



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA

DETERMINACION DE LOS PERFILES DE ACIDOS
GRASOS CELULARES DE *Citrobacter freundii* POR
CROMATOGRAFIA DE GAS-LIQUIDO.

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 :
TEODORA ROSAS CONTRERAS

DIPECTOR DE TESIS: M. en C. PEDRO RAMIREZ GARCIA



LOS REYES IZTACALA

2000



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

DETERMINACIÓN DE LOS PERFILES DE ÁCIDOS GRASOS CELULARES DE
Citrobacter freundii POR
CROMATOGRAFIA DE GAS-LÍQUIDO.

A Dios

por existir en mí

A Mama

Una de las personas más importante de mi vida gracias por todo lo que me ha dado la vida, por dejarme ser y por ayudarme a vivir, por darme su comprensión su ayuda y los elementos necesarios para sobrevivir y aunque ya no está aquí siempre está presente

A mis Hermanos: a quienes quiero mucho

Fernando, Roberto y Alfredo

A mis Sobrinos

Roberto Carlos, Daniel Fernando y Omar Alfredo Gracias por estar conmigo

A Maribel Pulido V. Gracias por todo el apoyo y comprensión que me has dado a lo largo de tantos años de amistad, y también por tu ayuda en el desarrollo de este trabajo

A mis Amigos

Maribel Pulido, Margarita Anda, Catalina Maya, Rocio T. Bonilla, Juana P., Dolores Hurtado, Rocio Ibarra, Alma R. Mario Crisóstomo, Carlos Domínguez, Reynaldo A. Julio C., Pablo R. Gracias por ser mis amigos y por conocerlos

A mis Maestros: Prof. Suárez, Prof. Diódoro, Prof. Roberto Rico, por ayudarme en mi formación profesional y por brindarme su amistad

A todos aquellos que de alguna u otra manera intervinieron en el desarrollo de esta tesis muchas gracias

Agradecimientos:

Director de tesis: M. en C. Pedro Ramírez García Gracias por ayudarme en el desarrollo de esta tesis y por ser tan paciente con migo.

A la Q. F. B. Esperanza Robles Valderrama, por la asesoría y sugerencias en el desarrollo de este trabajo y por la realización del mismo y por su amistad.

Al M. en C. Saúl Flores Maya, por la gran ayuda brindada para el mejoramiento y conclusión de este trabajo.

Al M. en C. Angel Durán, por su valiosa asesoría en el manejo de la estadística en el mismo.

A la, Biol. Guadalupe Sainz, por sus sugerencias y valiosa cooperación para su conclusión.

Al H. Jurado por su participación.

INDICE

1.INTRODUCCION	1
2.ANTECEDENDES	4
2.1.Generalidades	5
2.2.Importancia de la familia enterobacteriaceae	6
2.2.1.Aspectos taxonomicos del grupo	8
2.2.2.Caracteristicas del género	9
2.2.3.Reacciones bioquimicas	9
2.2.4.Importancia médica	10
2.2.5.Tratamiento	11
3.FUNDAMENTOS TEORICOS	12
3.1.Lipidos	13
3.2Esterificacion	14
3.3.Detector de ionizacion de flama	15
4.JUSTIFICACION	17
5.OBJETIVOS	18
5.1.Objetivo general	18
5.2.Objetivos particulares	18
6.MATERIALES Y METODOS	19
6.1.Microorganismo y cultivo	19
6.1.1.Preparacion de la biomasa bacteriana	19
6.1.2.Cosecha bacteriana	19
6.1.3.Centrifugacion y lavado	20
6.1.4.Liofilizacion	20
6.1.5.Esterificacion	20
6.1.6.Evaporacion	21
6.1.7.Analisis cromatografico	21
6.2.Analisis estadístico	22
Esquemas de la tecnica	23
7.RESULTADOS	25
8.DISCUSIÓN	36
9.CONCLUSIONES	39
10.RECOMENDACIONES	40
11.BIBLIOGRAFIA	41
12.GLOSARIO	45
13.ANEXO	54

1. INTRODUCCIÓN

Los microorganismos patógenos que se propagan a través del agua son generalmente la causa de infecciones intestinales, por tal representan un riesgo potencial para la salud, de ahí la importancia de los métodos rápidos y precisos para la identificación de los microorganismos que afectan al hombre y su ambiente (CIECCA, SARH, OPS 1983).

Las bacterias en su totalidad y los integrantes del grupo coliforme se han utilizado durante décadas como indicadores de contaminación de aguas y de otros sistemas (Toranzos 1991). A este respecto desde hace varios años la Ingeniería Sanitaria hace énfasis en este grupo que pertenece a las enterobacterias y que sigue utilizándose como indicador de contaminación fecal (CIECCA, SARH, OPS 1983).

Una de las características por las que se ha utilizado a los coliformes como indicadores de contaminación de aguas, se debe a que su sola presencia se relaciona con contaminación de heces humanas o de animales de sangre caliente.

Los géneros *Enterobacter* spp. *Klebsiella* spp. *Citrobacter* spp. y *Escherichia* spp. suelen representar al grupo coliforme que se aísla de aguas naturales y suministros de aguas naturales tratadas. *Enterobacter* es el que se aísla con mayor frecuencia estos suelen ser patógenos y patógenos oportunistas que producen enfermedades cuando alcanzan un tejido u órgano susceptible (Budney y Clark 1979 citados por Edwards y Ewing 1986).

El desarrollo Tecnológico ha dado como resultado el surgimiento de nuevas metodologías que optimizan tiempos y los análisis que brindan son rápidos y confiables algunas de ellas se han enfocado en química y biología molecular. obteniéndose gran cantidad de información, que constituye una herramienta muy útil, por ejemplo en la identificación bacteriana (Austin y Priest 1992, y Lennette 1982); dentro de estas metodologías, la quimiotaxonomía se ha enfocado al

análisis de la pared celular, particularmente a los lípidos que han mostrado ser de gran utilidad en la quimiosistemática.

Los diferentes métodos que se han venido desarrollando para la identificación bacteriana, tienen como finalidad hacer la evaluación rápida de los microorganismos que están originando una contaminación y que además va a permitir tomar decisiones rápidas dirigidas a su control. Estos métodos van desde las pruebas bioquímicas tradicionales, que siguen las rutas metabólicas de los microorganismos (Mac Faddin, 1984). El sistema API-20E es una prueba miniaturizada que permite la realización simultánea de 23 parámetros (Holmes y Wilcox 1978), el inmunoensayo enzimático (ELISA) que actúa a nivel inmunológico, la homología secuencia del DNA y el RNAR que se puede utilizar para obtener una clasificación estable y completa de las bacterias y la posición taxonómica de los taxa pudiendo cuantificarse para aligerar la colocación de los géneros en categorías taxonómicas superiores e inferiores y la inmunofluorescencia que es una técnica para detectar reacciones inmunológicas es decir químicamente con los anticuerpos, haciendo posible identificar células individuales que reaccionan con el anticuerpo (Pelczar *et al.* 1991), entre otros.

De entre las posibilidades mencionadas para la identificación bacteriológica, existe una que ha tenido gran desarrollo en la actualidad, la cromatografía de gases (CG), la cual consiste en separar en sus componentes mezclas complejas de sustancias que están presentes en una solución, asimismo la migración (de los ácidos grasos) bacterianos está determinada por la cromatografía de gas líquido (CGL), en este procedimiento los ácidos grasos son convertidos en una forma más volátil ésteres metílicos. La CG es un proceso de separación de componentes volátiles de una mezcla, y se basa en la retención selectiva de los mismos por una fase estacionaria absorbida por un soporte inerte, recubriendo las paredes del tubo; la CG dada su precisión y exactitud es un método imprescindible en el análisis de trazas particularmente de plaguicidas, herbicidas y contaminantes orgánicos de aire y agua (Lenhinger 1984 González *et al.* 1994, Shantha y Napolitano 1992).

Los métodos para determinar los quimiotipos de las paredes son sencillos y rápidos y se basan en la extracción y análisis cromatográfico.

Los lípidos proporcionan abundante información taxonómica que se puede utilizar tanto para la clasificación como para la identificación bacteriana.

Los ácidos grasos de cadena larga se liberan de los lípidos polares de la membrana plasmática mediante esterificación y se analizan por medio de cromatografía de gases (Austin y Priest 1992).

En este trabajo se obtuvo el perfil cromatográfico de una cepa tipificada de *Citrobacter freundii* por la técnica descrita por (Hausler y Richter 1983 y Hausler 1987), mediante el cual pueden separarse los ácidos grasos de la especie y subespecie, así como el porcentaje de cada uno de ellos con respecto al que presenta la mayor área y es al que arbitrariamente se le asignó el 100%. El perfil se construyó con x número de repeticiones y contra el cual pueden compararse aislamientos provenientes del ambiente para el proceso de investigación bacteriana.

Citrobacter es un habitante normal del intestino humano y aunque es un parásito oportunista, es decir que solo invade a organismos debilitados llega incluso a causar la muerte. a *C. freundii* se le ha asociado con diarreas, y se le ha aislado de comida, vegetales y carne fresca (Bergey 1984).

La necesidad de obtener resultados rápidos y precisos ante una enfermedad entérica determinada, es necesaria información disponible que en este caso es la cromatografía que aplicada a la bacteriología permite la creación de bancos de datos que nos auxilien en la identificación del organismo patógeno y poder realizar así un diagnóstico oportuno.

ANTECEDENTES

2.1 Generalidades

Uno de los primeros trabajos en los que se empleó la cromatografía de gases en la microbiología, lo reportan James y Martin en 1956, quienes trabajaron en la separación e identificación de ésteres metílicos de ácidos grasos saturados e insaturados por cromatografía de gas-líquido (CGL), para ácidos grasos bacterianos. Durante el mismo año trabajaron con un aparato de alta sensibilidad que respondía de manera independiente a la estructura química de las sustancias a separar llegando a la conclusión de que este es un buen método de separación de carbonos de acuerdo a su orden de elución.

Abel y colaboradores en 1963, sugirieron la clasificación de especies de la familia Enterobacteriaceae mediante el análisis de ácidos grasos por cromatografía de gas-líquido obteniendo un análisis cualitativo de sus muestras llegando a la conclusión que este es un método para la identificación de enterobacterias, siendo los primeros investigadores en sugerir la implementación de la técnica para el uso bacteriológico, también Bøe y Gjerde, (1980) realizaron un estudio en 23 muestras representativas de la familia Enterobacteriaceae y Vibrionaceae con base a la composición de ácidos grasos de la pared celular, utilizando una columna capilar y teniendo como resultado buenas separaciones de especies, subespecies géneros y familias identificando a: *Salmonella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Vibrio* y *Aeromonas*.

Machtiger y O'leary, (1973) distinguieron los géneros *Arizona*, *Citrobacter* y *Providencia* de acuerdo al contenido de los ácidos grasos celulares, en el caso particular de *C. Freundii* en este estudio se trabajaron 3 cepas de diferentes orígenes que se mencionan a continuación: American Type Culture Collection (ATTC) 8090, espécimen clínico 10053 y 17, en concluyendo que los principales ácidos fueron 16:0, 16:1 y 19cys, así mismo, se diferencian mínimas en las especies pertenecientes a los géneros *Escherichia*, *Salmonella* y *Shigella*, concluyendo así que estos organismos están muy relacionados, (Bousfield *et al.*. 1983 y O'leary 1962).

Jantzen, Bryn y Bouren en 1974 investigaron que la composición de ácidos grasos bacterianos puede decrecer dependiendo de la temperatura y del tiempo que se mantenga el sembrado.

Durante los últimos 20 años algunos autores trataron con menor o mayor éxito de identificar enterobacterias usando cromatografía de gases, en 1986 la mayoría de los investigadores abordan el problema de la determinación de ácidos orgánicos incorporados en las células considerando la posibilidad de determinar la marca diferencial de las bacterias, con respecto a estos ácidos grasos como criterio principal de identificación bacteriana. La técnica implementada por Häusler en 1983 se ha continuado en el Proyecto y Mejoramiento del medio Ambiente (Cyma) utilizada como técnica de identificación bacteriana por medio de ácidos grasos celulares y la obtención de ésteres métilicos dándonos como resultado perfiles de grasos celulares Häusler y Richter 1983 y Häusler 1987).

Bergan y Sorheim en 1984 hicieron un análisis en diferentes de enterobacterias encontrando que las bacterias Gram-negativas son organismos que constituyen un mejor diagnóstico para la bacteriología médica, hallando de gran utilidad los ácidos grasos para la identificación de las mismas puesto que los perfiles que obtuvieron, les ayudaron a determinar grupos numéricos, llegando a la conclusión de que este método puede se empleado para distinguir fermentos y géneros oxidativos.

