible rol de esta clase de fosfolípidos en el metabolismo de los ácidos grasos de *Actinomycetes*.

En el año 1996, Chou S. y col. analizaron por cromatografía gas-líquido, ácidos grasos, alcoholes secundarios y ácidos grasos micólicos de 10 especies de *Mycobacterium*, indicando que este método acorta el tiempo para la detección e identificación de especies de micobacterias. También Kämpfer P. y Kroppenstedt R.M. en ese mismo año, realizaron un estudio numérico de los patrones de ácidos grasos en bacterias *Coryniformes*, usando un coeficiente de correlación; los resultados obtenidos indicaron que este método es útil para la identificación quimiotaxonómica y datos genéticos a nivel de especie. Todavía en ese mismo año Ryll M. y col. separaron e identificaron perfiles de ésteres metílicos de ácidos grasos de la pared celular de *Salmonella gallinarum*. y *S. pullorum*, por medio cromatografía gas-líquido; encontrando que bajo este método se pueden diferenciar.

En febrero de 1997, Steele M. y col. diferenciaron perfiles de la pared celular de *Escherichia coli* y *Salmonella enteritidis*, encontrando que en estas dos especies se forman subgrupos. Para ese año Nakagawa Y. y col. identificaron a 2- y 3-hydroxy de ácidos grasos como constituyente de lípidos microbiales, además de que descubrieron que estos pueden ser convertidos a 3,5-Dinitrofenil uretano con dinitrofenil isocianato.

OBJETIVOS

GENERAL

+ Determinar el perfil cromatográfico de los ácidos grasos en el género *salmonella*

PARTICULARES

+Caracterizar los perfiles de ácidos grasos de *Salmonella typhimurium*, *S. typhi*, y *S. paratyphi*,

+Determinar los perfiles de ácidos grasos en seis muestras ambientales de *Salmonella* spp.

+Comparar ambos perfiles cromatográficos para la obtención de los picos característicos de ácidos grasos del género *Salmonella*,

6. MATERIAL Y MÉTODO

Cepas puras y preservación.

Las cepas de referencia de *Salmonella*, se adquirieron en el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (INDRE), las cuales fueron: *Salmonella typhimurium* número de catálogo 148; *Salmonella typhi* (Vi +) número de catálogo 2874; y *Salmonella paratyphi* O:A número de catálogo 2. A las que se les aplicó pruebas de verificación API-20, que comprende 20 reacciones químicas, las cuales se codifican en forma numérica en un código de siete dígitos para su comparación con una matriz de datos, comprobando con esto que pertenecen a la especie y/o serotipo arriba señalados* (tabla 1). Efectuado esto, se mantuvieron en medio inclinado de agar nutritivo para su preservación.

Tabla 1. Pruebas bioquímica que se utilizaron para la identificación de las tres especies y/o serotipos del Género *Salmonella*.

PRUEBAS	<i>S. paratyphi</i> -A	<i>S. typhi</i>	<i>S. enteritidis</i> *
β -galactosidasa	+	-	-
Arginina	-	+/-	+/(+)
Lisina	-	+	+
Ornitina	+	-	+
Citrato	-	-	+
Sulfuro de hidrógeno	-	-	+
Triptófano	-	-	-
Ureasa	-	-	-
Índol	-	-	-
Voges-Proskauer	-	-	-
Gelatina	-	-	-
Glucosa	+	+	+
Manitol	+	+	+
Inusitol	-	-	d
Sorbitol	+	+	+
Ramnosa	+	-	+
Sacarosa	-	-	-
Melibiosa	+	+	+
Amigdalina	-	-	-
Arabinosa	+	-	+
Oxidasa	-	-	-

Simbolos

-, menor o igual al 9% de cepas positivas.

+/-, mayormente positivo que negativo.

+, mayor o igual al 90% de cepas positivas.

(+)/+, en su mayoría las reacciones se retrasan, ocurriendo en 1 o 2 días.

d, reacciones diferentes +, (+), -.

*, Para determinar *S. typhimurium*, solo es posible con pruebas serológicas, pero por ser esta un serotipo de la especie *S. enteritidis*; entonces se realizaron pruebas bioquímica para el reconocimiento de esta especie (Divo 1990; Edwards 1992).

Aislamiento y preservación de cepas ambientales

Se establecieron seis estaciones en los canales de aguas residuales en los alrededores de la ciudad de México. El método a utilizar para el aislamiento de *Salmonella* se denomina “método de torunda” (Collins C.H. y col. 1989), que consiste:

- a) Preparación con tela de gasa doblada (4.5 X 10 cm). Amarrando la parte central con hilo de nylon con la suficiente longitud para alcanzar el agua. Se envolvió la torunda en una bolsa de papel, llevando en otra el medio de transporte (AMIES), todo esto debidamente esterilizado.
- b) En el área de estudio se situó la torunda por debajo de la superficie del agua durante todo un día. Tras este lapso de tiempo se depositó la muestra en el medio de transporte, trasladándose al laboratorio.
- c) En el laboratorio se colocó la muestra en caldo selenito, incubándose a 37° C durante 24 hrs, sembrando y resembrando en sulfito de bismuto por aproximadamente 12 horas durante 4 días con el objeto de obtener un buen aislamiento.
- d) Una vez identificada la bacteria por los métodos morfológicos y bioquímicos (ver confirmación de cepas tipificadas), se procedió a su conservación en las mismas condiciones que las cepas puras.

Preparación de la muestra para su esterificación (Häusler J. 1987).

a) Siembra de la biomasa

De un tubo con agar se extrajo una pequeña muestra y bajo la técnica de “estriado” se sembró en una caja petri, con el fin de aislar colonias, incubando a 37° C durante 24 hrs. Obtenido el crecimiento se tomó una colonia y se inoculó (en otra caja petri) en todo el medio que contenía 25 ml de agar nutritivo, incubándose en las mismas condiciones.

b) Cosecha bacteriana

Obtenida la biomasa se procedió a adicionar a cada caja petri 5ml de formaldehído al 0.5%, desprendiendo a continuación el cultivo bacteriano suavemente con una varilla en forma de “L”, vaciando el contenido de dos cajas en un tubo para su centrifugación.

c) Centrifugación

La ultracentrífuga que se utilizó es marca Dupont; modelo sorvall rc-5b, con refrigeración.

Los tubos con las muestras se centrifugaron a 15 000 rpm durante 10 min a 4° C, para obtener el paquete celular, desechando el sobrenadante y agregando 5 ml de solución fisiológica al 0.85%, centrifugandose en las mismas condiciones. Este último paso se repitió dos veces más, al término del cual la pastilla fue transferida en frascos o viales, distribuyéndose homogéneamente sobre las paredes para facilitar el liofilizado.

d) Liofilizado del paquete celular

Los frascos con la pastilla microbiológica se procesaron al vacío a -50° C durante 3 hrs en un liofilizador modelo Lyph-lock 4.5 lts, con sistema de enfriamiento en seco modelo 775; 77510-01.

Esterificación (Glass 1971).

Una vez deshidratada la muestra se pesó 20 mg y se depositó en un tubo de ensaye; posteriormente se agregó 1 ml de metóxido de sodio (solución A), y se agitó durante 5 min. Realizado esto se adicionó 0.6-0.7 ml de metanol saturado con gas cloro (solución B), agitándose por un lapso de 30 min. Al término de esto se adicionó 2 ml de solución fisiológica (NaCl al 0.85%), agitándose por espacio de 7 min, finalmente se añadió 1 ml de hexano colocándose en agitación por 5 min. Al cabo de este tiempo se extrajo este alcano, en el cual se encontraban disueltos los ésteres metílicos, y depositó en un tubo de ensaye que contenía sulfato de sodio anhidro, este último procedimiento se repitió dos veces más, obteniéndose al finalizar un volumen de 3 ml los cuales se depositaron en viales especiales para cromatografía.

Para tener una muestra concentrada de ésteres metílicos; el hexano se evaporó con gas nitrógeno, contando al finalizar con una muestra de 3 µl tomando de esta 1 µl para inyectarla en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases, que realizó la separación de los ésteres metílicos.

Obtención del cromatograma

Para esto se contó con un cromatógrafo de gases con ionización de flama modelo 5890 A/3396 A, Hewlett Packard; conteniendo una columna capilar de las siguientes características: 30 m X 0.25 mm Bonded fsot, rsl-150 Polydimetilsilixano, 0.25 mm (ID) MAOT: 330° C serial 4-2441, la cual se encargo de separar los ésteres metílicos, registrandolos y graficandolos en áreas y tiempos de retención en un integrador modelo HP-3396 A, Hewlett Packard. El cromatograma obtenido de la muestra se comparo con otro de una muestra estándar de referencia (bacterial acid methyl ester co, mix, cat. no 114), que contiene un total de 10 mg/ml de ésteres metílicos bacterianos para la identificación de los ácidos grasos de dichos organismos.

Análisis Estadístico

a.) Una vez identificados los picos de cada cromatograma contra el estándar de referencia, se procedió a la normalización de los tiempos de retención y las áreas de los picos, para lo cual se seleccionó el pico con mayor área de los ésteres de ácidos grasos, asignándole el 100% y comparando este contra los demás, obteniendo también su porcentaje. Del análisis estadístico se obtuvieron las siguientes medidas descriptivas: Media y desviación estándar para las áreas normalizadas (AN) y tiempos de retención normalizados (TRN) en porcentaje, elaborando con esto los perfiles de cada especie y/o serotipo de *Salmonella* (Eerola E. y col. 1988).

b.) Se realizó un análisis multivariado discriminante paramétrico*; siendo multivariado, debido a que se analizó más de una variable (áreas de los picos), y fue paramétrico debido a que las variables que se estudiaron tienen un comportamiento normal. Este análisis tuvo por objetivo comparar las diferentes especies y/o serotipos de *Salmonella* con base en las áreas de los picos de ácidos grasos, en otras palabras, se establecieron relaciones de afinidad. Este análisis comprende 3 aspectos:

- 1.) El cálculo de las funciones discriminantes, las cuales permiten obtener las variables (picos) que más discriminaron o diferenciaron a las cepas.
- 2.) Cálculo de las distancias de Mahalanobis* que se emplea como método de clasificación taxonómica, aplicándose entre todos los posibles pares de cepas. Con estas distancias (adimensionales) se pudo medir numéricamente el grado de cercanía o relaciones entre las cepas. También se obtuvieron los niveles de significancia observados, determinando con esto si las distancias resultantes son o no significativas (Berenson M.L. 1983; Barnett V. y col. 1994).
- 3.) Finalmente se procedió a realizar un diagrama de dispersión*, el cual permitirá visualizar gráficamente la relación que guardan todas las cepas.