Eerola y Lehtonen, en 1988 utilizan la CGL de ácidos grasos celulares para identificar cepas bacterianas en el ámbito clínico, estas especies fueron por mencionar algunas *Stafilococcus aureus*, *S. epidermis*, *Clostridium perfringes*, *C. difficili*, *Yersinnia enterocolitica* serotipo O3 y *Pseudomonas* spp. los resultados indicaron que la aplicación de ésta técnica para la identificación de ácidos grasos de la pared celular es de gran utilidad y puede usarse efectivamente en la identificación de microorganismos de importancia clínica.

Lynn, y colaboradores, en 1989 realizaron un estudio para liberar los ácidos grasos de la pared celular mediante una base de hidrólisis metilada y analizada por capilaridad en cromatografía de

gas líquido, obteniendo un perfil diferente para cada una de las bacterias Gram-negativas *Flavobacterium* sp encontradas en este grupo.

En el proyecto Cyma se han dado innumerables investigaciones siendo el objetivo principal el de obtener e implementar un banco de datos e incrementarlo hasta la fecha, se han realizado investigaciones tales como por mencionar solo algunas de ellas. En 1992 Yáñez Noguez realizó su tesis en análisis de ésteres metílicos de *Enterobacter agglomerans* concluyendo que el análisis de ésteres metílicos de cada organismo tiene una “huella” química que le permite diferenciarse de los otros microorganismos bacterianos, en el mismo año Campoy Otero en su tesis sobre CGL en *Klebsiella rhinoscleromatis* concluye que es un método versátil y establece las ventajas de ser rápido y preciso, permitiendo un análisis cuantitativo y cualitativo simultáneo.

En 1992 Spierings, Van Silfhout *et al.* realizaron en *Klebsiella pneumoniae* un estudio de hibridación de DNA y análisis de ácidos grasos utilizando la misma técnica estandarizada que existe en este proyecto complementándolo con la adhesión del sistema de identificación microbiana (MIDI) utilizando software. Böttger en 1996 menciona que para que la CGL sea más automatizada sería apropiado añadir un sistema viable de software llamado sistema de identificación microbiológica (MIS), provisto con medios rutinarios para identificación bacteriana de especies de laboratorios clínicos.

En 1998 en el proyecto Cyma Hurtado Bocanegra realizó un estudio de determinación de perfiles de ácidos grasos en 4 especies de *Shigella* spp utilizando por primera vez cepas ambientales, comparando perfiles tipificados y perfiles ambientales

2.2. Importancia de la familia enterobacteriaceae

Las enterobacterias están ampliamente distribuidas en sólidos, agua, frutas, vegetales, granos, plantas con flores y árboles; en la escala zoológica desde los insectos hasta el hombre. Pueden ser de importancia médica y económica y de una rápida generación, tienen habilidad de crecimiento en

medio líquido, sólido y de una fácil manipulación genética, por este hecho son objeto de intensos estudios en laboratorio.

El término Enterobacteriaceae esta incluido junto con sus tipos y géneros en la regla 21 del Código Internacional de Nomenclatura, el cual incluye para las bacterias de esta familia la adición de "aceae" incluidas en el tronco de tipo y género, siendo aceptado y usado a partir de 1958.

Su definición es consecuencia de una larga investigación bioquímica y genética del grupo la heterogeneidad en ecología, su rango de hospedero y como patógeno potencial para hombres, animales, insectos y plantas.

La familia enterobacteriaceae está formada en su mayor parte por bacilos cortos, Gram-negativos, no esporulados, pueden o no tener flagelos, son aerobios y anaerobios facultativos capaces de fermentar la lactosa con producción de ácido y gas, reducen nitratos a nitritos en 24 a 48 h a 35 °C. A este grupo pertenece *Citrobacter* sp.

Las enterobacterias y especialmente las enteropatógenas, ocupan un sitio muy importante dentro del campo de la microbiología, la epidemiología, la infectología y en la práctica diaria de la medicina clínica.

Estas bacterias son capaces de ocasionar una serie de procesos patológicos, tanto en el aparato digestivo como fuera de él. Sin embargo, es conveniente recordar que la mayor parte de la flora normal del intestino del hombre está formada por bacterias, que en una forma u otra, van a resultar benéficas para el huésped que habitan y que sólo cuando, por causas especiales dejan su hábitat natural, pueden resultar patógenas.

Las infecciones intestinales y las derivadas de bacterias de residencia entérica, tienen mayor importancia en áreas de población en donde se reúnen una o varias de las siguientes condiciones:

- 1) Carencia de suministro de agua..
- 2) Falta de drenaje para la disposición de excretas

- 3) Falta de educación higiénica en la población.
- 4) Mala alimentación.
- 5) Asistencia médica insuficiente, sobre todo a un nivel pediátrico y de pacientes inmunocomprometidos.
- 6) Ignorancia o imposibilidad para mantener una higiene personal que evite la transmisión de agentes enteropatógenos por contacto personal.

Las aguas residuales pueden contener millones de bacterias por mililitro, entre las que se incluyen las coliformes, estreptococos, *Proteus* y otras más que provienen del tracto intestinal de animales de sangre caliente, considerándose como indicadores de contaminación de origen humana o animal y se relacionan con la presencia de patógenos. *Citrobacter* spp. se encuentran en las heces humanas y de otros animales, probablemente como habitante normal del intestino. Los aislamientos de especímenes clínicos se han identificado como patógenos oportunistas, aislándose también de aguas contaminadas y de alimentos. Con frecuencia las bacterias son introducidas por instrumental urológico contaminado, la mayoría de los gérmenes que causan infecciones del tracto urinario son bacilos Gram-negativos (Bergey 1984, Gamarra, 1990).

C. freundii, al igual que otras enterobacterias oportunistas pueden estar relacionadas con infecciones nosocomiales y pueden aislarse en líquidos de uso en hospitales y en heridas con infecciones secundarias.

El daño en la lana de las ovejas se debe a *Salmonella*, *Klebsiella* y *C. freundii* que causan mastitis bovina. La *salmonella* es un habitante común en el intestino de cerdos, vacas, caballos, perros y gatos, estos animales que normalmente defecan a cielo abierto y en cualquier sustrato por lo que sus heces son arrastradas al agua lo que puede resultar en una contaminación severa (Bergey 1984).

2.2.1. Aspectos taxonómicos del grupo

Desde su determinación taxonómica el grupo *Citrobacter* (Tribu Salmonellae) ha tenido algunos problemas en cuanto a su identificación por lo que primero fue agrupado en una serie de

enterobacterias que anteriormente se habían denominado *Escherichia freundii*, junto con el grupo Bethesda-Ballerop se mencionaban como microorganismos “paracilios”, puesto que presentaban características muy similares, Werkman y Guillen (1932) citados por Edwards y Ewing 1986 proponen el nombre genérico de *Citrobacter* “citrato positivo”, coliaerogenes intermediarios y a partir de estas investigaciones que ya implicaron más pruebas se describen seis especies más.

El género *Citrobacter* está compuesto por tres especies: *C. freundii*, *C. diversus* y *C. amalonaticus*. Estas especies tienen 3 diferentes tipos de DNA en cada uno de sus grupos (Crosa Steigerwalt *et al.* 1974) y cada una puede diferenciarse por la expresión de sus reacciones bioquímicas y de su perfil ácidos grasos de la membrana (Edwards y Ewing 1986).

2.2.2 Características del género

Citrobacter tiene un tamaño de 1.0 μ de diámetro por 2.0-6.0 μ de largo no capsuladas con flagelo peritrico, bacilos Gram-negativos anaerobios facultativos no esporógenos, crecen con facilidad en medios sintéticos simples y pueden ser aerobios o anaerobios. Utilizan la glucosa de manera fermentativa con la formación de ácido y gas, el nitrato es reducido a nitrito. En cuanto a su morfología las colonias se presentan lisas, húmedas, translúcidas y opacas o con brillo grisáceo. Se encuentran en las heces humanas y de otros animales, probablemente como habitantes normales del intestino. En muestras clínicas se han aislado como patógenos oportunistas de pacientes inmunocomprometidos, así como en aguas contaminadas y alimentos (Bergey 1984, Divo 1990).

Se diferencian de *Salmonellas* por la presencia de β -galactosidasa y la falta de lisina descarboxilasa, son positivas al citrato (Davis *et al.* 1990).

2.2.3. Reacciones bioquímicas.

Los miembros de *Citrobacter* fermentan la lactosa muy lentamente producen β -galactosidasa, L-arabinosa, celobiosa, maltosa, L-ramnosa, thehalosa, D-xilosa, D-manitol, D-sorbitol y glicerol, no

descarboxila la lisina, desamina la fenilalanina y no tiene producción de desoxirribonucleasa (Bergey 1984).

La mayoría de los aislamientos de *C. freundii* producen abundante H₂S en Kligler y TSI (agar hierro triple azúcar), la lactosa es fermentada lentamente, Indol negativa, Malonato negativa, Ornitina negativa. Los antígenos H son monofásicos, algunos aislamientos de los grupos O5 y 29 de *C. freundii* pueden poseer un antígeno serológico idéntico al antígeno de virulencia de *Salmonella typhi*.

En contraste a *S. typhi* las variaciones cuantitativas de la virulencia en *C. freundii* en su cultivo son reversibles y la presencia del antígeno de virulencia no está relacionada con la virulencia del cultivo (Edwards y Ewing 1986; Bergey 1984).

2.2.4. Importancia médica.

Los miembros del género *Citrobacter*, no sólo se encuentran en las heces del hombre en su intestino también en otros mamíferos, aves, reptiles, anfibios y peces particularmente en carpas; agua, aguas de desecho, suelo y alimentos, en los cuales se comporta como comensal. Estas bacterias rara vez son los agentes etiológicos primarios de infecciones humanas, pero pueden ser patógenos de pacientes ancianos o inmunocomprometidos (Davis *et al.* 1990, Karunasagar y Pair, 1992).

Las cepas de *Citrobacter* no aparecen con mucha frecuencia en las heces, en cambio son predominante en individuos que presentan infecciones o algún tipo de catéter. También se les ha asociado con infecciones pulmonares, heridas, ostiomielitis, peritonitis y endocarditis. En ocasiones *Citrobacter* produce meningitis neonatal (representando una pequeña porción de las meningitis Gram-negativas) con porcentajes de mortalidad elevados y secuelas neurológicas importantes en los sobrevivientes (Freeman 1989). Por ser un patógeno oportunista carece de sistemas de penetración, sin embargo cuando se produce una vía de penetración accidental (heridas, úlceras, instrumental contaminado) o una falla en la fagocitosis o de algún otro mecanismo de defensa, se pueden

establecer como patógenos oportunistas dando lugar a las infecciones somáticas con curso y pronóstico variable dependiendo de las áreas que haya infectado (Perea 1992).

Algunas veces *C. freundii* ha sido considerada como enteropatógeno y aún cuando es un habitante normal del intestino, algunos investigadores han sugerido que es causante de diarrea en pacientes inmunocomprometidos. Las características coloniales de la bacteria reflejan que no sólo se encuentran en evacuaciones de orina y esputo, sino también en alguna especie de bacterimia, otitis media, heridas, abscesos en la garganta y en cadáveres (Davis *et al* 1990).

2.2.5. Tratamiento

Clínicamente se sugiere tratar las infecciones ocasionadas por *C. freundii* con cierta variedad de fármacos, de acuerdo a los análisis que se han efectuado en pruebas de laboratorio, de donde se sugieren que son sensibles al cloramfenicol, gentamicina, kanamicina y colistina, pero las cepas varían en sensibilidad a la ampicilina y cefalotina (Davis *et al.* 1990). Aunque últimamente se ha encontrado que las bacterias están creando resistencia a antibióticos en particular cloranfenicol, debido a la frecuencia de la administración de los mismos. (Davies 1994).

3 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

El nacimiento de la cromatografía de absorción se remonta a 1906 cuando el botánico ruso Mikhail Tswett estableció los primeros fundamentos separando los componentes de estratos vegetales (Knox, 1965).

El principio del método cromatográfico consiste en la posibilidad de resolver en sus componentes mezclas complejas de sustancias presentes en una solución, utilizando su migración diferencial cuando se mueven en un medio poroso absorbente. En la cromatografía de gases la fase móvil esta integrada por una mezcla a resolver y un gas inerte, que sirve para eluir la muestra.

En cuanto a la cromatografía de gases, esta técnica se diferencia netamente de otras porque la fase móvil no está constituida por un líquido, sino por un gas. En la cromatografía gas-líquido, un líquido no volátil (de alto punto de ebullición) se distribuye sobre una columna de soporte poroso inerte; las mezclas de sustancias a separar gaseosas, o llevadas al estado gaseoso son transportadas por un gas permanente (gas vector) y las sustancias se separan según su volatilidad.

Con mayor precisión se puede decir que las diversas sustancias son en mayor o menor grado retenidas por la columna según el valor de sus presiones parciales de vapor, esto en las condiciones experimentales elegidas. El gas vector transporta las sustancias fuera de la columna, que debe ser lo suficientemente larga (de 20 a 40 metros), para que esto suceda y contar con una fase líquida y temperatura adecuadas; las sustancias salen muy diferenciadas con la corriente del gas y llegan al revelador, provisto de registrador automático. Cada soluto se moverá a su propia velocidad a través de la columna y, por consiguiente, se formará una banda por cada uno. Si se usa un registrador, las señales aparecen en la gráfica en forma de una curva de la composición decreciente del gas portador en función del tiempo. El tiempo de emergencia de un pico identifica al componente, el área de dicho pico indica la concentración del componente en la mezcla.

La cromatografía de gas-líquido es prácticamente aplicable a todas las sustancias volátiles hasta aproximadamente 350 °C. Utilizada inicialmente para la separación de los ácidos grasos, actualmente constituye el método de elección para el análisis de estas sustancias; los laboratorios de control de adulteraciones en el terreno de las grasas y de los aceites comestibles poseen un método analítico capaz de detectar cualquier alteración. Una de las razones principales por las que se usa la CG en los análisis es por su alta sensibilidad y es por ello que es un método preferido en un análisis de trazas particularmente de plaguicidas, herbicidas y contaminantes orgánicos del aire y agua, investigaciones en el terreno de los esteroides, así como también en estudios de quimiotaxonomía etc. Los servicios de este tipo de cromatografía, en constante y rapidísimo desarrollo ofrece excelentes resultados para este tipo de estudios. (González 1994, Murray *et al.* 1995).

3.1 Lípidos

La composición de los lípidos en la membrana de los microorganismos proporciona abundante información taxonómica que se puede utilizar tanto para la clasificación como para la identificación, el estudio de los lípidos en la membrana de *E. coli* ha contribuido a un gran entendimiento de la síntesis y función de los lípidos en la membrana, en general éste conocimiento consiste en una mejor identificación de ácidos grasos (Magnuson *et al.* 1983).

La membrana en las bacterias, en gran medida se compone de lípidos polares anfipáticos, que están formados de una cabeza hidrófila unida a dos cadenas de ácidos grasos hidrófobos. A los lípidos polares con frecuencia se les denominan lípidos libres, debido a que es posible extraerlos fácilmente sumergiendo las células en disolventes orgánicos adecuados. Los ácidos grasos de cadena larga se liberan de los lípidos polares de la membrana plasmática mediante esterificación y se analizan por medio de cromatografía de gases. Entre las variaciones en la composición de ácidos grasos se tiene la longitud de la cadena que varía de 8 a 26 carbonos.

Cuando se cultivan bacterias en condiciones estandarizadas y se degradan por medio de calor, en una atmósfera inerte y los productos resultantes llamados (ácidos grasos) forman una "huella digital" de la célula. Estos perfiles químicos son muy complejos pero pueden analizarse por CG o

espectrometría de masas (EM) (Alcarno 1991; Austin y Priest 1992; Magnuson *et al.* 1993). Los ácidos grasos constituyen una de las partes esenciales de los componentes celulares. La mayor proporción de ácidos grasos se localiza en la membrana y las bacterias Gram-negativas generalmente contienen una proporción mayor de ácidos grasos que las Gram-positivas (Jawetz *et al.* 1996).

3.2 Esterificación

Un éster es un compuesto que deriva de la sustitución de hidrógeno perteneciente a la función alcohólica de un alcohol primario o secundario con un grupo acílico según la reacción clásica.

La esterificación es una operación o reacción química reversible que permite obtener ésteres mediante: a) la reacción entre un ácido y un alcohol, b) la acción de un anhídrido de ácido sobre un alcohol, c) al actuar un cloruro de ácido y un hidrocarburo no saturado; e) reaccionando un éster y un alcohol; f) al reaccionar entre sí dos ésteres diferentes.

El medio más sencillo para preparar los ésteres consiste en hacer reaccionar el ácido y el alcohol respectivos, como expresa la siguiente reacción:



Esto es un caso de equilibrio químico, pues el agua producida en la reacción actúa sobre el éster formado y tiende a regenerar el ácido y el alcohol. Para lograr que todo el alcohol se transforme en un éster (esterificación) es preciso que uno de los cuerpos reaccionantes, el ácido o el alcohol porque esto es indistinto, se encuentre en exceso, verificándose la reacción más rápidamente cuanto más elevada sea la temperatura, dentro de determinados límites; sin embargo ésta no influye en el rendimiento de la operación; para aumentar este último, conviene operar en presencia de un deshidratante (ácido sulfúrico concentrado, cloruro de zinc anhidro etc.), que retenga o fije el agua que se forma (Postigo 1980).

3.3 Detector de ionización de flama

Básicamente, el detector de ionización de flama (DIF) es un dispositivo de conteo de carbono que produce una corriente proporcional al número de iones o electrones formados en los gases de la flama entre el surtidor del quemador y el colector. Responde a todos los compuestos orgánicos excepto al ácido fórmico. Su respuesta es mucho mayor con los hidrocarburos y disminuye con la sustitución en aumento de otros elementos.

El proceso físico fundamental que delinea la operación de todos los detectores de ionización, es la conducción de la electricidad por medio de gases. A temperaturas y presiones normales, un gas se comporta como un aislante perfecto; sin embargo, si están presentes átomos cargados eléctricamente, moléculas o electrones libres, su movimiento libre en dirección a un campo eléctrico, hace conductor al gas, se pueden observar la conductividad incrementada debido a la presencia de muy pocas moléculas cargadas, lo que explica la gran sensibilidad de los métodos de ionización para el análisis de gases. Este consiste de una pequeña flama de hidrógeno quemándose en un exceso de aire y rodeada por un campo electrostático, donde el efluente de la columna entra en la base del quemador a través de un filtro Millipore y se mezclan con el hidrógeno. Los compuestos orgánicos que salen de la columna se queman.

Durante la combustión se forman fragmentos iónicos y electrones libres éstos se colectan produciendo una corriente eléctrica proporcional a la velocidad de entrada de la muestra en la flama. El detector de ionización de flama sólo responde a átomos de carbono oxidables y la respuesta es proporcional al número de átomos de carbono en el componente de la muestra.

El hidrógeno se mezcla con la corriente del gas en el fondo del surtidor. La flama originada por el hidrógeno arde en la punta, en un capilar de 20 hilos, el cual funciona también como cátodo y está aislado del cuerpo por medio de un sello de cerámica. El electrodo colector que se localiza aproximadamente a 6 mm arriba de la punta del quemador, consiste en un círculo de platino. En serie con los gases de la flama, se encuentra una selección de resistores cuyos rangos van de 10^7 a 10^{10} ohms. Se emplea con frecuencia un electrómetro como un convertidor de impedancia para

proveer de sensibilidades hasta de 5×10^{43} amp (Fig. 1 ver anexo) (Willard *et al.* 1975 y 1991 y Gracia y Asencio de 1975).

4. JUSTIFICACIÓN

Los estudios microbiológicos de identificación bacteriana en sus extensas investigaciones por optimizar tiempos en la identificación y clasificación bacteriológica se han dado a la tarea de investigar diferentes técnicas de determinación bacteriológica con la finalidad de que estos métodos rápidos y eficientes sean utilizados en caso de brotes de enfermedades entéricas y de grandes epidemias dando como resultado que surjan otras técnicas, como lo es la cromatografía de gas líquido, este método analiza ácidos grasos celulares bacterianos, es un método eficaz de identificación y clasificación taxonómica del microorganismo demostrando un ahorro importante en tiempo así como alta sensibilidad para la detección.

Los resultados de este estudio formaran parte del banco de datos para enterobacterias que se está implementando dentro del Proyecto de Conservación y Mejoramiento del Ambiente (Cyma) así como también crearán un precedente de perfil cromatográfico de la bacteria en estudio para que en caso de algún brote se consulte este banco y sea más rápida la identificación

5. OBJETIVOS.

5.1 Objetivo general:

- Uso de la técnica cromatográfica gas-líquido para la determinación de los ácidos grasos celulares de *Citrobacter freundii*.

5.2 Objetivos Particulares:

- Obtención del perfil cromatográfico de *C. freundii* de una cepa tipificada con base en la identificación de sus ácidos grasos celulares.
- Utilización de las pruebas miniaturizadas del API 20E y pruebas bioquímicas para verificar la especie en estudio.
- Contribuir al incrementar del acervo del banco de datos para enterobacterias obteniendo el perfil de ácidos grasos celulares para el Proyecto de Conservación y Mejoramiento del Ambiente (Cyma).

6. MATERIALES Y METODOS.

6.1 Microorganismo y cultivo

La cepa bacteriana utilizada en este trabajo fue *Citrobacter freundii* National Collection of Type Cultures (NCTC-9750) cultivada y conservada en agar nutritivo DIFCO, esta cepa fue adquirida en el cepario de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN, laboratorio de bacteriología y depositada en el cepario del laboratorio de bacteriología del proyecto Cyma.

6.1.1 Preparación de la biomasa bacteriana

Para verificar que no hubo contaminación, a la cepa tipificada se le aplicaron dos pruebas de identificación, el sistema miniaturizado API 20E (Analytical Profile, 1984) y la prueba tradicional con bioquímicas; una vez obtenidos los resultados, se procedió a procesar la cepa para la preparación de la biomasa. De la cepa tipificada, se realizó un pase en agar inclinado y se incubó a 37 °C durante 24 horas; este cultivo posteriormente se sembró en placa para el aislamiento de las colonias, incubándose en las mismas condiciones que en tubo. De las colonias aisladas se realizó un sembrado profuso en dos cajas de petri de 10 cm de diámetro con 25 ml de medio de cultivo, para obtener un crecimiento en tapete.

6.1.2 Cosecha bacteriana

Para la cosecha de bacterias se utilizó una solución de formaldehído al 5%, varillas de vidrio en forma de "L", embudos de vidrio, tubos de centrifuga, pipetas de 5 ml (todo el material previamente esterilizado en autoclave a 15 lbs durante 15min). Después de la incubación de 24 horas a 37 °C, se obtuvo un crecimiento abundante, a éste se le adicionaron 5 ml del formaldehído a cada una de las cajas y con ayuda de las varillas de vidrio se lavó suavemente la superficie del agar, este proceso se realizó con el fin de fijar a las bacterias y cosecharlas.

El contenido de dos cajas petri (10 ml) se vertió con ayuda de embudos de vidrio a los tubos de centrífuga previamente lavados con acetona para su posterior centrifugación.

6.1.3 Centrifugación y lavado.

Una vez preparados los tubos con la cosecha bacteriana se centrifugaron a 15, 000 r.p.m. durante 10 min. a una temperatura de 4 °C.

El sobrenadante del primer centrifugado se desechó, agregando 5 ml de solución fisiológica de cloruro de sodio al 0.85% para un primer lavado, este proceso se repitió dos veces más bajo las mismas condiciones.

Al término de la centrifugación, el paquete celular obtenido fue transferido a frascos viales previamente enjuagados con hexano y secados a temperatura ambiente. La transferencia del paquete celular se realizó con ayuda de una cucharilla metálica, repartiéndose perfectamente la biomasa en las paredes de los frascos con la finalidad de obtener un secado más rápido y eficiente durante la liofilización.

6.1.4 Liofilización

La técnica de liofilización se realizó de la siguiente manera: el paquete celular obtenido se liofilizó a -50 °C, éste proceso se llevó a cabo en un lapso de 3 horas con un vacío total (en una liofilizadora Labconco modelo LPyH LOCK 45).

6.1.5 Esterificación

El proceso de esterificación se realizó de acuerdo a Glass (1971), este proceso consistió en agregar a las muestras 20 mg de muestra liofilizada 1 ml de solución de metóxido de sodio (solución A) agitando durante 5 min. Posteriormente se adicionaron 0.6 a 0.7 ml de solución de metanol

saturado con cloro-gas (solución B) hasta que las muestras alcancen un pH de 1 a 2 y en agitación constante durante 30 minutos.

Al término de este tiempo se agregaron 2 ml de solución fisiológica de cloruro de sodio al 0.85% (solución C) a cada muestra, agitándose durante 5 min.

La extracción de los ésteres metílicos se realizó adicionando 1 ml de hexano, por cada una de las muestras manteniéndolas en agitación durante 5 min. La capa de hexano, con los ésteres metílicos se extrajo con una pipeta Pasteur (capa superior transparente) y se transfirió a tubos de ensaye con sulfato de sodio anhidro, esto último con el fin de extraer el exceso de agua que aún pudiera estar presente. La extracción con hexano de los ésteres metílicos se repitió 3 veces más para cada una de las muestras.