* Todo los análisis anteriores se realizarán con el paquete: Statistica versión 4.1 para windows.

7. RESULTADOS

Para el desarrollo de este trabajo se obtuvieron un total de 150 cromatogramas de las cepas tipificadas (50 cromatogramas por cada cepa); se hace notar que de estos, solo se escogieron los más representativos, esto es 113 cromatogramas; por otro lado de 35 aislamientos ambientales, solo 6 dieron positivo para *Salmonella*, obteniendo de estos aislamientos 48 cromatogramas (la identificación se realizó con pruebas bioquímicas y API-20; ver material y método).

Se realizó un análisis comparativo de los cromatogramas obtenidos contra un estándar de ésteres de ácidos grasos, con la finalidad de identificar los picos característicos (fig 1,2), como se aprecia a continuación:

1.) Identificación de los ácidos grasos

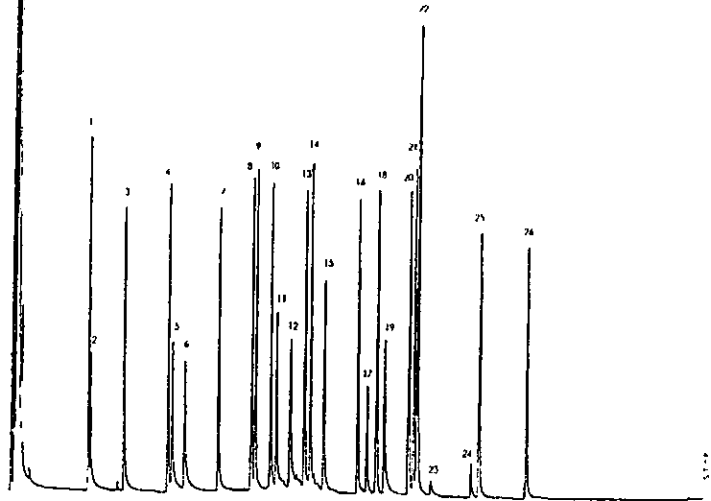
En la tabla 2 se presentan los ácidos grasos encontrados tanto para cepas tipificadas como ambientales, encontrando para ambas 8 ácidos grasos cuyos ésteres en orden de elución fueron: C12:0 metil-dodecanoico (pico 3), C14:0 metil-tetradecanoico (pico 7), 3-OH 14:0 metil 3-hidroxitetradecanoico (pico 12), 16:1⁹ metil cis-9-hexadecanoico (pico 14), 16:0 metil hexadecanoico (pico 15), 17:0 Δ metil cis-9,10-metilen-hexadecanoico (pico 17), 18:1^{9,11} metil trans-9-octadecanoico y metil cis-11-octadecanoico (pico 22) y 19:0 Δ metil cis-9,10 metilen-octadecanoico (pico24). Es importante remarcar que tanto las cepas tipificadas como las ambientales presentaron los mismos ácidos grasos.

Tabla 2. Ácidos grasos presentes en cepas tipificadas y ambientales del género *Salmonella*.

No de pico tipificada	No de pico ambiental	No de carbonos	Nombre IUPAC del éster	Nombre común del ácido
3	3	12:0	Metil dodecanoico	Láurico
7	7	14:0	Metil tetradecanoico	Mirístico
12	12	3-OH 14:0	Metil 3-hidroxitetradecanoico	β -Hidroximirístico
14	14	16:1 ⁹	Metil cis-9-hexadecanoico	Palmitoleico
15	15	16:0	Metil hexadecanoico	Palmitico
17	17	17:0 Δ	Metil cis-9, 10-metilen hexadecanoico	
22	22	18:1 ⁹ 18:1 ¹¹	Metil trans-9-octadecanoico Metil cis-11-octadecanoico	
24	24	19:0 Δ	Metil cis-9,10-metilen-octadecanoico	

FIG. 1

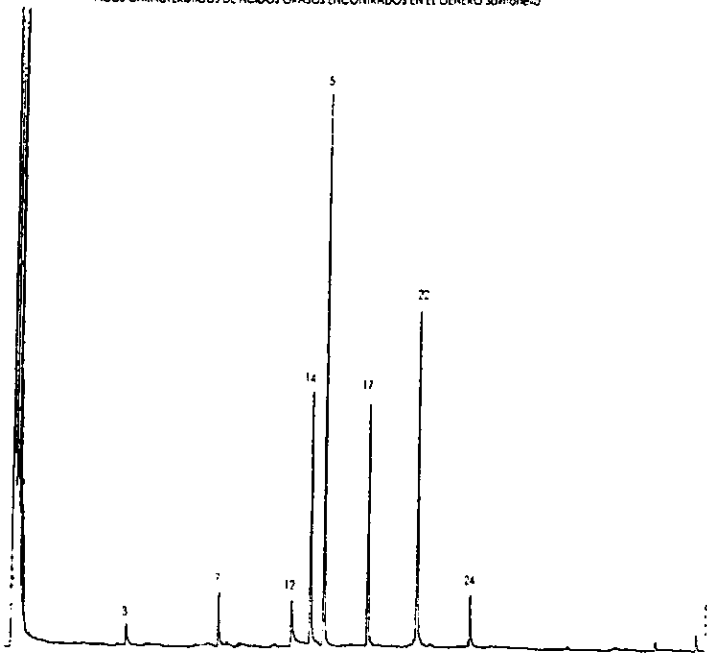
ESTANDAR DE REFERENCIA DE PICOS CARACTERÍSTICOS
DE ÁCIDOS GRASOS BACTERIANOS.



1	11:0	Me. undecanoico
2	2-OH 10:0	Me. 2-hidroxicanoico
3	12:0	Me. dodecanoico
4	13:0	Me. tridecanoico
5	2-OH 12:0	Me. 2-hidroxicanoico
6	3-OH 12:0	Me. 3-hidroxicanoico
7	14:0	Me. tetradecanoico
8	ω-15:0	Me. 13-metiltetradecanoico
9	α-15:0	Me. 12-metiltetradecanoico
10	15:0	Me. pentadecanoico
11	2-OH 14:0	Me. 2-hidroxitetradecanoico
12	3-OH 14:0	Me. 3-hidroxitetradecanoico
13	ω-16:0	Me. 14-metilpentadecanoico
14	16:1 [*]	Me. cis-9-hexadecanoico
15	16:0	Me. hexadecanoico
16	ω-17:0	Me. 15-metilhexadecanoico
17	17:0Δ	Me. cis-9,10-metilenhexadecanoico
18	17:0	Me. heptadecanoico
19	2-OH 16:0	Me. 2-hidroxihexadecanoico
20	18:2 ¹¹	Me. cis-9,12-octadecadienoico
21	18:1 [*]	Me. cis-9-octadecanoico
22	18:1 [*]	Me. trans-9-octadecanoico &
	18:1 ¹¹	Me. cis-11-octadecanoico
23	18:0	Me. octadecanoico
24	19:0Δ	Me. cis-9,10-metilenoctadecanoico
25	19:0	Me. nonadecanoico
26	20:0	Me. eicosanoico

FIG 2

PICOS CARACTERÍSTICOS DE ÁCIDOS GRASOS ENCONTRADOS EN EL GÉNERO *Salmonella*



2.) Normalización de datos

La normalización de los datos se realizó seleccionando el pico del ácido graso con el valor más alto bajo la curva, asignándole el 100%, este fue el pico número 15 en los 161 casos (tanto en cepas ambientales como en tipificadas). Posteriormente se realizó una comparación de éste contra los demás picos para obtener los porcentajes de las áreas de cada pico, obteniendo los siguientes resultados:

I.) Perfil cromatográfico de las cepas tipificadas

Una vez obtenidos los datos de las cepas tipificadas se procedió a calcular la media y la desviación estándar para las áreas y tiempos de retención en porcentaje por pico para, de esta manera realizar las gráficas correspondientes para cada especie tipificada (figura 3 a 5).

a.) *Salmonella enteritidis* (serotipo *typhimurium*): Para este se realizaron 42 corrimientos cromatográficos de la cepa tipificada (INDRE), en donde se obtuvieron 8 ácidos grasos. El ácido graso más abundante se encontró en el pico 15, posteriormente le siguió el pico 22 con una media de área normalizada de 51.96%, el pico 17 con 46.04%, el pico 12 con 32.43%, el pico 14 con 31.27%, el pico 7 con 17.01%, el pico 3 con 16.95% y el pico 24 con 12.81% (figura 3, tabla 3).

b.) *Salmonella typhi*: Para esta especie se realizaron 37 corrimientos cromatográficos de una cepa tipificada. El pico con el valor más alto fue el 15, seguido por el pico 17 con 48.76%, el pico 22 con 39.34%, el pico 14 con 38.45%, el pico 12 con 19.65%, el pico 7 con 14.22%. el pico 24 con 11.79% y el pico 3 con 8.71%. (figura 4, tabla 3).

c.) *Salmonella paratyphi*: Se realizaron 34 corrimientos cromatográficos de este serotipo tipificado. El pico más alto fue el 15, siguiéndole el pico 14 con una media de área de 67.52%, el pico 22 con 38.39%, el pico 17 con 24.62%, el pico 12 con 22.67%, el pico 7 con 17.28%. el pico 3 con 8.42% y el pico 24 con 5.80% (figura 5, tabla 3).