6.1.6 Evaporación

Para evaporar el hexano de las muestras se empleó un flujo de gas nitrógeno hasta obtener un volumen final de 10 μ l, con una microjeringa se tomó un microlitro y se inyectó en el cromatógrafo de gases.

6.1.7 Análisis cromatográfico

Se inyectó 1 μ l de la muestra de los metil-ésteres obtenidos de la extracción, en un cromatógrafo HP-5890A (Hewlett Packard) equipado con un detector de ionización de flama y una columna capilar (FS-150 DODIED FSOT) de polidimetilsiloxano de 30 m X 0.25 mm de diámetro interior.

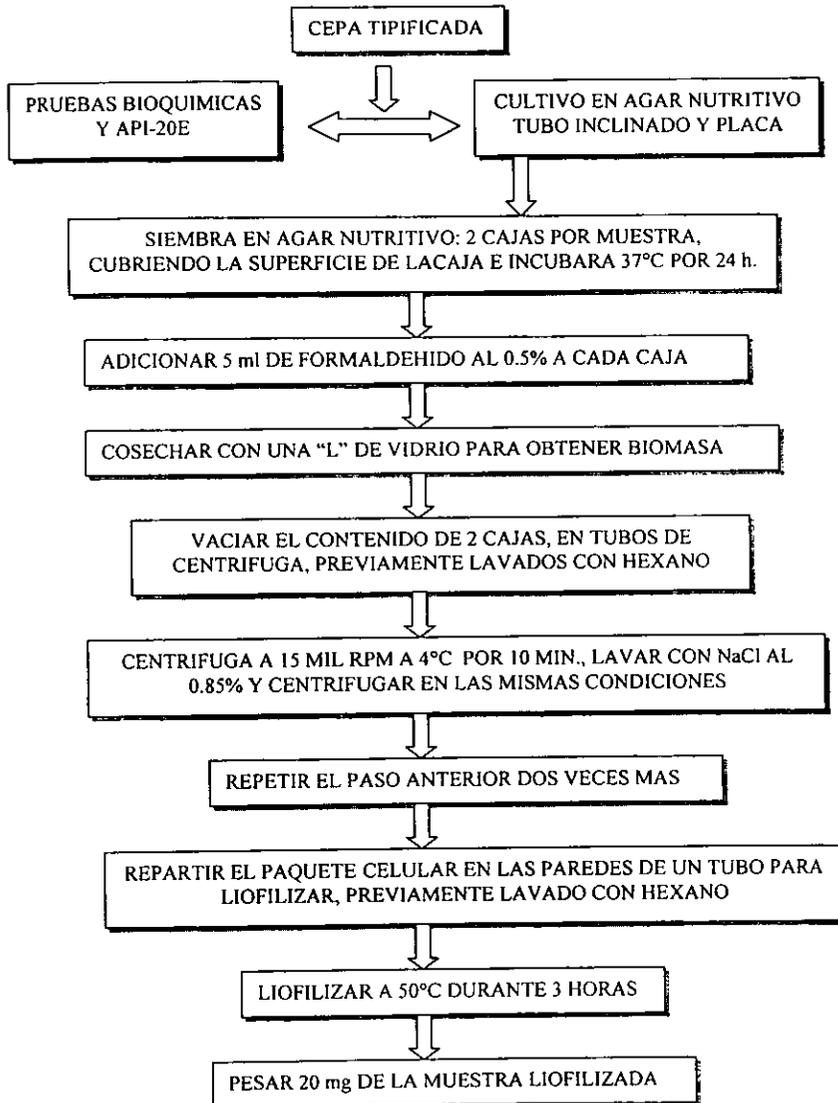
La temperatura inicial de la columna fue de 120 a 250 °C incrementándose 4 °C por minuto. La temperatura de inyector y detector se mantuvo a 270 °C utilizando nitrógeno como gas acarreador con un flujo de 30 ml por minuto.

Los metil ésteres de los ácidos grasos se identificaron por la comparación de sus tiempos de retención con un estándar comercial para enterobacterias, (véase anexo Bacterial Acid Methyl Esters CP mix catálogo No 4-7080). Estos tiempos de retención y áreas se registraron en un integrador (HP Hewlett Packard).

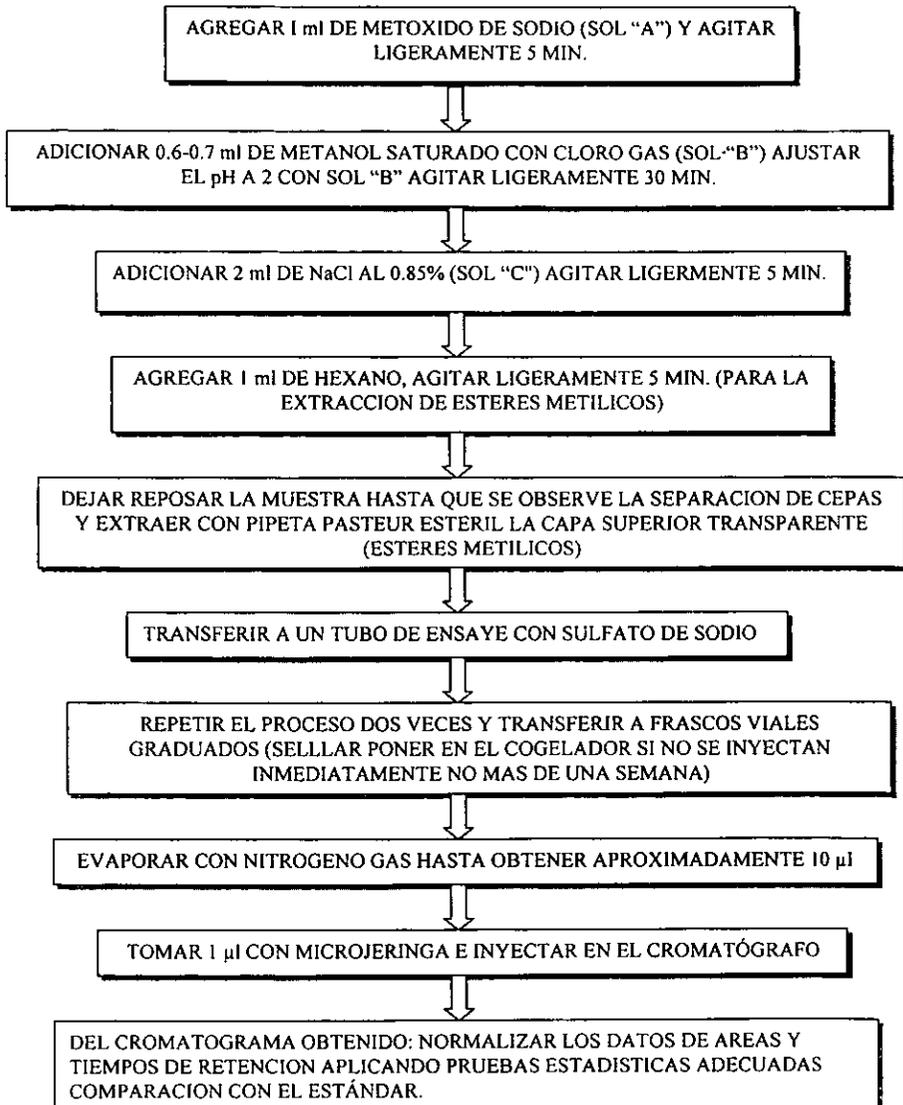
6.2 Análisis estadístico

1. Los resultados se normalizaron para obtener los porcentajes % de área de cada ácido graso, al compararse contra el pico de mayor tamaño.
2. En cuanto a las medidas estadísticas también se tomaron los parámetros siguientes: media, desviación estándar, coeficiente de variación, intervalos de confianza al 95%, máximo y mínimo (Daniel 1977).
3. Se utilizaron 35 cromatogramas de las 50 inyecciones debido a que estos demostraron uniformidad en sus datos obtenidos.

ESQUEMA DE LA TECNICA CROMATOGRAFICA PARA LA DETERMINACION DE ACIDOS GRASOS CELULARES DE BACTERIAS



Continua



7. RESULTADOS

Se realizaron 35 pruebas bioquímicas tradicionales de las cuales se ejemplifican las más típicas para *C. freundii*, todas aisladas con Sulfito de Bismuto, utilizándose como marco de referencia para la comprobación de que la cepa utilizada siga siendo la misma, también para el Api 20E.

Tabla 1: Resultado de pruebas bioquímicas tradicionales para la identificación de la cepa *Citrobacter freundii*.

<i>LIA</i>	<i>TSI</i>	Medios de <i>MIO</i>	Cultivo <i>KLIGLER</i>	<i>CITRATO</i>
K/K	K/A	M=(+) I=(+) O=(+)	Negativo	Negativo
K/A	K/A	M=(±) I=(+) O=(+)	Positivo	Positivo

Tabla 2: Resultado de pruebas bioquímicas tradicionales para la identificación de la cepa *Citrobacter freundii* Sulfito Bismuto (SB).

<i>LIA</i>	<i>TSI</i>	Medios de <i>MIO</i>	Cultivo <i>KLIGLER</i>	<i>CITRATO</i>
K/A	K/A	M=(+) I=(±) O=(±)	K/A	Negativo
K/A	K/A	M=(+) I=(±) O=(±)	K/A	Negativo

Tabla 3: Resultado de pruebas bioquímicas tradicionales para la identificación de la cepa *Citrobacter freundii* Sulfito Bismuto (SB).

<i>LIA</i>	<i>TSI</i>	Medios de <i>MIO</i>	Cultivo <i>KLIGLER</i>	<i>CITRATO</i>
K/A	K/A	M=(+) I=(+) O=(±)	K/A	Positivo
K/A	K/A	M=(+) I=(+) O=(±)	K/A	Negativo

Tabla 4: Resultado de pruebas bioquímicas tradicionales para la identificación de la cepa *Citrobacter freundii* Sulfito Bismuto (SB).

<i>LIA</i>	<i>TSI</i>	<i>Medios de</i>	<i>Cultivo</i>	<i>CITRATO</i>
		<i>MIO</i>	<i>KLIGLER</i>	
K/K	K/A	M=(+) I=(+) O=(+)	K/A	Positivo
K/A	K/A	M=(+) I=(±) O=(±)	K/A	Negativo

Tabla 5: Resultado de pruebas bioquímicas tradicionales para la identificación de la cepa *Citrobacter freundii*

<i>LIA</i>	<i>TSI</i>	<i>Medios de</i>	<i>Cultivo</i>	<i>CITRATO</i>
		<i>MIO</i>	<i>KLIGLER</i>	
K/A	K/A	M=(+) I=(+) O=(±)	Negativo	Positivo
K/A	K/A	M=(+) I=(+) O=(±)	Negativo	Negativo

Tabla 6: Resultado de pruebas bioquímicas tradicionales para la identificación de la cepa *Citrobacter freundii*

<i>LIA</i>	<i>TSI</i>	<i>Medios de</i>	<i>Cultivo</i>	<i>CITRATO</i>
		<i>MIO</i>	<i>KLIGLER</i>	
K/A	A/A	M=(+) I=(+) O=(±)	Negativo	Positivo
K/A	K/A	M=(+) I=(+) O=(±)	Negativo	Positivo

Tabla 7: Resultado de pruebas bioquímicas tradicionales para la identificación de la cepa *Citrobacter freundii*

<i>LIA</i>	<i>TSI</i>	<i>Medios de MIO</i>	<i>Cultivo KLIGLER</i>	<i>CITRATO</i>
K/A	K/A	M=(+) I=(+) O=(±)	Negativo	Negativo
K/A	K/A	M=(+) I=(+) O=(±)	Negativo	Positivo

Tabla 8: Resultado de pruebas bioquímicas tradicionales para la identificación de la cepa *Citrobacter freundii*

<i>LIA</i>	<i>TSI</i>	<i>Medios de MIO</i>	<i>Cultivo KLIGLER</i>	<i>CITRATO</i>
K/A	K/A	M=(+) I=(+) O=(+)	Negativo	Negativo
K/K	K/A	M=(+) I=(+) O=(±)	Negativo	Negativo

Tabla 9: Resultado de pruebas bioquímicas tradicionales para la identificación de la cepa *Citrobacter freundii*

<i>K/A</i>	<i>TSI</i>	<i>Medios de MIO</i>	<i>Cultivo KLIGLER</i>	<i>CITRATO</i>
	K/A	M=(+) I=(±) O=(±)	Negativo	Negativo
K/A	K/A	M=(+) I=(+) O=(±)	Negativo	Negativo

Tabla 10 Resultado de pruebas bioquímicas tradicionales para la identificación de la cepa
Citrobacter freundii

<i>LIA</i>	<i>TSI</i>	<i>Medios de MIO</i>	<i>Cultivo KLIGLER</i>	<i>CITRATO</i>
K/A	K/A	M=(+) I=(±) O=(±)	Negativo	Negativo
K/A	K/K	M=(+) I=(+) O=(±)	Negativo	Positivo

Tabla 11: Resultado de pruebas bioquímicas tradicionales para la identificación de la cepa
Citrobacter freundii

<i>LIA</i>	<i>TSI</i>	<i>Medios de MIO</i>	<i>Cultivo KLIGLER</i>	<i>CITRATO</i>
K/K	K/A	M=(+) I=(+) O=(+)	Negativo	Negativo
K/A	K/A	M=(+) I=(+) O=(-)	Negativo	Negativo

Tabla 12: Resultado de pruebas bioquímicas tradicionales para la identificación de la cepa
Citrobacter freundii

<i>LIA</i>	<i>TSI</i>	<i>Medios de MIO</i>	<i>Cultivo KLIGLER</i>	<i>CITRATO</i>
K/A	K/A	M=(+) I=(±) O=(±)	Negativo	Negativo
K/A	K/A	M=(+) I=(±) O=(±)	Negativo	Negativo

Se realizaron 35 pruebas estandarizadas por medio del sistema miniaturizado API-20E de las cuales se ejemplifican las más típicas para *C. freundii*, todas aisladas con Sulfito de Bismuto, véase anexo.