FIG. 3
PERFIL CROMATOGRÁFICO DE LOS ÁCIDOS GRASOS
DE *Salmonella enteritidis* (serotipo typhimurium)

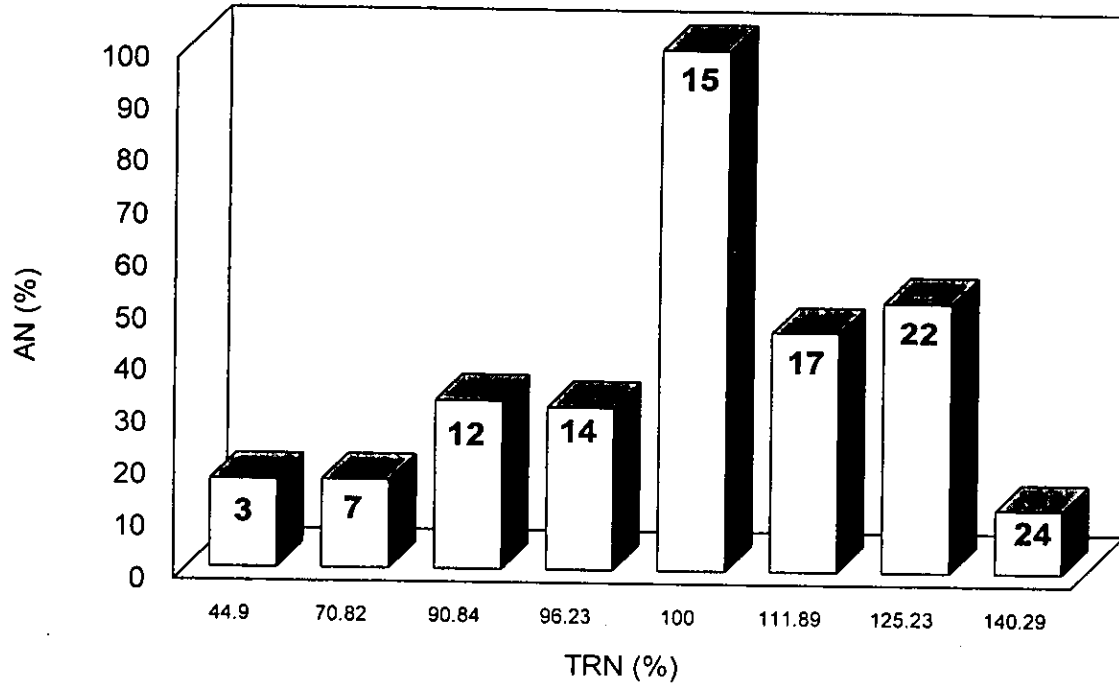


FIG. 4
PERFIL CROMATOGRÁFICO DE LOS ÁCIDOS GRASOS
DE *Salmonella typhi*

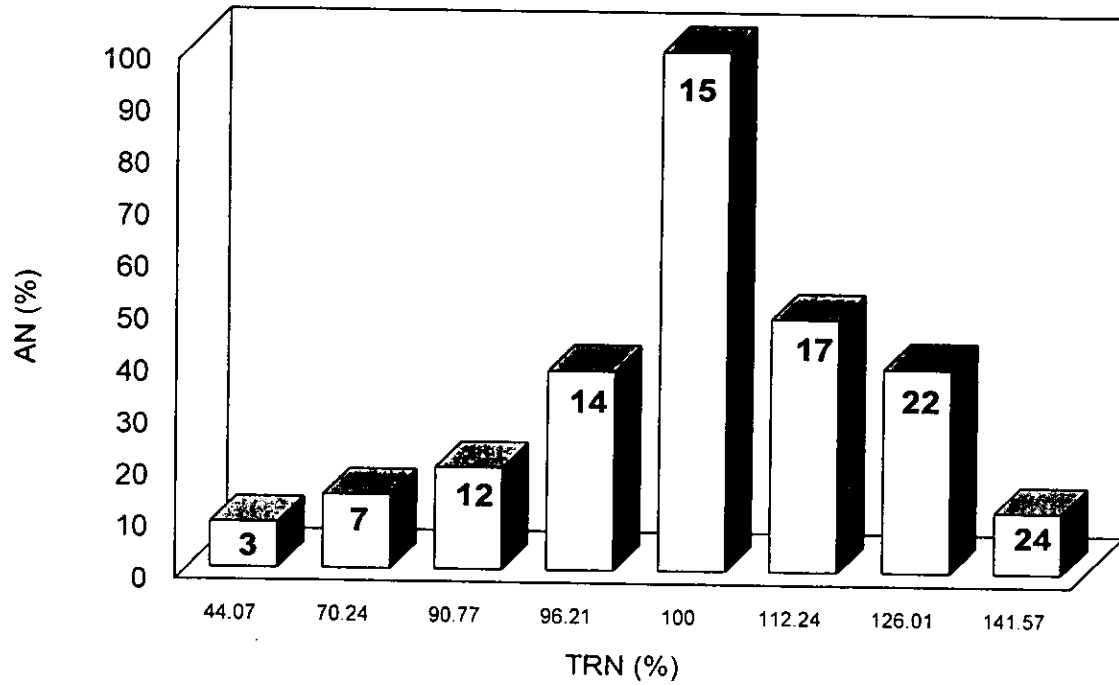


FIG. 5
PERFIL CROMATOGRÁFICO DE LOS ÁCIDOS GRASOS
DE *Salmonella paratyphi*

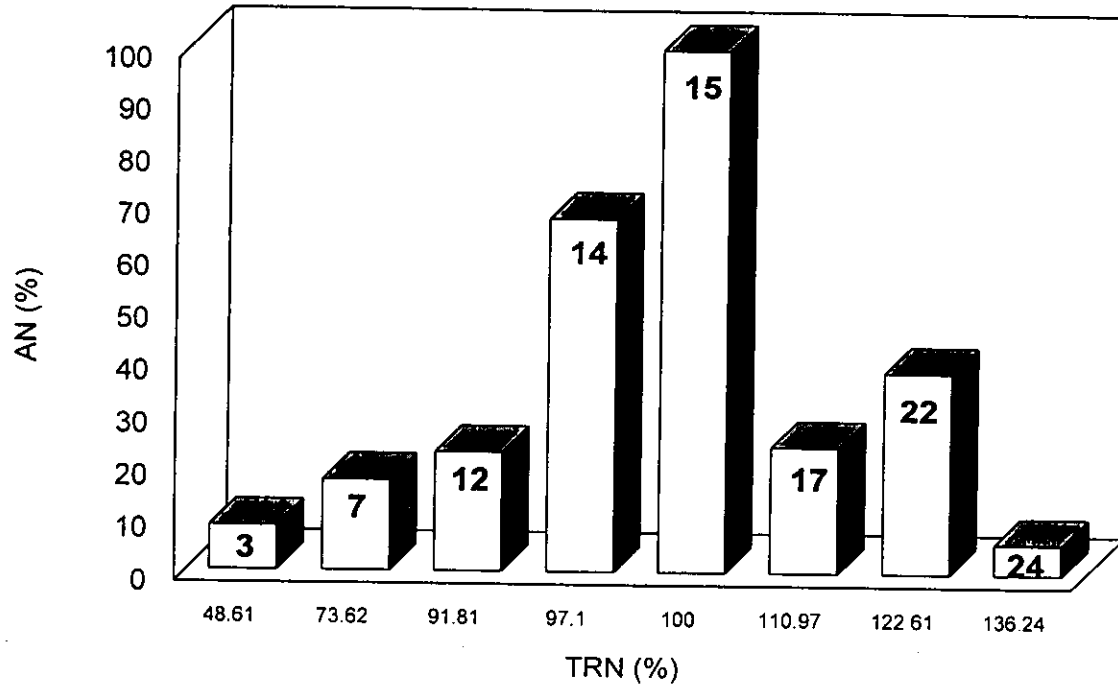


Tabla 3. Medias (\bar{x}) y desviaciones estándar (s) de las áreas normalizadas (AN) y tiempos de retención normalizados (TRN) en porcentaje de cepas tipificadas de *Salmonella*

	<i>Salmonella enteritidis</i>				<i>Salmonella typhi</i>				<i>Salmonella paratyphi</i>			
	AN		TRN		AN		TRN		AN		TRN	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s
PICO 3	16.95	±3.59	44.90	±0.11	8.71	±3.17	44.07	±0.16	8.42	±2.18	48.61	±3.03
PICO 7	17.01	±3.87	70.82	±0.05	14.22	±3.72	70.24	±0.16	17.28	±4.34	73.62	±2.26
PICO 12	32.43	±9.55	90.84	±0.08	19.65	±3.63	90.77	±0.16	22.67	±5.05	91.81	±0.06
PICO 14	31.27	±9.07	96.23	±0.04	38.45	±11.3	96.21	±0.06	67.52	±10.5	97.10	±0.67
PICO 15	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0
PICO 17	46.04	±8.56	111.89	±0.03	48.76	±6.98	112.24	±0.08	24.62	±4.38	110.9	±0.98
PICO 22	51.96	±10.9	125.23	±0.05	39.34	±5.89	126.01	±0.09	38.39	±8.64	122.6	±2.35
PICO 24	12.18	±2.90	140.29	±0.14	11.79	±3.83	141.57	±0.19	5.80	±0.85	136.2	±3.77

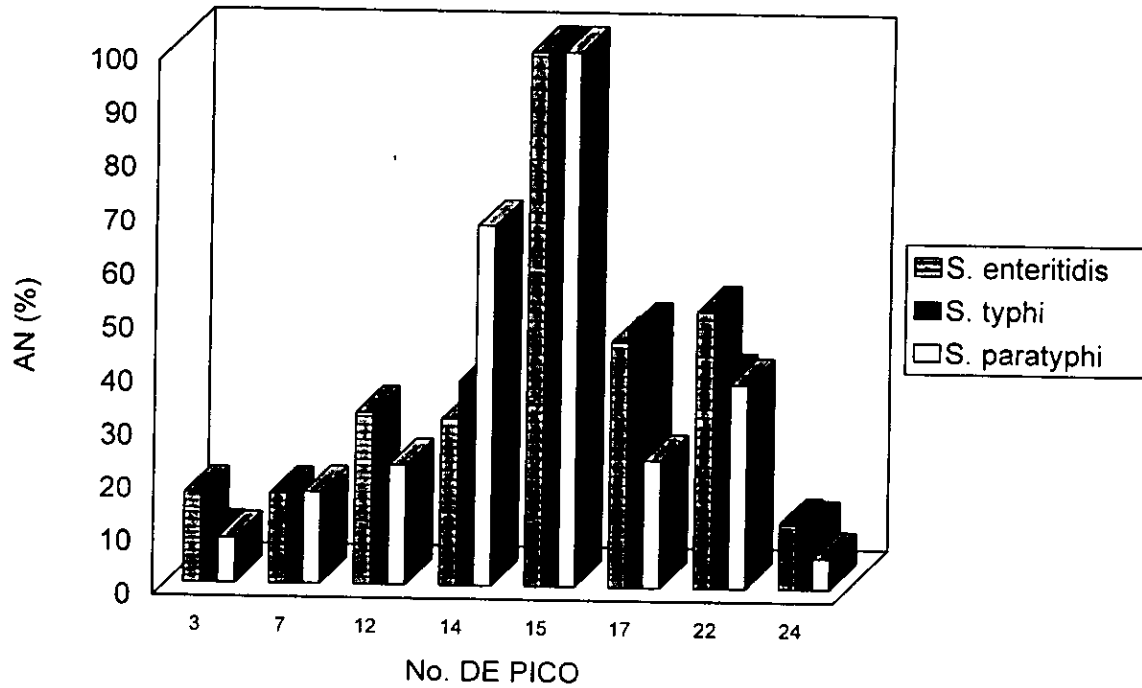
d.) Comparación de ácidos grasos entre las tres cepas de *Salmonella* tipificadas: Una vez obtenidos los perfiles de ácidos grasos para cada especie se realizó su comparación, graficando las áreas normalizadas en porcentaje y número de picos por especie y/o serotipo (fig. 6). Al analizar los perfiles de las tres cepas se puede observar que *S. enteritidis* (serotipo *typhimurium*) fue la que presentó los valores más altos en los picos 22 (51.96%), 12 (32.43%), 3 (16.95%) y 24 (12.18%), seguido por *S. paratyphi* con dos valores altos en los picos 14 (67.52%) y 7 (17.28%), mientras que la de *S. typhi* presentó solo un valor alto en el pico 17 (48.76%), con esto nos podemos dar cuenta que las tres cepas tipificadas presentan los ácidos grasos característicos del género *Salmonella*, pero estos difieren con respecto a los porcentajes entre picos con la misma numeración.

II.) Perfil cromatográfico de las muestras ambientales

Se obtuvieron 6 cepas de *Salmonella* aisladas del ambiente: *Salmonella* 4, 5, 6, 7, 8 y 9, realizando 8 corrimientos cromatográficos para cada una. Obtenidos los picos de ácidos grasos, estos se normalizaron por medio del cálculo de la media y desviación estándar (en porcentaje) de las áreas y tiempos de retención, graficándose con la finalidad de obtener su perfil (fig. 7 a 12) dándonos los siguientes resultados:

a.) *Salmonella* 4: En la figura 7 se aprecia el perfil cromatográfico obtenido de la tabla 4, donde el pico número 15 presentó el valor más alto

FIG. 6
COMPARACIÓN DE LOS PERFILES DE ÁCIDOS GRASOS DE
S. enteritidis (serotipo *typhimurium*), *S. typhi* y *S. paratyphi*



(100%), siguiéndole el 22 (82.67%), el 14 (54.55%), el 17 (35.19%), el 12 (34.81%), el 7 (20.26%), el 3 (18.72%) y el 24 (7.18%).

b.) *Salmonella* 5: En la figura 8 se observa el perfil cromatográfico de la muestra ambiental 5, obtenida a partir de la tabla 4. El pico 15 presentó el valor más alto de área con un 100%, siguiéndole el 22 (48.21%), el 17 (45.16%), el 14 (33.30%), el 12 (24.60%), el 3 (18.91%), el 7 (16.71%) y el 24 (13.77%).

c.) *Salmonella* 6: De igual manera en la figura 9 se puede apreciar el perfil cromatográfico de la muestra ambiental 6, que es el resultado de los valores tomados de la tabla 4. El valor más alto correspondió al pico 15, siguiéndole el 14 (47.51%), el 12 (38.90%), el 22 (37.29%), el 17 (26.24%), el 3 (17.42%), el 7 (16.32%) y el 24 (8.99%).

d.) *Salmonella* 7: En la figura 10 se aprecia el perfil cromatográfico de la muestra ambiental 7, que se obtuvo a partir de tabla 4. El valor más elevado correspondió al pico 15, siguiéndole el 17 (52.84%), el 22 (35.18%), el 14 (28.66%), el 12 (21.59%), el 24 (12.16%), el 7 (10.94%) y el 3 (10.01%).

e.) *Salmonella* 8: En la figura 11 se puede observar el perfil cromatográfico para la muestra ambiental número 8, que es la resultante de los valores obtenidos de la tabla 4. El pico 15 otra vez presentó el valor más elevado, siguiéndole el 17 (49.16%), el 22 (45.39%), el 14 (33.26%), el 12 (25.37%), el 3 (14.71%), el 7 (12.68%) y el 24 (12.67%).

f.) *Salmonella* 9: Por último en la figura 12 se aprecia el perfil cromatográfico de la muestra ambiental 9, que fue obtenido de la tabla 4. El pico 15 presentó una vez más el valor más alto siguiéndole el 17 (48.11%), el 22 (32.64%), el 14 (27.56%), el 12 (18.79%), el 7 (15.63%), el 24 (14.53%) y el 3 (14.22%).

g.) **Comparación del contenido de ácidos grasos entre las 6 cepas ambientales de *Salmonella*:** En la figura 13 se presenta una comparación entre las medias de las áreas normalizadas (en porcentaje) y número de pico de los ácidos grasos de las cepas ambientales. Puede observarse que la cepa de *Salmonella* número 4 fue la que presentó el mayor número de valores altos (en comparación con los picos restantes) de áreas en los ácidos grasos: pico 22 (82.67%), pico 14 (54.55%) y pico 7 (20.26%). Le siguieron la *Salmonella* 7 pico 17 (52.84%), la *Salmonella* 6 pico 12 (30.90%), la *Salmonella* 5 pico 3 (18.72%) y la *Salmonella* 9 pico 24 (14.53%), todas estas con un solo valor mayor. Estos resultados arrojan que todas presentan los mismos ácidos grasos al igual que las cepas tipificadas, por lo que se trata de *Salmonella* sp, apoyando las pruebas bioquímicas que anteriormente se habían realizado a