Tabla 13 Resultados obtenidos mediante la prueba miniaturizada API-20E

ONPG	ADH	UDC	ODC	GLU	ILE	URE	IDA	IND	VP	GLU	GLU	MAN	INO	SOR	RHY	SAC	MEL	AMY	ARA	ONI	CODIGO
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	-
+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	1744513
+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	++	+	-	+	+	+	-	1744513
+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	++	+	-	+	+	-	+	+	+	-	1744513
+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	1744513
+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	1604773
-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	0104573
-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	2604553
-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	0404773
+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	1744513
+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	1604773
+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	1604773

* Los códigos que aparecen, aunque son diferentes todos codifican positivo para *C. freundii*

De los análisis cromatográficos realizados se seleccionaron 35 cromatogramas que presentaron los valores de área similares para cada uno de los ácidos grasos (Tabla 17).

Se observó que la cepa tipificada de *C. freundii* (NCTC-9750), presentó 10 ácidos grasos con respecto a los 26 presentes en la mezcla estándar (véase anexo Bacterial Acid Methyl Esters) de ácidos grasos (Tabla 16, véase también en el anexo el cromatograma con el perfil definitivo), de los cuales se presentan los ácidos grasos característicos de las enterobacterias, Láurico (C 12:0), Mirístico (C 14:0), Palmítico (C 16:0) ver fig. 2. El pico 15 presentó la mayor área y que coincide con lo que se reporta en la literatura, es decir que el ácido graso de 16 carbonos es el más abundante para la familia Enterobacteriaceae.

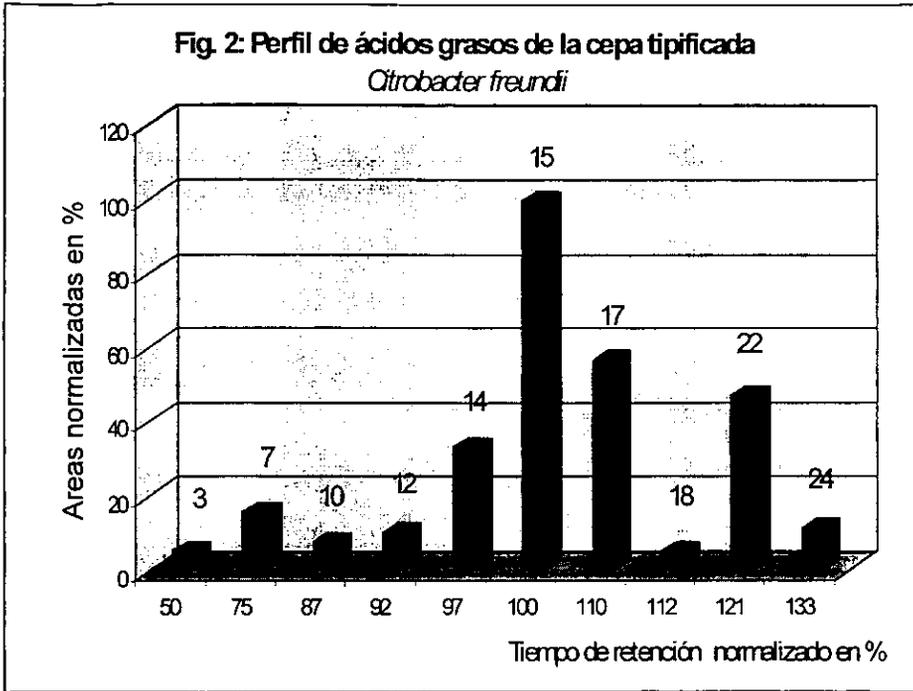
Tabla 1. Ácidos grasos que conforman el perfil de las cepas tipificadas de *C. freundii*

Pico	Nombre común	Abreviatura	Nombre sistemático
3	Ácido Láurico	C 12:0	Dodecanóico
7	Ácido Mirístico	C 14:0	Tetradecanóico
10		C 15:0	Pentadecanóico
12	Ácido Hidroximirístico	C 14:0 3-OH	3-hidroxitetradecanoico
14	Ácido palmitoleico	C 16:1 ⁹	cis-9-hexadecenoico
15	Ácido Palmítico	C 16:0	Hexadecanóico
17		C 17:0 ^A	cis-9, 10-metilenehexadecanóico
18	Ácido Esteárico	C 17:0	Heptadecanóico
22	Ácido Oléico	C 18:1 ⁹ , 18:1 ¹¹	trans-9-octadecenoato, cis-11-octadecenoato
24		C 19:0 ^A	cis-9-10-metileneoctadecanóico

Ácidos grasos citados por orden de elución a través de una columna de CGL. (Toshi 1967, Larson y Mardh 1974 y Boc y Gjerde 1980)

Tabla 17 Areas (porcentajes) normalizadas de los ácidos grasos presentes en *C. freundii*

Pico	3	7	10	12	14	15	17	18	22	24
Núm de crom	C12:0	C14:0	C15:0	C14:0:3-OH	C16:1 ^a	C16:0	C17:0 ^a	C17:0	C18:1 ^a , 18:1 ^b	C19:0 ^a
1	10.22	21.49	7.27	15.4	30.26	100	64.24	5.24	45.81	13.22
2	8.49	19.59	7.86	13.34	34.32	100	63.92	5.88	49.42	13.03
3	8.47	20.78	8.61	23.08	34.28	100	61.34	6.65	44.91	12.78
4	14.04	24.25	7.18	25.44	38.05	100	61.28	4.99	49.11	12.59
5	4.72	14.28	8.97	7.20	31.64	100	53.07	7.18	47.99	11.99
6	3.83	13.42	8.07	6.66	30.72	100	52.41	6.30	46.64	11.66
7	3.38	12.61	7.42	25.76	35.76	100	47.56	6.16	49.64	10.16
8	3.73	13.81	7.23	5.79	24.55	100	54.59	6.78	39.11	12.87
9	4.91	15.32	9.02	7.46	33.03	100	49.07	7.35	45.32	10.27
10	4.68	14.86	6.90	6.9	33.38	100	47.63	6.60	44.43	11.09
11	5.11	15.05	7.93	9.23	31.77	100	46.77	6.34	44.51	11.43
12	5.11	15.68	7.67	7.04	26.02	100	54.58	6.13	40.63	12.78
13	4.73	14.36	7.97	5.75	35.11	100	50.53	5.76	47.61	10.41
14	4.62	14.57	8.11	7.06	28.12	100	52.08	5.81	41.03	12.86
15	3.82	12.71	7.96	4.74	30.34	100	53.17	5.80	41.73	12.77
16	5.24	13.74	7.55	9.81	33.02	100	50.93	6	46.28	10.45
17	4.68	13.84	9.06	6.34	32.74	100	52.61	5.69	49.53	11.79
18	3.80	13.17	8.17	4.98	35.57	100	49	5.49	49.67	11.01
19	4.44	13.96	8.26	6.47	38.21	100	49.32	5.66	50.49	10.01
20	3.93	13.63	8.20	6.34	37.81	100	69.89	5.68	51.24	10.48
21	4.52	14.29	7.69	8.16	31.66	100	50.26	5.87	44.74	11.63
22	2.9	11.53	8.8	4.79	29.68	100	54.56	5.96	48.6	14.51
23	2.4	16.1	6.27	11.09	36.53	100	57.26	4.98	43.35	12.4
24	4.86	14.44	7.23	7.52	27.9	100	54.37	5.25	47.31	11.31
25	3.4	15.79	6.79	9.79	26.95	100	56.68	5.16	47.81	12.84
26	4.83	14.28	6.47	11.04	27.37	100	59.03	5.88	49.37	13.74
27	9.4	17.64	7.9	10.08	43.14	100	68.23	4.43	52.65	8.8
28	15.36	26.36	7.37	13.92	34.9	100	66.95	6.19	49.89	14.68
29	3.17	13.13	8.43	15.58	50	100	70.44	4.5	53.07	9.08
30	3.51	11.97	8.85	16.77	46.46	100	71.81	4.81	57.14	10.02
31	6.58	21.75	8.08	14.88	40.11	100	69.37	4.16	49.36	8.43
32	5.34	14.67	6.32	10.17	25.8	100	56.86	4.9	45.46	12.83
33	5.24	15.24	7.55	9.81	33.03	100	50.93	6	46.28	10.45
34	4.68	13.84	9.06	6.34	32.66	100	52.6	5.9	49.53	11.79
35	10.13	29.64	8.57	13.42	34.94	100	62.21	5.07	44.44	11.44



Tanto a los valores de las Áreas Normalizadas (AN) como a los de los Tiempos de Retención Normalizados (TRN), ambos en porcentajes, se les calculó la media (\bar{X}), desviación estándar (S), valores máximo y mínimo, límite inferior y superior e intervalos de confianza al 95% (Tablas 3 y 4). Los ácidos grasos de mayor área fueron los que corresponden a los picos: 17 con una \bar{X} = 56.73 y una S=7.43; 14 con una \bar{X} =33.31 y una S=5.67; 22 con una \bar{X} = 47.37, y una S=3.63. Los ácidos grasos de menor área fueron los siguientes: el 24 con una \bar{X} =11.64 y una S=1.52, el 18 con una \bar{X} =5.73 y una S=0.74, el 10 con una \bar{X} =7.85 y una S= 0.77 y el 3 con una \bar{X} =5.66 y una S=2.98..

Con lo que respecta a los (TRN) estos son algunos de sus resultados el pico 17 con una \bar{X} de 110.19 y una S= 0.50; el pico 14 con una \bar{X} =96.84 y una S=0.037; observándose que en los tiempos de retención dados se ve el orden de elución de la muestra en estudio. Cabe señalar que de los 10 picos analizados, en tres de ellos (3, 7 y 10) el C.V muestra un porcentaje de variación importante,

el cual el 20% que significa que sé esta saliendo de los parámetros del 20% que determina la bibliografía como límite (Gracia y Ascencio de 1975).

Tabla 18: Medidas descriptivas de las áreas de cada uno de los ácidos grasos identificados en la cepa tipificada *C. freundii*

Pico	N	\bar{X}	S	C.V	Valor Max	Valor Min	Límit. Inf. (95%)	Límit. Sup. (95%)
3	35	5.66	2.98	52.65	15.36	2.4	4.63	6.69
7	35	16.05	4.18	26.04	29.64	11.53	14.61	17.4
10	35	7.85	0.77	9.808	9.06	6.27	7.58	8.11
12	35	10.51	5.55	52.806	25.76	4.74	8.60	12.4
14	35	33.31	5.67	17.021	50.00	24.55	31.36	35.2
15	35	100	100	100	100	100	100	100
17	35	56.73	7.43	13.09	71.81	46.77	54.17	59.2
18	35	5.73	0.74	12.91	7.35	4.16	5.47	5.98
22	35	47.37	3.63	7.66	57.14	39.11	46.12	48.6
24	35	11.64	1.52	13.05	14.68	8.43	11.12	12.1

X=Media; N=Número de datos, S=Desviación estándar, C. V.= Coeficiente de Variación;

Límit. Inf.= Límite Inferior; Límit. Sup.= Límite Superior Valores Máximos y Mínimos

Tabla 19: Medidas descriptivas de los tiempos de retención de cada uno de los ácidos grasos identificados en la cepa tipificada *C. freundii*

Pico	N	\bar{X}	S.	C.V	Max	Min	Limit. Inf.	Limit. Sup.
3	35	49.94	0.158	0.3163	50.41	49.73	49.88	49.99
7	35	74.55	0.129	0.1730	74.83	73.99	74.52	74.57
10	35	87.31	0.061	0.069	87.38	87.1	87.29	87.33
12	35	91.97	0.583	0.633	91.98	91.01	91.87	92.21
14	35	96.84	0.037	0.038	96.9	96.72	96.82	96.85
15	35	100	100	100	100	100	100	100
17	35	110.19	0.502	0.455	110.1	19.9	110.106	110.36
18	35	112.15	0.0993	0.088	112.3	111.9	112.11	112.18
22	35	121.27	0.091	0.075	121.5	121.1	121.24	121.302
24	35	133.21	3.266	2.451	134.1	133.6	132.08	134.33

\bar{X} : Media; N=Número total de datos, S=Desviación estándar, C. V. Coeficiente de Variación;

Limit. Inf.: Límite Inferior; Lím. Sup.= Límite Superior; Valores de Máximos y Mínimos.