FIG. 7
PERFIL CROMATOGRÁFICO DE LOS ÁCIDOS GRASOS
DE MUESTRA AMBIENTAL 4

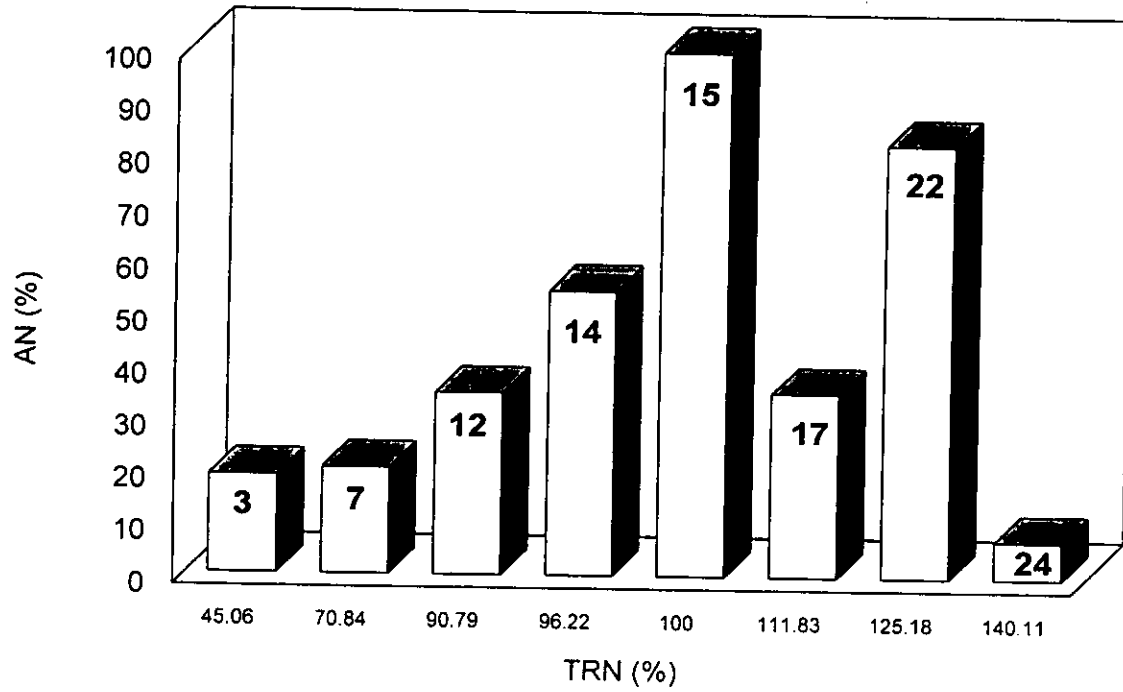


FIG. 8
PERFIL CROMATOGRÁFICO DE LOS ÁCIDOS GRASOS
DE MUSTRA AMBIENTAL 5

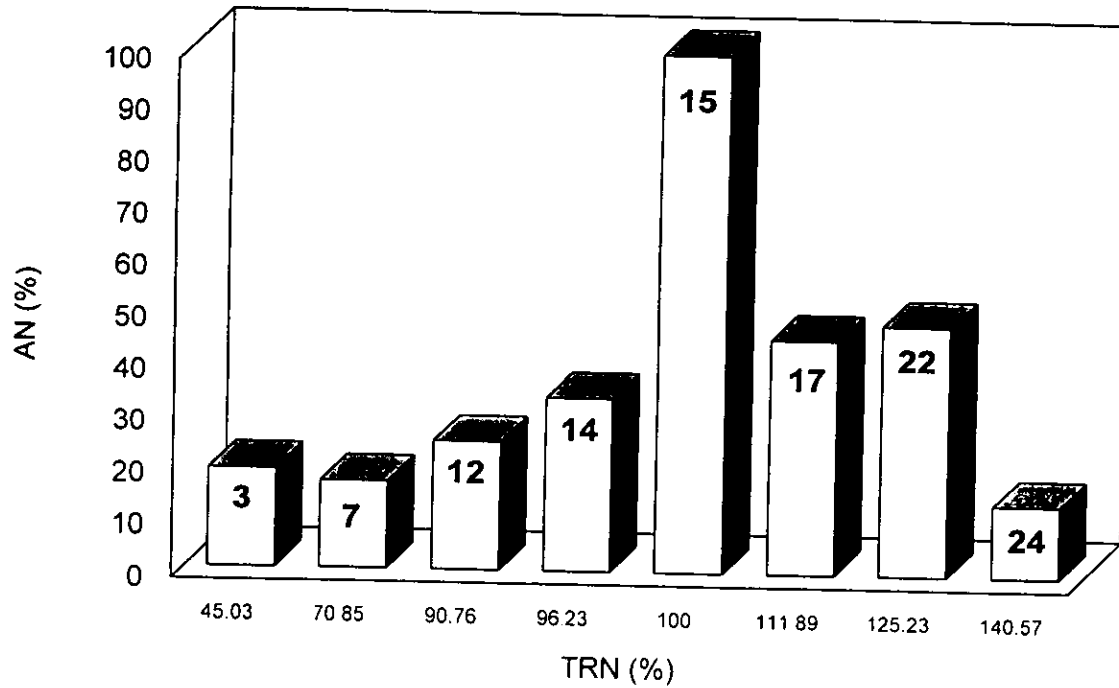


FIG. 9
PERFIL CROMATOGRÁFICO DE LOS ÁCIDOS GRASOS
DE MUSTRA AMBIENTAL 6

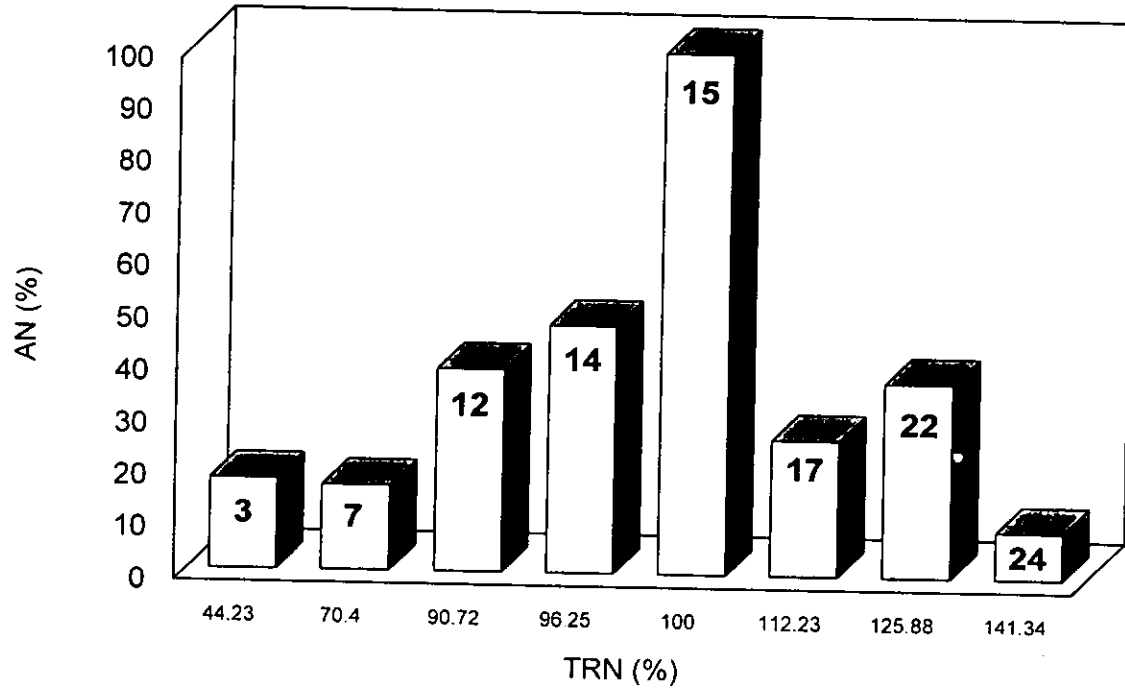


FIG. 10
PERFIL CROMATOGRÁFICO DE LOS ÁCIDOS GRASOS
DE MUESTRA AMBIENTAL 7

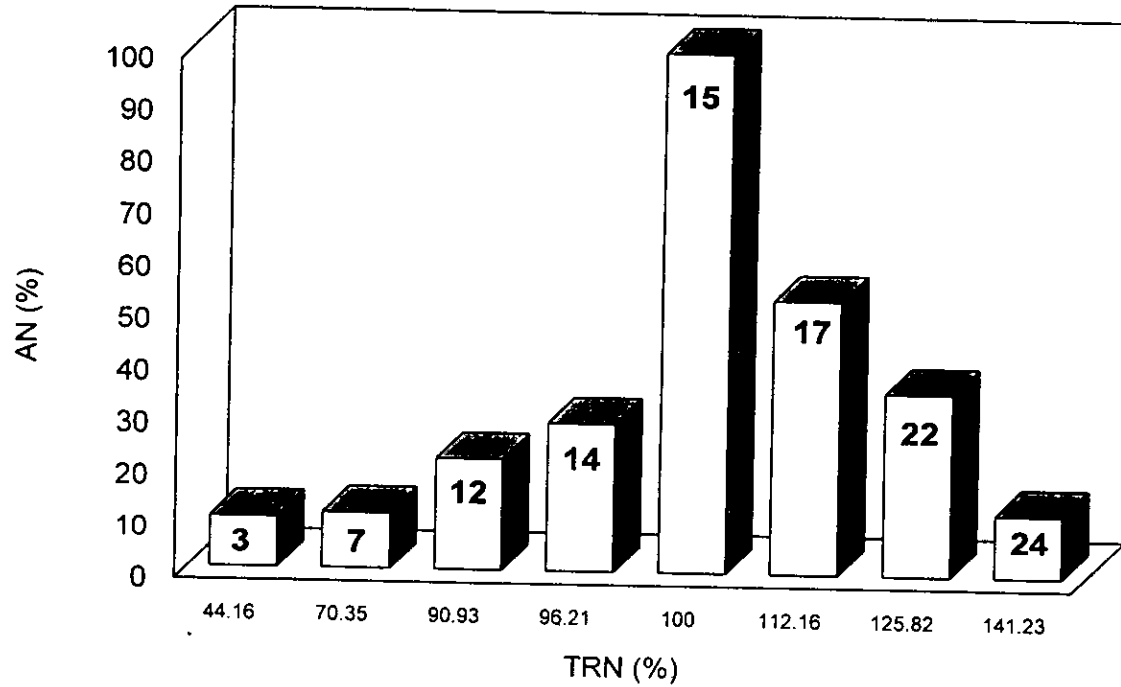


FIG. 11
PERFIL CROMATOGRÁFICO DE LOS ÁCIDOS GRASOS
DE MUESTRA AMBIENTAL 8

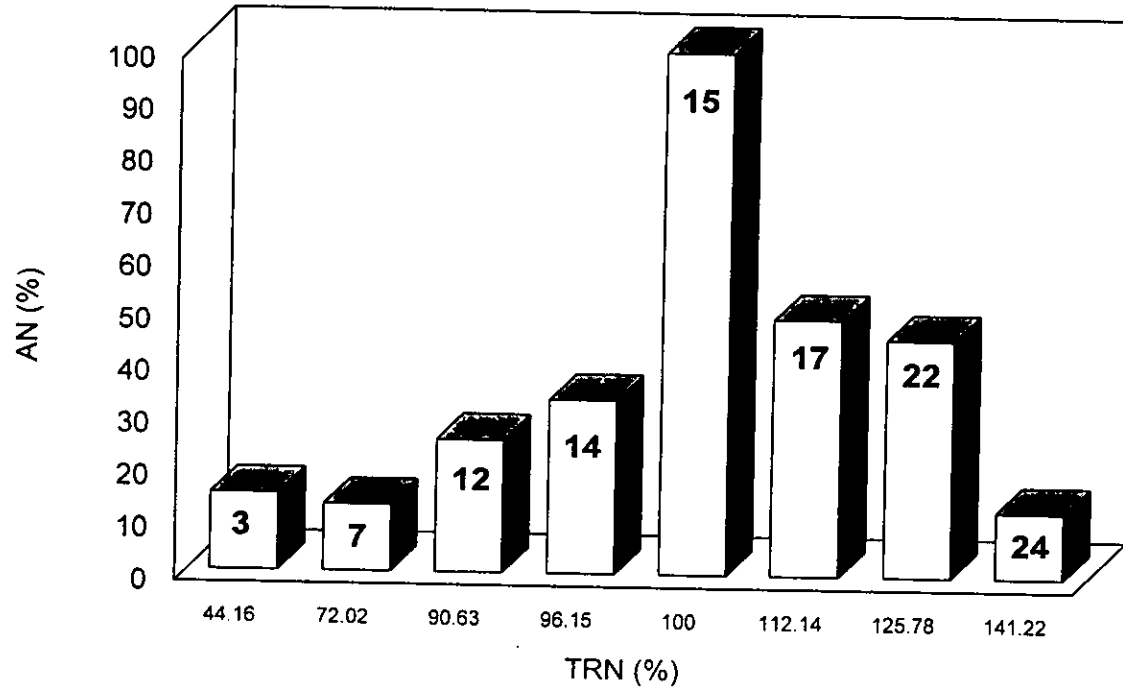


FIG. 12
PERFIL CROMATOGRÁFICO DE LOS ÁCIDOS GRASOS
DE MUSTRA AMBIENTAL 9

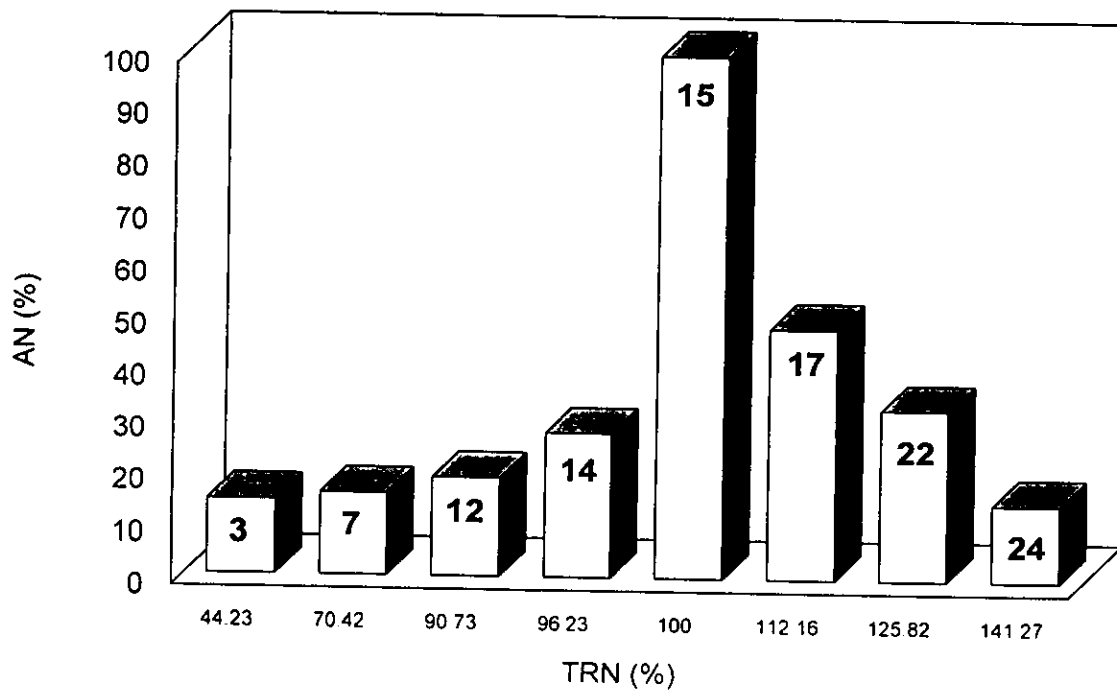
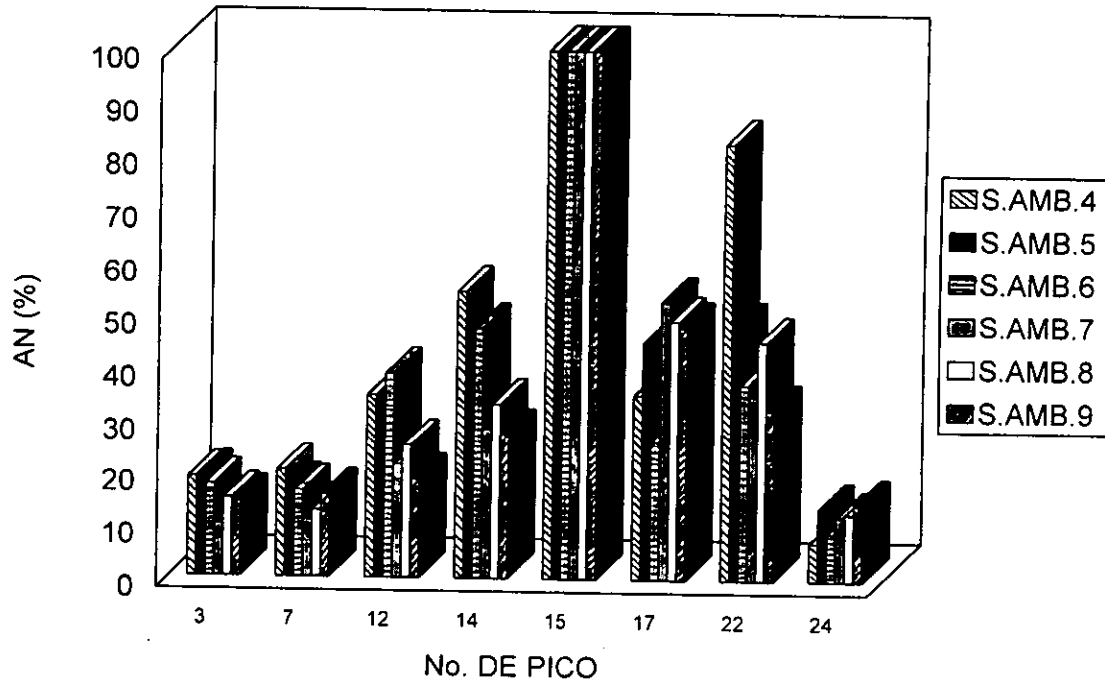


FIG. 13
 COMPARACIÓN DE LOS PERFILES DE ÁCIDOS GRASOS DE
 MUESTRAS AMBIENTALES



estas. Por otro lado las cepas presentan diferencias en cuanto al porcentaje en concentración de ácidos grasos.

Tabla 4. Medias (\bar{x}) y desviaciones estándar (s) de las áreas normalizadas (AN) y tiempos de retención normalizados (TRN) en porcentaje de muestras ambientales de *Salmonella*.

	<i>Salmonella</i> 4		<i>Salmonella</i> 5		<i>Salmonella</i> 6		<i>Salmonella</i> 7		<i>Salmonella</i> 8		<i>Salmonella</i> 9		
	AN	TRN	AN	TRN	AN	TRN	AN	TRN	AN	TRN	AN	TRN	
PICO 3	\bar{x}	18.72	45.06	18.91	45.03	17.42	44.23	10.01	44.16	14.71	44.16	14.22	44.23
	S	± 2.31	0.03	3.97	0.04	2.49	0.13	2.59	0.07	1.98	0.03	3.78	0.09
PICO 7	\bar{x}	20.26	70.84	16.71	70.85	16.32	70.40	10.94	70.35	12.68	72.02	15.63	70.42
	S	± 2.28	0.03	5.22	0.06	4.35	0.20	1.72	0.03	3.58	2.09	3.65	0.06
PICO 12	\bar{x}	34.81	90.79	24.60	90.763	38.90	90.72	21.59	90.93	25.37	90.63	18.79	90.73
	S	± 6.00	0.03	2.5	0.07	3.56	0.23	4.48	0.16	2.39	0.12	1.51	0.08
PICO 14	\bar{x}	54.55	96.22	33.30	96.23	47.51	96.25	28.66	96.20	33.26	96.15	27.56	96.23
	S	± 3.32	0.02	4.79	0.05	7.43	0.25	1.33	0.03	3.54	0.04	2.03	0.07
PICO 15	\bar{x}	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	S	± 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PICO 17	\bar{x}	35.19	111.8	45.16	111.8	26.24	112.2	52.84	112.1	49.16	112.1	48.11	112.1
	S	± 2.36	0.04	6.32	0.03	2.51	0.30	3.36	0.01	4.67	0.02	5.89	0.03
PICO 22	\bar{x}	82.67	125.1	48.21	125.2	37.29	125.8	35.18	125.8	45.39	125.7	32.64	125.8
	S	± 7.20	0.02	7.74	0.03	3.75	0.33	4.11	0.02	5.27	0.03	4.97	0.05
PICO 24	\bar{x}	7.18	140.1	13.77	140.5	8.99	141.3	12.16	141.2	12.67	141.2	14.53	141.2
	S	± 0.79	0.08	4.76	0.38	2.37	0.44	2.65	0.02	3.14	0.07	4.08	0.12

3.) Comparación entre cepas tipificadas y cepas ambientales, por medio del analisis multivariado discriminante:

Los datos sin normalizar se usaron para este análisis, determinando como las variables (área de los ácidos grasos) discriminan a los miembros de un grupo (tres cepas tipificadas y seis cepas ambientales), indicando a que grupo pertenece cada miembro dentro de una población.

El nivel de significancia que se tomó fue de 0.05, ya que este es el más apropiado y utilizado para este tipo de análisis, encontrándose los siguientes resultados:

Función	Picos discriminantes	X ²	Nivel de significancia observado P	%
1	17, 14	637.92	0.0	67.4
2	22, 3	321.15	0.0	86.9
3	13	154.61	0.0	95.8

La primera función integrada por los picos 17 y 14 explicó el 67.4% de la variación total de los datos. La segunda función integrada por los picos 22 y 3 que explicó el 19.5% (esto es restando; 86.9-67.4) del total de la variación de los datos y la tercera función que integró al pico 13 explicando el 8.9% (de la resta entre 95.8-86.9) de la variación total de los datos. Estos picos fueron los que más discriminaron a las especies, resultando estadísticamente significativas ($p < 0.05$), los picos 7, 15 y 24 no presentaron una variación significativa. Estos resultados arrojan que hay diferencias entre ciertos picos de ácidos grasos, por lo que, se trata de cepas diferentes (tanto de cepas ambientales así como de cepas tipificadas).

***Distancias de Mahalanobis:** Una vez que se calcularon estas distancias tanto para cepas tipificadas (grupo 1,8 y 9), así como para cepas ambientales (grupos 2,3,4,5,6 y 7) se obtuvo la tabla 5, en donde podemos observar, que a números menores la relación taxonómica entre cepas es muy cercana, siendo el caso del grupo 1,6 que presentó un valor de 3.43; siguiéndole el grupo 5,8 con valor de 3.58; detrás de este tenemos al grupo 5,6 con un valor de 4.05; siguiendo el grupo 1,3; con un valor presentado de 4.08 y finalmente el grupo 3,6 que presentó un valor de 4.29, mientras que a números mayores las relaciones taxonómicas se van haciendo cada vez más grande; es por esto que las *Salmonellas* tipificadas que pertenecen a especies y/o serotipos diferentes como son: grupo 1 *Salmonella enteritidis* (serotipo *typhimurium*), grupo 8 *Salmonella typhi* y grupo 9 *Salmonella paratyphi*, están muy alejadas entre sí, ya que sus distancias son muy grandes (grupo 1,8 con una distancia de 13.24; grupo 1,9 con distancia de 47.64; y grupo 8,9 con una distancia de 22.52). Al aplicar el nivel de significancia de 0.05, este mostró que solo en dos pares de grupos no existe una diferencia significativa ($p > 0.05$), los cuales son: grupos 3,6 con un valor de 0.072, y grupos 6,5 con valor de 0.091; existiendo en todos los demás diferencias significativas ($p < 0.05$), con lo cual se corrobora, que algunos grupos están más relacionados que otros.

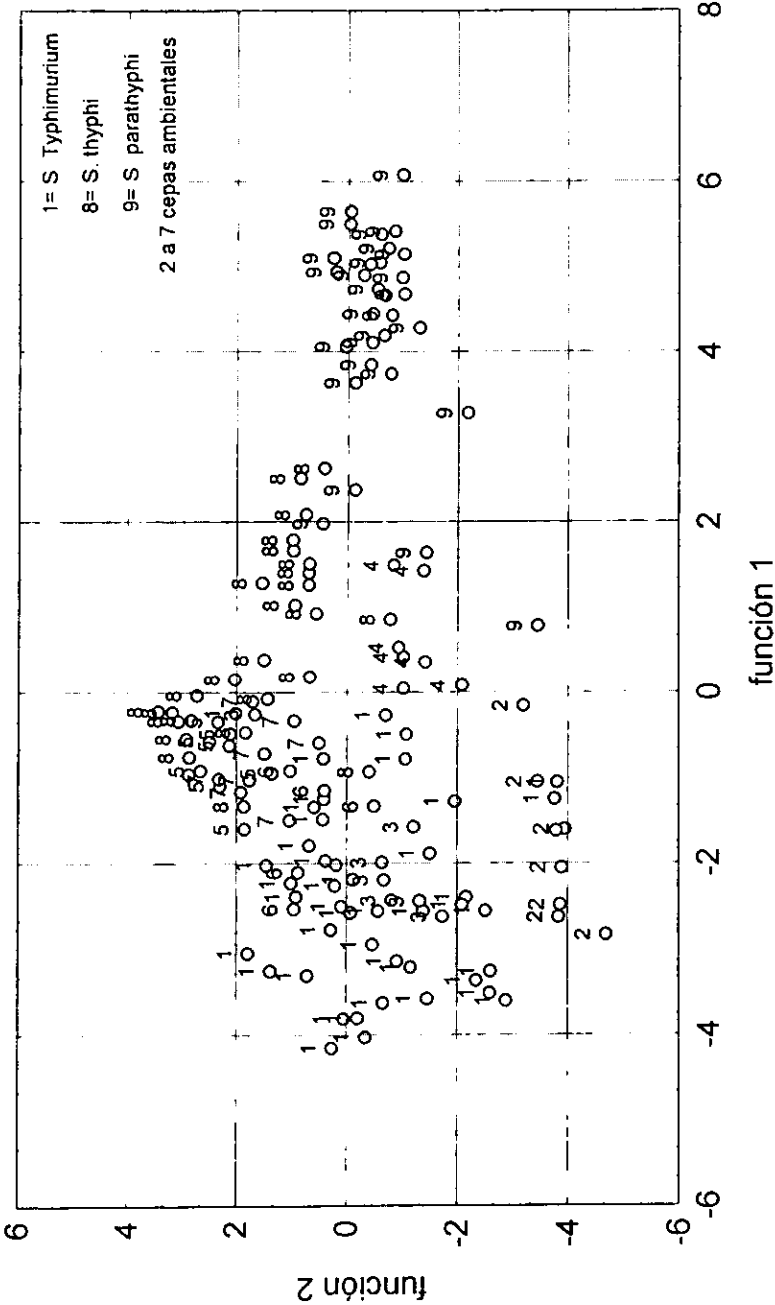
Tabla No 5. Distancias de Mahalanobis de las 9 cepas de *Salmonella*, tanto de las tipificadas como ambientales.