Como se puede observar en las tablas 16,17, 18 y 19 y la fig. 2 la cepa tipificada de *C. freundii* muestra su perfil de ácidos grasos, 10 de los 26 presentes en la mezcla estándar (véase anexo).

8. DISCUSIÓN

El perfil cromatográfico de los ácidos grasos presentes en *C. freundii*, son de cadena lineal y corresponden a los siguientes picos, 3 (dodecanóico), 7 (tetradecanóico), 10 (pentadecanóico), 16 (hexadecanóico) y 18 (heptadecanóico). También se presentaron ácidos insaturados de doble ligadura tales como el pico 22 (trans-9-octadecenoato, Cis-11-octadecenoato).

El pico 12, ácido 3-hidroxitetradecanóico, presenta en su estructura un grupo hidroxilo, la presencia de esta clase de ácidos grasos que son componentes celulares de los lipopolisacáridos (LPS) que consisten en un complejo lípido A, que esta constituido por unidades de disacáridos y glucosamina que tiene unido varios ácidos grasos de cadena larga. El ácido β -hidroximirístico un ácido graso con 14 átomos de carbono, se halla siempre presente y es exclusivo para este lípido. La toxicidad de la bacteria esta ligada con la presencia del lípido A, por sus LPS, que son extremadamente tóxicos, este está fijado a la membrana exterior, el lípido A indica que la bacteria presenta antígenos de superficie y posiblemente un tipo de endotoxinas que la incluyen dentro de las bacterias con capacidad para ocasionar enfermedad. Esto es coincidente con la bibliografía, en la que se reporta que es un microorganismo patógeno oportunista y que en ocasiones se llega a confundir con *Shigella* spp. debido a que origina la misma sintomatología en los pacientes y su diferenciación solo se logra por medio de pruebas antigénicas.

Los picos, 17 (ácido cis-9-metilenehexadecanóico) y 24 (ácido cis-9-10-metileneoctadecanóico) le confieren flexibilidad a la membrana siendo partes estructurales de la misma (Machtiger y O'leary 1973, Thosi 1967, Lenhiger 1984 y Jawetz *et al.* 1996).

Los coeficientes de variación altos presentes en algunos picos podrían explicarse como resultado de que sean los picos característicos para una subclasificación más fina de esta especie es decir hasta subespecie, ya que esta técnica tiene la ventaja de ser muy sensible.

Por otro lado la obtención del perfil cromatográfico de *C. freundii* demuestra que los picos 17, 14 y 22 tienen la característica de ser los que presentan mayor área, por lo que estos picos son los característicos de la especie en estudio. Este mismo laboratorio se han realizado estudios similares de CGL para implementar un banco de datos, en donde, por ejemplo, el perfil obtenido de ácidos grasos celulares de *Enterobacter agglomerans*, se basa en los picos 7, 14 y 17 que son los de mayor área siendo el pico 7 de los tres, el que tiene la mayor área. En *Klebsiella rhinoscleromatis* los picos de mayor abundancia fueron el 14, 17 y 22 siendo el pico 22 el de mayor área. En *Shigella* spp. el pico 14 presentó la mayor área y en *C. freundii* se demuestra que dentro de los picos ya mencionados el pico 17 muestra ser el de mayor área por lo que se podría sugerir que en estas tres especies y la del presente estudio denotan la presencia de ácidos grasos con cadenas que presentan de 12 a 26 carbonos (Thosi 1967, Larson 1974, Bøe y Gjerde 1980, Campoy 1992, Yáñez 1992 y Hurtado 1998).

La determinación de los ácidos grasos en bacterias no es un proceso de diagnóstico único pero si es una herramienta para la distinción entre especies de enterobacterias debido a que presentan entre sí, diferencias con respecto a la composición de ácidos grasos, esto concuerda con lo que menciona Bergan 1984, ya que el menciona que los ácidos grasos son determinantes para la identificación bacteriana y en este laboratorio del proyecto Cyma, se están elaborando bancos de datos con los perfiles de ésteres metílicos obteniendo muy buenos resultados en cada especie en estudio.

Debido a que los perfiles presentes entre las enterobacterias no son iguales se crean marcadas diferencias entre las mismas especies, es por ello que el perfil obtenido es incambiable; Janzen (1974), les denomina a estos perfiles "huellas digitales" ya que adiciona la impresión metodológica real de los perfiles (cromatogramas), demostrando lo factible del procedimiento en taxonomía dentro del mismo grupo.

Cabe mencionar que dependiendo del tipo de bacteria en estudio se encontrará un perfil cromatográfico para cada una de ellas; Machtiger (1973), realizó estudios por CGL con tres diferentes cepas de *Citrobacter freundii* (ATCC), encontrándose que la bacteria tiene una

homogeneidad de composición de ácidos grasos celulares, así como también la heterogeneidad de la composición química celular característica de cada especie.

9 CONCLUSIONES

- ❖ La obtención de cromatogramas a partir de ésteres metílicos de ácidos grasos dio como resultado un perfil característico para *C. freundii*, en este caso se obtuvieron 10 picos de la especie en estudio esto concuerda con Häusler 1983 y 1987, que menciona la irrepetibilidad de los perfiles para cada especie bacteriana en estudio.
- ❖ La presencia de los ácidos grasos en las enterobacterias Láurico, Mirístico y Palmítico identificados en el perfil de *C. freundii* dio como resultado la ubicación de dicha especie dentro de las enterobacteriaceae.
- ❖ Los corrimientos de las bioquímicas y Api 20E verificaron la pureza de la cepa tipificada para asegurar que los perfiles obtenidos correspondían a *C. freundii*.
- ❖ Las condiciones de análisis deben ser siempre las mismas puesto que como esta técnica es de alta sensibilidad se puede caer en el error de que si por ejemplo el cultivo se deja más tiempo del establecido de 24 horas el crecimiento bacteriano ya no estaría en su fase exponencial y entonces las cepas se cosecharían en la fase de decrecimiento por lo tanto la obtención de los ácidos grasos esterificados sería muy pobre.
- ❖ La identificación obtenida pasara a formar parte del banco de datos para enterobacterias del proyecto Cyma.
- ❖ Los ácidos grasos más característicos del perfil obtenido fueron de acuerdo a su concentración en áreas el pico 17, 22 y 14.

10. RECOMENDACIONES

- ❖ En general las especies de *Citrobacter* son de difícil identificación, debido a su similitud con *Shigella* y a que existen otras siete diferentes especies de *Citrobacter*. Por lo tanto el uso de la cromatografía resulta de gran utilidad para determinar a las especies con base en sus perfiles de ácidos grasos.
- ❖ *C. freundii* es una bacteria oportunista y no esta considerada como una bacteria que pueda causar una gran epidemia, pero sin embargo como habitante normal del intestino de animales de sangre caliente y como oportunista que es, puede ser causante de mortandad en pacientes debilitados o con catéteres y es por ello que no se deje de lado en estudios de importancia médica sanitaria a ningún tipo de enterobacterias, que puedan o no causar epidemias.
- ❖ Se recomienda la utilización de esta técnica cromatográfica para identificación taxonómica puesto queda resultados cualitativos y cuantitativos
- ❖ La reproducibilidad de la técnica es un factor muy importante para este tipo de estudio es por ello que para obtener un perfil se recomiendan de 20 a 50 repeticiones representativas estadísticamente por cada especie de bacteria en estudio.
- ❖ Se recomienda que este análisis se utilice en investigaciones ambientales, con el fin de ver si no hay cambios en los perfiles de las cepas tipificadas con respecto a las ambientales.
- ❖ Si se quieren obtener resultados de alta sensibilidad la CGL es un buen método de determinación e identificación bacteriana.

11. BIBLIOGRAFIA.

- Abel, K., Secmetzin H. y Peterson J. I. 1963. Classification of organisms by analysis or chemical composition. Feasibility of utilizing gas chromatography. *J. Bacteriol.*, **85**: 1039-1044.
- Alcamo, E. I., 1991. Fundamentals of lipids. Microbiology 3ª Ed. The Benjamin Corning Publishing Co. In.
- Analytical Profile Index Enterobacteriaceae and other Gram-negative bacteria, 20E. 1984, 9ª Ed Analytab products, U.S.A.
- APHA, AWWA, WPCF, 1992. Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. 17ª Ed. Días de Santos, España.
- Austin, B. y Priest F., 1992. Taxonomía bacteriana moderna. Limusa, México, D. F. 84-86.
- Bergan, T. y K Sorheim. 1984. Gas-liquid chromatography for the assay of fatty acid composition in Gram-negative Bacilli as an aid de classification. *Methods in Microbiol.* **85**: 345-363.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1984 Vol 3ª Ed. William y Wilkins. 408-420, 458-461.
- Bøe, B. X. y Gjerde S., 1980. Fatty acid patterns in the classification of some representatives of the families Enterobacteriaceae and Vibrionaceae. *J. Gen. Microbiol.* **116**: 41-49.
- Böttger, C. E., 1996. Approaches for identification of microorganisms despite longer experience with fatty acid profiles, DNA-based analysis offers several advantages (*ASM*) **62**: 5.247-250.
- Bousfield, I. J., Smith L. G., Dando R. T. y Hobss G. 1983. Numerical analysis of total fatty acids profiles the identification. *J. Gen. Microbiol.* **129**: 373-394.
- Campoy Otero, Emelia 1992 Análisis cromatográfico gas-líquido de los metil ésteres de los ácidos grasos celulares de *Klebsiella rhinoscleromatis*. Tesis México, D.F.
- CIECCA, SARH OPS, 1983 Memorias del curso "Microbiología y aplicaciones de los procesos biológicos de tratamiento de aguas".s.e México, D.F.
- Crosa, J. H., Steigerwalt H. G., Faming G. R. y Brenner D. J., 1974. *J. Gen. Microbiol.* **83**-271.
- Daniel, W. W, 1977. Bioestadística, base para el análisis de las ciencias de la salud. ed Limusa, México, D. F. 273-289.

- Davies, J., 1994. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes science. American Association for the Advancement of Science. **264**: 375-382.
- Davis, D. B., Dulbecco R., Eisen N., Gnsber S. H., 1990. Microbiology. 4ª ed., J. B. Lippincot Company Philadelphia. 582-590.
- Divo, A.1990. Microbiología Médica. 4ª Ed. Nueva Editorial Interamericana, México, D. F. 153-159.
- Edwards P.R. y Ewing W.H. 1986. Identificación de enterobacterias. 4ª Ed. Elsevier, Nueva York. 341-364.
- Eerola E. y Lehtonen P. O. 1988. Optimal data processing procedure for automatic bacterial identification by gas-liquid chromatography of cellular fatty acids. J. Clin. Microbiol. **26** (9): 1745-1753.
- Freeman, B. D. 1989. Microbiología de Burrows 22ª Ed Nueva Editorial Interamericana, México, D. F. 495-503, 540.
- Gamarra, H. G., 1990. Infección urinaria. Rev. VIS-Salud Bucaramnga Colombia. **18**(2) 71-75.
- Glass, R. L., 1971. Alkholisis, saponification of fatty acids methylesteres Lipid. **6**: 919.
- Gracia y Asencio, J..M. Storch de 1975. Fundamentos de Cromatografía de gases 2 Ed España, Alhambra.
- González, A. M. E., Robles V. E., Rivera A. F., 1984. Manual de operación del cromatógrafo de gases Hewlett Packard, H. P. 5890A, Proyecto Cyma.
- Häusler, J., Richter V., 1983. Identification of bacteria of the family Enterobacteriaceae using gas chromatography. 72th-International Symposium on Microbiol Association and Interaction in Food. Publishing House of the Hungarian Acad. Science, Budapest. P. A.
- Häusler, J., 1987. Identification of indicators of fecal pollution by Enterobacteriaceae using chromatography. V Curso-Simposio Internacional Sobre Biología de la Contaminación, UNAM-SEDUE-UPN, México, D. F. P. A.
- Holmes, B., Willcox R. W. and Lapage S. P., 1978. Identification of Enterobacteriaceae by the API-20E. System. J. Clin. Path. **31**: 22-30.
- Hurtado Bocanegra, Dolores 1998. Determinación del perfil de 4 especies de *Shigella* spp. mediante cromatografía de gases. Tesis México D.F.

- James, A. T., y Martin J. P., 1956. Gas-liquid chromatography the separation and identification of the methyl esters of saturated and unsaturated acids from formic acid to n-octadecenoic acid. *J.f Bioch.* **63**: 144-152.
- James, A. T., y Martin J. P., 1956. Gas-liquid chromatography the gas density meter new apparatus for the detection of vaporous in flowing gas streams. *J. Bioch.* **63**: 138-143.
- Jantzen, E. Bryn K and BØvren K., 1974. Gas chromatography of bacterial whole cell methanolysates. *Acta path. Microbiol Scand. Sect. B.* **82**: 753-766.
- Jawetz, E., Melnick L. S. y Adelberg A. E., 1996. *Microbiología Médica.* 20ª Ed., El Manual Moderno, México, D. F. 204-207.
- Karunasagar, I. y Pair R., 1992. Systemic *Citrobacter freundii* infection in common carp *Cyprinus carpio* L., fingering. *J. Fish Dis.* **15**: 95-98.
- Knox, J. H., 1965. Cromatografía de gases, Tr. Manuel Urrutia R. UTEHA, México, D. F. 1-13.
- Larson, L. y Mardh P. A., 1984. Gas chromatography mass spectrometry applications in microbiology. *Plen. Publ. Corp.* **259**: 5-15.
- Lenhinger, A. L. 1984. *Bioquímica, Las bases moleculares de la estructura y función celular.* 2ª Ed. Omega, Barcelona, España. 285-290.
- Lennette, H. E., 1982. *Manual de Microbiología Clínica.* 4ª Ed. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina. 340-443.
- Linn, W., Hollis D. G., Weavers R. E. y Moss W. C., 1989. Characterisation of CDC group-3 by cellular fatty acids analysis. *J. Clin. Microbiol.* **27**: 735-737.
- Mac Faddin, J. F., 1984. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. *Médica Panamericana, México, D. F.* 45-49, 112-120, 138-141, 190-196.
- Machtiger, A. N. y O'leary M. W., 1973. Fatty acid compositions of paraclons *Arizona, Citrobacter* and *Providencia* *J. Bacteriol.* **114**: 80-85.
- Magnuson, K., Jackowkis Rock O. C. y Cronan J. E., 1993. Regulation of fatty acids biosynthesis in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **53**: (3), 522-542.
- Murray, P., Baron J. E., Pfaller A. M., Tenover C. F., Tenover H. R., 1995. *Manual of clinical microbiology.* ed. ASM PRESS, 6ª Ed. Washington D. C.
- Oleary, W. W., 1962. The fatty acids of bacterial. *J. Bacteriol.* **26**: 421-447.

- Pelczar, Michael J., Reid, Roger D y Chan E.C.S. 1991 Microbiología 2ª. Ed. Mc Graw-Hill. México.
- Perea, P. E. J. 1992. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Doyma, Barcelona, España. Vol. II. 624-630.
- Postigo L., 1980. Química general aplicada. Sopena, España. 504-505.
- Shantha, N. C. y Napolitano G. E., 1992. Cromatografía de ácidos grasos. J. Chromat. **624**: 37-51.
- Seewald, M. y Eichinger H. M., 1989. Separation of mayor phospholipid classes by high-performance liquid chromatography and subsequent analysis of phospholipid-bound fatty acid using gas chromatography. J. Chromat. **469**: 271-280.
- Spierings G Van Silfhout A Hofstra H y Tormassen J, 1992. Identification of *Klebsiella pneumoniae* by DNA Hybridization and fatty acid analysis international J. of System Bacteriol **42** (2); 252-256.
- Thoshi, K. 1967. Fatty acids in the genus *Bacillus*. J. Bacteriol. **93**: 894-903.
- Toranzos, A. G., 1991. Current and possible alternate indicators of faecal contamination in tropical waters. Ashurt Review Environment Toxicol. and Water Quality and Intenational J. **6**: 121-130.
- Yañez Noguez, Isaura 1992. Análisis por cromatografía gas-líquido de los ácidos grasos celulares totales de *Enterobacter agglomerans*. Tesis México, D.F.
- Willard, H. H, Merritt L. L., Deacon A. J., 1975 y 1991. Métodos instrumentales de análisis. ed. Continental, México, D. F. 623-625.

12. GLOSARIO

12.1 SOLUCIONES *

12.1.2 Solución de formaldehído al 0.5%

Fórmula:

Formaldehído	0.5 ml
Agua destilada	100 ml

Preparación:

Medir con una pipeta 0.5 ml de formaldehído y mezclarlos en 100 ml de agua destilada para poder tener una concentración del 0.5% poner en refrigeración.

12.1.3 Solución fisiológica de NaCl al 0.85% (Solución C).

Fórmula:

Cloruro de sodio	0.85 g
Agua destilada	100 ml

Preparación:

Pesar 0.85 g de NaCl y disolverlos en 100 ml de agua destilada, esterilizar en autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos, conservar en refrigeración.

12.1.4 Solución de metóxido de sodio (Solución A)

Fórmula:

Metanol	37 ml
Metóxido de sodio	23 ml
Benceno	90-100 ml

Preparación:

Medir con una pipeta 37 ml de metanol y vaciar a un matraz volumétrico de 100 ml, posteriormente se agregan 23 ml de metóxido de sodio y aforar a 100 ml con benceno, conservar en refrigeración.

12.1.5 Solución de metanol saturado con cloro gas (solución B)

Fórmula:

Ácido clorhídrico concentrado.	30 ml
Ácido sulfúrico concentrado	30 ml
Metanol	20 - 25 ml

Preparación:

En un matraz de bola se colocan 30 ml de ácido clorhídrico concentrado, en un embudo de separación se colocan 30 ml de ácido sulfúrico concentrado y en un embudo colector se colocan de 20 a 25 ml de metanol.

Se hace reaccionar el ácido clorhídrico con el ácido sulfúrico, recuperándose los vapores del cloro en el tubo colector que contiene el metanol hasta un pH ácido.

12.2 Medios de cultivo

12.2.1 Agar nutritivo:

Fórmula:

Bacto extracto de carne	3.0 g
Bacto peptona	5.0 g
Bacto agar	15.0 g

Preparación:

Pesar 23 g de agar nutritivo y disolverlos en 1000 ml de agua destilada, se calienta hasta completa disolución y se esteriliza en autoclave a 15 libras durante 15 minutos.

12.2.2 Agar Kligler con hierro

Fórmula:

Extracto de carne	3.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
Peptona	15.0 g
Peptona proteasa	5.0 g
Lactosa	10.0 g
Glucosa	1.0 g
Sulfuro ferroso (FeSO_4)	5.0 g
Tiosulfato de sodio (NaS_2O_3)	0.3 g
Rojo fenol	0.024 g
Agar	12.0 g
Agua destilada	1000 ml

Preparación:

Pesar 55 g de medio deshidratado “Kligler Iron Agar” y agregar 1000 ml de agua destilada fría, dejándolo en reposo aproximadamente 15 minutos. Calentar agitando constantemente hasta disolver completamente, sin alcanzar la temperatura de ebullición. Distribuir volúmenes de 6 a 7 ml en tubos de ensayo (12X120 mm), tapar y esterilizar en autoclave a 21 °C durante 15 minutos. Después de esterilizado dejar enfriar inclinado, de tal manera que la base sea aproximadamente de media altura del fondo del tubo. Guardándolo en refrigeración de 2 a 8 °C, pH final: 7.4 ± 0.2 a 25 °C

12.2.3 Agar nutritivo (agar para manutención)**Fórmula:**

Extracto de carne	5.0 g
Peptona	10.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1000 ml

Preparación:

Pesar los ingredientes y agregar 1000 ml de agua destilada fría, dejar reposar aproximadamente 15 minutos. Calentar agitando constantemente hasta la completa disolución del medio, cuidando de no alcanzar la temperatura de ebullición. Distribuir volúmenes de 6 a 7 mL en tubos de (12X120mm), tapar y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Después de esterilizar, aún caliente colocar en posición inclinada hasta que el medio solidifique, pH final: 7.4 ± 0.2 a 25 °C

12.2.4 Agar lisina-hierro (LIA) para descarboxilación de lisina

Fórmula:

Extracto de levadura	3.0 g
Bacto peptona	5.0 g
Dextrosa	1.0 g
Hidrocloruro L-lisina	10.0 g
Sulfato ferroso	0.2 g
Citrato de amonio férrico	0.5 g
Tiosulfato de sodio	0.04 g
Púrpura de bromocresol	0.02 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1000 ml

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Preparación:

Pesar 34.5 g del medio deshidratado y agregar 1000 ml de agua destilada fría, dejar reposar aproximadamente 15 minutos, calentar agitando constantemente hasta su completa disolución, cuidando de no alcanzar la temperatura de ebullición. Distribuir en volúmenes de 6 a 7 ml en tubos de ensayo 12X120 mm tapar y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Después de esterilizar, aún caliente colocar en posición inclinada hasta que el medio solidifique. Guardándolo en refrigeración de 2 a 8 °C, pH final 6.7 ± 0.2 a 25 °C.

12.2.5 Medio para movilidad-indol (MIO)

Fórmula:

Extracto de levadura	3.0 g
----------------------	-------

Peptona de gelatina	10.0 g
Peptona de caseína	10.0 g
L-ornitina	10.0 g
Dextrosa	1.0 g
Púrpura de bromocresol	0.02 g
Agar	2.0 g
Agua destilada	1000 ml

Preparación:

Pesar 31 g del medio deshidratado y agregar 1000 ml de agua destilada fría, deja reposar aproximadamente 15 minutos. Calentar agitando constantemente hasta su completa disolución, cuidando de no alcanzar la temperatura de ebullición. Distribuir de 3 a 4 ml en tubos de ensayo de 12X120 mm, tapar y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos, dejarlos enfriar en posición vertical, guardar en refrigeración de 2 a 8 °C. pH final 6.5 ± 0.2 a 25 °C

12.2.6 Agar Eosina Azul de Metileno (medio selectivo).**Fórmula:**

Peptona de Gelatina	10.0 g
Lactosa	5.0 g
Sacarosa	5.0 g
Fosfato dipotásico	13.5 g
Eosina	0.40 g
Azul de metileno	0.065 g
Agua destilada	1000 ml

Preparación:

Pesar los medios deshidratado y agregar 1000 ml de agua destilada fría, deja reposar aproximadamente 15 minutos. Calentar agitando constantemente hasta su completa disolución, cuidando de no alcanzar la temperatura de ebullición, tapar y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Distribuir 25 ml en cajas de petri de 120 mm de diámetro, dejarlos enfriar y, guardar en refrigeración de 2 a 8 °C pH final 7.2 ± 0.2 a 25 °C

12.2.7 Agar McConkey (medio selectivo).**Fórmula:**

Peptona especial	3.0 g
Peptona de gelatina	17.0 g
Lactosa	10.0 g
Mezcla de sales biliares	1.5 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Rojo neutro	0.03 g
Cristal violeta	0.001 g
Agar agar	13.5 g
Agua destilada	1000 ml

Preparación:

Pesar los medios deshidratados y agregar 1000 ml de agua destilada fría, deja reposar aproximadamente 15 minutos. Calentar agitando constantemente hasta su completa disolución, cuidando de no alcanzar la temperatura de ebullición, tapar y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Distribuir 25 ml en cajas de petri de 120 mm de diámetro, dejarlos enfriar y, guardar en refrigeración de 2 a 8 °C. pH final 7.1 ± 0.2 a 25 °C

12.2.8 Sulfito bismuto (medio selectivo).

Fórmula:

Bacto extracto de carne	5.0 g
Bacto peptona	10.0 g
Bacto dextrosa	5.0 g
Fosfato de sodio	4.0 g
Sulfato ferroso	0.3 g
Indicador de sulfito de bismuto	8.0 g
Bacto agar	20.0 g
Verde brillante	0.025 g
Agua destilada	1000 ml

Preparación:

Pesar los medios deshidratado y agregar 1000 ml de agua destilada fría, deja reposar aproximadamente 15 minutos. Calentar agitando constantemente hasta su completa disolución, cuidando de no alcanzar la temperatura de ebullición, tapar y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Distribuir 25 ml en cajas de petri de 120 mm de diámetro, dejarlos enfriar en, guardar en refrigeración de 2 a 8 °C. pH final 7.1 ± 0.2 a 25 °C

13.2.9 Agar Citrato de Simmons (medio selectivo)

Fórmula:

Fosfato deshidrogenado de amonio	1.0 g
Fosfato dipotásico	1.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Citrato de sodio	2.0 g
Sulfato de magnesio	0.20 g

Agar agar	15.0 g
Azul de bromito	0.08 g
Agua destilada	1000 ml

Preparación:

Pesar los medios deshidratado y agregar 1000 ml de agua destilada fría, deja reposar aproximadamente 15 minutos. Calentar agitando constantemente hasta su completa disolución, cuidando de no alcanzar la temperatura de ebullición, tapar y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Distribuir 25 ml en cajas de petri de 120 mm de diámetro, dejarlos enfriar en, guardar en refrigeración de 2 a 8 °C pH final 6.9 ± 0.2 a 25 °C los medios selectivos utilizados nos dieron como resultado las características de la bacteria en estudio.