Especie	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6	Grupo 7	Grupo 8	Grupo 9
Grupo 1	0	19.63	4.08	18.34	11.03	3.43	9.62	13.24	47.64
Grupo 2	19.63	0	22.00	43.33	45.18	26.77	42.34	37.95	56.43
Grupo 3	4.08	22.00	0	20.55	14.24	4.29	5.70	14.05	44.54
Grupo 4	18.34	43.33	20.55	0	24.57	19.17	20.45	23.77	24.95
Grupo 5	11.03	45.18	14.24	24.57	0	4.05	6.83	3.58	37.83
Grupo 6	3.43	26.77	4.29	19.17	4.05	0	5.74	6.73	39.93
Grupo 7	9.62	42.34	5.70	20.45	6.83	5.74	0	6.39	35.39
Grupo 8	13.24	37.95	14.05	23.77	3.58	6.73	6.39	0	22.52
Grupo 9	47.64	56.43	44.54	24.95	37.83	39.93	35.39	22.52	0

4.) Diagrama de dispersión

De acuerdo al diagrama de dispersión obtenido (fig. 14), se puede ver que el grupo 1 pertenece *S. enteritidis* (serotipo *typhimurium*), el grupo 8 es *S. typhi*, y el grupo número 9 es *S. paratyphi*, mientras que los grupos 2, 4, 5, 6 y 7 están más cerca a los grupos de *Salmonellas* ambientales. Encontramos que la cepa ambiental 3 y 6 se encuentran muy relacionadas con *S. typhimurium*, igualmente ocurre pero, algo más alejadas con las cepas ambientales 5 y 7, que se encuentran relacionadas con *S. typhi*, mientras las cepas ambientales 2, 4 y *S. paratyphi* no tienen relación con ninguna otra cepa ambiental o tipificada.

Fig.14 Diagrama de dispersión para las dos primeras funciones discriminantes.



8. DISCUSIÓN

De los resultados que se obtuvieron podemos decir:

Como punto número uno, que tanto las cepas tipificadas así como las ambientales, dieron un total de 8 ácidos grasos (tabla 2), los cuales tienen una representación: Pico 3=C 12:0, pico 7=C 14:0, pico 12=C 3-OH 14:0, pico 14=C 6:1, pico 15=C 16:0, Pico 17=C 17:0, pico 22=C 18:0 y pico 24 =C 19:0. Si comparamos estos resultados con los citados en la bibliografía, como los ácidos grasos distintivos de la familia *Enterobacteriaceae* tenemos, que para Abel K. y col. (1962), los ácidos carboxílicos característicos para esta familia, en orden de mayor a menor área son: C 16:0, C 17:0, C 18:1 y C 19:0; en cambio Bøe B. y col. (1980) proponen a los C 16:0, C 16:1 y el C 17:0, como los más representativos de esta familia, pero mencionando en especial, que el más prominente de todos estos es el C 16:0. mientras Häusler J. (1987) propone al C 16:0, como el que más distingue a la familia, mismo que en todos los cromatogramas que obtuvimos presentó el pico con el área más grande (fig. 2 a 13), siguiéndole el C 17:0 y por último el C 18:1 (fig. 6 y 13). Con todo lo anterior y de acuerdo a los resultados que nosotros obtuvimos, tenemos que el C 16:0 y C 17:0 son los más distintivos de la familia *Enterobacteriaceae*. Si realizamos una comparación entre familias, tenemos que los ácidos grasos distintivos para la familia *Vibrionaceae* son los, C 16:1 y C 18:1, según Bøe B. y col. (1980), mientras para Häusler J. (1987) es el C 16:1 el más típico de esta familia. Por otro lado tenemos que Abel K. y col. en 1962 descubren que para la familia *Bacillaceae* el C 15:0 es el más distintivo, mientras que para la familia *Micrococcaceae* es el C 20:0; viendo con esto que para cada familia hay ácidos grasos que son distintivos a cada familia.

Como punto número dos, tenemos que si aplicamos una comparación de los ácidos carboxílicos (ácidos grasos) que se obtuvieron del género *Salmonella* (fig. 6 y 13), y los ácidos carboxílicos de la especie *Escherichia coli*, tenemos que Bøe B. y col. (1980) reconocen a los C 16:0, C 17:0, C 14:0, C 16:1, C 12:0, C 18:1, C 15:0, C 19:0, C 18:0, C 17:0 y C 13:0, en orden de mayor a menor área, como los ácidos grasos típicos de *E. coli*. Si a estos los comparamos con los del género *Salmonella*, que obtuvimos y los cuales fueron en orden de mayor área a menor: C 16:0, C 17:0, C 18:1, C 16:1, C 3-OH 14:0, C 14:0, C 19:0 y C 12:0. Tenemos que mientras algunos ácidos carboxílicos son comunes para ambos microorganismos como son el C 12:0, C 14:0, C 16:1, C 16:0, C 17:0, C 18:1 y C 19:0, otros ácidos grasos solo se encuentran en una u otra bacteria, como por ejemplo en el género *Salmonella* solo encontramos al C 3-OH 14:0 y en *E. coli* encontramos a C 13:0, C 15:0 y

17:0'. Con esto tenemos que se pueden diferenciar microorganismos de acuerdo a los patrones de sus ácidos carboxílicos

Como punto número tres, encontramos que Brock T.D. en 1987, señala que los ácidos grasos encontrados con mayor frecuencia en *Salmonella* son los ácidos β -hidroximirístico (C 3-OH 14:0), láurico (C 12:0), mirístico (C 14:0) y palmítico (C 16:0) ver la tabla 2. Por otro lado Bøe B. y col. 1987 colocan a los C 12:0, C 14:0, C 16:1, C 16:0, C 17:0, C 18:1 y C 19:0, como los ácidos carboxílicos que con mayor frecuencia encontró en *Salmonella typhimurium* y *S. dublin*. Aquí cabe notar que hay diferencias entre los dos autores en cuanto al número de ácidos carboxílicos reportados, pero que estos concuerdan con los ácidos grasos encontrados por nosotros tanto en cepas ambientales como en las tipificadas (fig. 3 a la 13).

Y finalmente como punto número cuatro, podemos decir que al aplicar un análisis multivariado discriminante, pero en especial al desarrollar las distancias de Mahalanobis (tabla 5), se puede ver que algunas *Salmonellas* ambientales están muy próximas a algunas especie y/o serotipo, esto es; el grupo ambiental 3 con valor de 4.08, el grupo ambiental 6 cuyo valor es de 3.43 están estrechamente relacionados al grupo tipificado 1 que corresponde a la *Salmonella enteritidis* (serotipo *typhimurium*), por lo que se podría tratar de la misma especie y/o serotipo, lo cual es corroborado con el diagrama de dispersión (fig. 14). En segundo termino el grupo ambiental 5 que presenta un valor de 3.58 con respecto al grupo tipificado 8, el cual corresponde a *Salmonella typhi*, nos da como resultado que ambas están relacionadas. Por otra parte los grupos ambientales 5, 6 con un valor de 4.05 y los grupos ambientales 3, 6 con un valor de 4.29 están también estrechamente emparentados. En todos los casos anteriores se puede decir que las cepas tanto ambientales como tipificadas están muy próximas taxonómicamente. Finalmente *S. paratyphi* grupo 9 y los restantes grupos ambientales 2 y 4 no presentan ninguna similitud, ya que sus distancias son muy grandes, tratándose por lo tanto de otras especies y/o serotipos, apoyándose en el diagrama de dispersión (fig. 14). Este y otros tipos de análisis son importantes cuando se trata de llegar a clasificaciones de microorganismos (Ryll M. y col. 1996; Steele M. y col. 1997).

9. CONCLUSIONES

Del Presente trabajo se concluye lo siguiente:

Las tres cepas tipificadas *Salmonella enteritidis* (serotipo *typhimurium*), *S. paratyphi* y *S. typhi* y las 6 cepas aisladas del ambiente presentaron 8 ácidos grasos en total, los cuales son: C12:0 metil dodecanoico, C14:0 metil tetradecanoico, C3-OH 14:0 metil 3-hidroxitetradecanoico, C16:1⁹ metil cis9-hexadecanoico, C16:0 metil hexadecanoico, C17:0Δ metil cis-9, 10-metilen hexadecanoico, C18:1⁹ metil trans-9-octadecanoico y C18:1¹¹ metil cis 11-octadecanoico, y finalmente C19:0Δ metil cis-9,10-metilen-octadecanoico.

Con los resultados que se obtuvieron se puede observar que la diferenciación de una cepa a otra cepa se da en la cantidad (porcentaje) de un ácido graso de la pared bacteriana; En las salmonelas que se aislaron del ambiente cabe hacer notar que se encontraron diferencias significativas entre ellas, pero al relacionar estas con los grupos tipificados se encontró que los grupos 3 y 6 pertenecen a *Salmonella enteritidis* (serotipo *typhimurium*), mientras que el grupo 5 perteneció a *Salmonella typhi*, y que los grupos 2,4 y 7 pueden pertenecer a cualquiera de los restantes especies y/o serotipos de *Salmonella*.

Con el contenido de ácidos grasos obtenidos de las cepas tipificadas así como de las cepas ambientales se elaboró un perfil único de ácidos grasos para el género *Salmonella*, este servirá para incrementar a los ya existentes de la familia *Enterobacteriaceae* en el laboratorio de bacteriología y cromatografía del proyecto de Conservación y Mejoramiento del Medio Ambiente.

10 . RECOMENDACIONES

Para posteriores estudios se propone:

Trabajar con las concentraciones de los ácidos grasos celulares de los diferentes serotipos de *Salmonellas* spp; esto es, si se tiene un estándar de ácidos grasos que puede estar dado en mg/ml, se puede preparar una curva de calibración; que al inyectar 1ml por cada punto de la curva, este producirá un pico con un área x por cada dilución. Lo que se tiene que hacer después es inyectar el analito para obtener un área x, que al aplicar una regresión lineal obtendremos por lo tanto los mg/ml.

Seguir trabajando con otras especies y/o serovariedades de *Salmonella* Spp. de interés clínico y alimenticio para ir incrementando los perfiles de ácidos carboxílicos.

11. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Abel K., de Schmertzin H., and Peterson J.L 1963. *Classification of microorganisms by analysis of chemical composition. Journal bacteriology.* 85; 1039-1044.
- 2) Alcántara B.M.C., 1979. *Química inorgánica moderna, primera edición, CECSA, México D.F.* 636 pp.
- 3) Alugupalli S., Portaelis F., and Larson L., 1994. *Systematic study of 3-Hidroxy fatty acid composition of Mycobacteria. Journal of bacteriology.* 176; 2962-2996.
- 4) Alugupalli S., Lanéelle M.A., Larsson L., and Daffé M., 1995. *Chemical characterization of the ester-linked 3-hidroxy fatty acyl-containing lipids in Micobacterium tuberculosis. Journal of bacteriology.* 177; 4566-4570.
- 5) Amstein C.F., and Hartman P.A., 1973. *Diferentiation of some enterococci by gas chromatography. Journal of bacteriology.* 113; 38-41.
- 6) APHA, AWWA, WPCF, 1989. *Métodos normalizados. Primera edición, Díaz Santos S.A., Barcelona España.* 199 pp.
- 7) Asten van A.J.A.M., Zwaagstra K.A., and Baay M.F., 1995. *Identification of the domain which determines the g,m, serotypes of the flagellin of Salmonella enteritidis. Journal of bacteriology.* 177; 1610-1613.
- 8) Austin B., and Priest F., 1992. *Taxonomía bacteriana moderna. Primera edición, Limusa, México D.F.* 163 pp.
- 9) Barnett V. and Lewis T. 1994. *Outliers in statistical data. Third edition, ed. Wiley, Great Britain.* 583 pp.
- 10) Belisle J.T., Brandt M.E., Radolf J.D., and Norgard M.V., 1994. *Fatty acid of Treponema pallidum and Borrelia burgdorferi lipoproteins. Journal of bacteriology.* 176; 2151-2157.
- 11) Bender G.T., 1987. *Métodos instrumentales de análisis en química clínica. Primera edición, ACRIBA S.A., Barcelona España.* 379 pp.
- 12) Berenson M.L., et al. 1983. *Intermediate statistical methods and applications. First edition, Prentice-Hall Inc., United States of America.* 579pp.
- 13) Bergan T., and Sorheim K., 1984. *Gas liquid chromatography for assay of fatty acid composition in gram-negative bacilli as an aid to classification. Methods in microbiology.* 15; 345-362.
- 14) Beyer H., and Walte W., 1987. *Química orgánica. Primera edición, Reverté. Barcelona España.* 1084 pp.
- 15) Bøe B., and Gjerde J. 1980. *Fatty acid patterns in classification of some representative of families Enterobacteriaceae and Vibrionaceae. Journal of general microbiology.* 116;41-49.
- 16) Bowers J.H., Kinkel L.L., and Jones R.K., 1996. *Influence of disease-suppressive strains of Streptomyces on the native Streptomyces community in soil as determined by analysis of cellular fatty acid. Canadian journal of microbiology.* 42; 27-37.

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 17) Boyd E.F., Wang F.S., and Beltran P., 1993. *Salmonella reference collection B(SARB): strain of 37 serovars of subspecies Y. Journal of general of microbiology.* 139; 1125-1132.
- 18) Brock T.D., 1987. *Microbiología. Cuarta edición, Prentice-hall hispanoamericana, México D.F. 885 pp.*
- 19) Burchfield H.P., and Storrs E.E., 1962. *Gas chromatography. Fourth edition, Academic press inc., New York U.S.A. 679 pp.*
- 20) Burnett G.W., Scherp H.W., and Schuster G.S., 1988. *Manual de microbiología y enfermedades infecciosas de la boca. Ciencia y técnica, México D.F. 750 pp.*
- 21) Cabello R., 1993. *Microbiología y parasitología humana. Primera edición, Panamericana, México D.F. 713 pp.*
- 22) Collins C.H., Lyne P.M., and Grange J.M., 1989. *Microbiological methods. Sixth edition, Butterworth Heineman, London England. 397 pp.*
- 23) Chou S., Chedore P., and Haddad A., 1996. *Direct identificaton of Micobactrium species in bactec 7H12B medium by gas chromatography. Journal of clinical microbiology.* 34; 1317-1320.
- 24) De gracia., 1973. *Principios de la cromatografía de gases. Primera edición, Barcelona España 330 pp.*
- 25) Divo A., 1990. *Microbiología médica. Cuarta edición, Interamericana+Mc Graw Hill, México D.F. 437 pp.*
- 26) Drucker D.B., 1987. *Microbiological aplication of high-performance liquid chromatography. First edition, Cambrige University press, Cambrige Great Britain. 347 pp.*
- 27) Edwards P.R., and Ewing W.H., 1992. *Identification of enterobacteriaceae. Third edition, Burgess publishin company, Mineapolis Minessota U.S.A. 357 pp.*
- 28) Eerola E., and Lehtone O.P., 1988. *Optimal data procesing procedure for automatic bacterial identificatin by chromatography of celular fatty acid. Journal of clinical microbiology.* 21; 46-76.
- 29) Farmer III J.J., Davis B.R., 1985. *Biochemical identification of new species and biogroups of enterobacteriaceae from clinical specimens. Journal of clinical microbiology.* 21; 46-76.
- 30) Galbraith L., and Stephen G.W., 1991. *Polar lipids and fatty acids of Pseudomonas caryophylli, Pseudomonas gladioli and Pseudominas pikcetti. Journal of general microbiology.* 197-202.
- 31) Garcia J.A., Paniagua J., and Pelayo R., 1992. *Virulence factors from Salmonella thyphi related to the development of new vaccines. Salud pública.* 34; 262-267.
- 32) Glass R.L., 1971. *Saponification and the preparation of fatty acid methylesteres. Lipids.* 6; 919-925.
- 33) González A.M.E., 1987. *Fundamentos teóricos y principios de la cromatografía en fase de vapor. Primera edición, ENEP-Iztacala, Méx. Méx. 68 pp.*
- 34) Hagen S.R., Thompson J.D., and Myers K.R., 1997. *Analysis of a Monophosphoryl lipid A immunostimulat preparation from Salmonella minnesota R595 by high-performance liquid chromatography.* 767; 53-61.

- 35). Häusler J., 1987. Identification of indicators of fecal pollution by enterobacteriaceae using gas-chromatography. V curso simposio internacional sobre biología de la contaminación, UNAM-SEDUE-UPN, México D.F.
- 36). Häusler J. 1987. Determination of organic acid 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.
- 37). Jantzen E., Knudsen E., and Winsnes R., 1982. Fatty acid analysis for differentiation of *Bordetella* and *Brucella* species. *Acta path. Microbiol. scand. sect.* 82; 753-766.
- 38). Jantzen E., Bryn K. and Bøvre K. 1974. Gas chromatography of bacterial whole cell methanolysates. *Acta path. Microbiol. Scand. Sect.* 82; 753-766.
- 39). Jostanson J.P., and Lanfeld P., 1996. Influence of growth on fatty acid composition of a polyunsaturated fatty acid producing *Vibrio* species. *Archives microbiology.* 165; 306-310.
- 40). Kämpfer P., and Kroppenstedt R.M., 1996. Numerical analysis of fatty acid patterns of coryneform bacteria and related taxa. *Canadian journal of microbiology.* 42; 989-1005.
- 41). Lambert M.A., Patton C.M., and Barrett T.J., 1987. Differentiation of *Campylobacter* and *Campylobacter*-like organism by cellular fatty acid composition. *Journal of clinical microbiology.* 25; 706-713.
- 42). Leninger A.L., 1987. *Bioquímica. Segunda edición, Omega, Barcelona España.* 1117 pp.
- 43). Mandell, Douglas, Bannet, 1991. *Enfermedades infecciosas. Tomo II, tercera edición, Panamericana, Buenos Aires Argentina.* 1753 pp.
- 44). Maya Y.M. and Verde C.J.R., 1999. *Cromatografía de gases: Principios básicos y manejo del equipo. UAM Iztapalapa, D.F. México.* 43 pp.
- 45). Mitruka B.M., 1975. *Gas chromatographic application in microbiology and medicine. John Wiley, New York U.S.A.*
- 46). Mudrov V.M., Shkari A.V., and Iliina E.A., 1997. Feasibility of using gas-liquid chromatography to identify microbes of *Nocardia* genus. *Probl. tuberk.* 4; 53-55.
- 47). Nakagawa Y., Kishida K., and Kodani Y., 1997. Optical configuration analysis of hydroxy fatty acids in bacterial lipids by chiral column high-performance liquid chromatography. *Microbiology immunology.* 41; 27-32.
- 48). Orgambide G.G., Rosetta N., and Reusch N., 1993. Methoxylated fatty acids reported in *Rhizobium* isolates arise from chemical alterations of common fatty acids upon acid-catalysed transesterification procedures. *Journal of bacteriology.* 175; 4922-4926.
- 49). Ryll M., Bissgard M., and Christensen J.P., 1996. Differentiation of *Salmonella gallinarum* and *Salmonella pollorum* by their whole-cell fatty acid methyl ester profiles. *Zentralbl. veterinarmed.* 43; 357-363.
- 50). Robinson J.W., 1978. *Principios de análisis instrumentales. Primera edición, Acriba. Zaragoza España.* 509 pp.

12.

APENDICE

- ***ADN:** ácido desoxiribonucleico.
- ***Adinamia:** Debilidad física.
- ***AN:** Área normalizada.
- ***ARN:** ácido ribonucleico.
- ***Astenia:** Debilidad del sistema muscular.
- ***Bacteriemia:** Presencia de bacterias en la sangre, a causa de la infección general o localizada en el organismo.
- ***Gastroenteritis:** Inflamación instantánea del estómago e intestinos.
- ***Grado de entrecruzamiento:** Mayor cantidad de fases enlazadas o mayas moleculares.
- ***Inatacabilidad:** Que no es afectada tan fácilmente por los ácidos.
- ***Placas de Peyer:** Foliculos cerrados del intestino delgado, aglomerados en placas.
- ***rpm:** revoluciones por minuto
- ***Sangrado:** Vaporización de la fase estacionaria líquida, y el consecuente arrastre de esta por el gas acarreador.
- ***Solución A (metóxido de sodio):** A un matraz aforado de 100 ml se le agregan 37 ml de metanol y 25 ml de metóxido, llevándose al aforo con benceno
- ***Solución b (metanol saturado con gas cloro):** Se mezcla por goteo, 30 ml de ácido sulfúrico y 30 ml de ácido clorhídrico, desprendiéndose en la reacción gas cloro que es burbujeado, hacia 25 ml de metanol, saturando a este con dicho gas.
- ***Termolábil:** Que es destruido por calor.
- ***TRN:** Tiempo de retención normalizado.