*Las soluciones y medios selectivos se consultaron en los siguientes libros: APHA, AWWA, WPCF 1992 y Mac Faddin 1994.

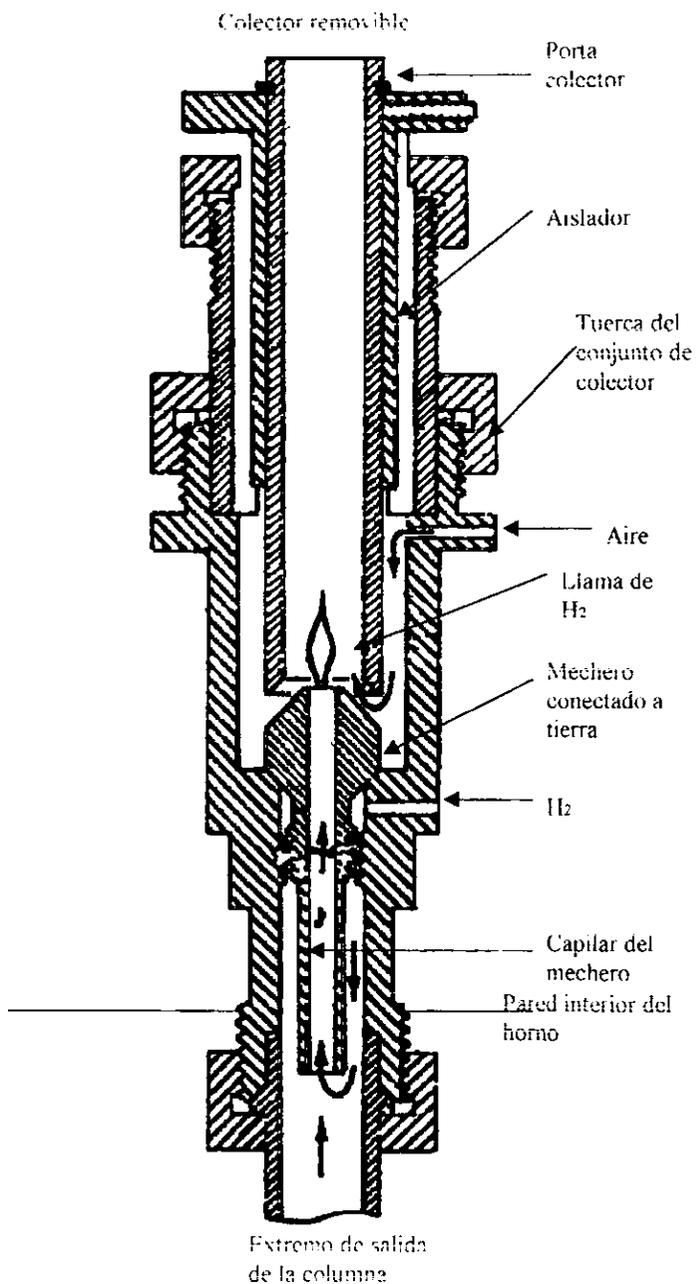
ANEXO

TABLA 15: ABREVIATURAS PARA EL SISTEMA API-20E

ABREVIATURA	SUBSTRATOS	REACCIONES ENZIMATICAS	PRINCIPIO
ONPG	Ortonitrofenol-galctósido	Arginina dehidrolasa	Mostrar la presencia de la β -galactosidasa
ADH LDC ODC	Arginina Lisina Ornitina	Arginina dehidrolasa Lisina descarboxilasa Ornitina descarboxilasa	Medir la capacidad enzimática de un organismo para descarboxilar un aminoácido para formar una amina, con la consiguiente alcalinidad
CIT	Citrato sódico	Utilización de citrato	Determinar si un organismo es capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono para el metabolismo provocando alcalinidad
H ₂ S	Tiosulfato sódico	Producción de H ₂ S	Determinar si se ha liberado ácido sulfúrico (H ₂ S) por acción enzimática de los aminoácidos que contienen azufre produciendo una reacción visible de color negro
URE	Urea	(Ureasa) Hidrólisis de urea	Determinar la capacidad del organismo de desdoblar la urea, formando dos moléculas de amoniaco por la acción de la enzima ureasa.
TDA	Triptofano	Triptofano desaminasa	
IND	Triptofano	Producción de Indol	Determinar la capacidad de un organismo de desdoblar el indol de la molécula de triptofano.
VP	Piruvato sódico	Producción de acetoina	
GEL	Gelatina Kohn	(Gelatinasa) Hidrólisis de gelatina	
GLU	Glucosa	Fermentación/oxidación	
MAN	Manitol	Fermentación/oxidación	
INO	Inositol	Fermentación/oxidación	
SOR	Sorbitol	Fermentación/oxidación	
RHA	Ramnosa	Fermentación/oxidación	
SAC	Sacarosa	Fermentación/oxidación	
MEL	Melibiosa	Fermentación/oxidación	
AMY	Amigdalina	Fermentación/oxidación	
ARA	Arabinosa	Fermentación/oxidación	
OX	Sobre papel de filtro	Citocromo oxidasa	

Tomado de boletín para lectura y preparación de API-20E, Merck, 1992, p. 20.

Fig 1 Vista del corte de un detector de ionización de flama (Cortesía de Hewiwet Packard Co



SAVE THE DATA SHEET!
It Contains Important Information About This Product.

Bacterial Acid Methyl Esters CP[®] Mix

Catalog No. 4-7060

This mixture contains a total of 100 µg/ml methyl esters in methyl caproate

For qualitative identification only. Retention peak sizes may vary from lot to lot.



- Me. undecanoate
- Me. 2-hydroxyundecanoate
- Me. dodecanoate
- Me. tridecanoate
- Me. 2-hydroxydodecanoate
- Me. 3-hydroxydodecanoate
- Me. tetradecanoate
- Me. 13-methyltetradecanoate
- Me. 12-methyltetradecanoate
- Me. pentadecanoate
- Me. 2-hydroxypentadecanoate
- Me. 3-hydroxypentadecanoate
- Me. 14-methylpentadecanoate
- Me. cis-9-hexadecanoate
- Me. hexadecanoate
- Me. 15-methylhexadecanoate
- Me. cis-9,10-methylenehexadecanoate
- Me. heptadecanoate
- Me. 2-hydroxyheptadecanoate
- Me. cis-9,12-octadecadienoate
- Me. cis-9-octadecanoate
- Me. trans-9-octadecanoate &
- Me. cis-11-octadecanoate
- Me. octadecanoate
- Me. cis-9,10-methyleneoctadecanoate
- Me. nonadecanoate
- Me. eicosanoate

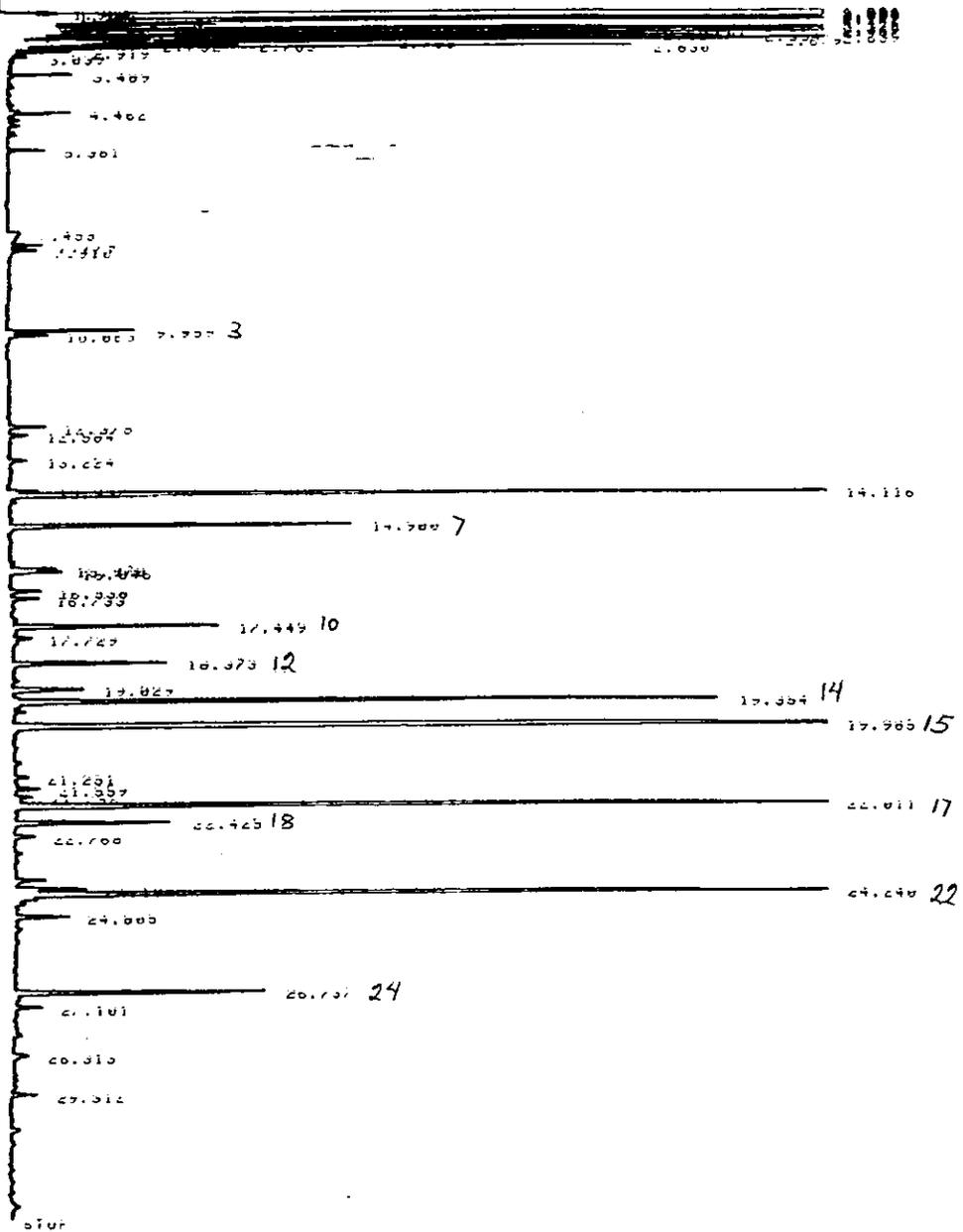
SPB[®]-1 fused silica capillary column, 30m x 0.25mm i.d.
Carrier Gas: Nitrogen, Flow Rate: 2.0 ml/min, Inlet Pressure: 280°C
Injector Temp.: 250°C, Det. Temp.: 280°C, Det. P.D.: FID
Sample: 1 µl of 4-7060 (10 µg total esters), Split Ratio: 100:1

FORM NO. 6883F
© 1987 Supelco, Inc.

SUPELCO
Belfonte, PA

* RUN #
SINA:

Perfil Definitivo de Citrobacter freundii.



STOP

TABLA 14: SISTEMA API-20E LECTURA DE REACCIONES EN LA GALERÍA

TUBO	LECTURA POSITIVA	LECTURA NEGATIVA	OBSERVACIONES
ONPG	Amarillo	Incoloro	1) Un matiz amarillo es una reacción positiva 2) El tubo VP antes de la adición del reactivo puede ser utilizado como control negativo.
ADH	Rojo o naranja	Amarillo	Un matiz anaranjado puede considerarse como reacción positiva
LDC	Rojo o naranja	Amarillo	Un matiz anaranjado puede considerarse como una reacción positiva
ODC	Rojo o naranja	Amarillo	Un color naranja después de 24 H de incubación debe considerarse negativo
CIT	Turquesa o azul oscuro	Verde brillante o amarillo	Tubo y cúpula pueden ser útiles. La reacción se lee en la cúpula.
H ₂ S	Depósito negro	Sin depósito negro	La producción de H ₂ S muchas veces pasa de un depósito negro pesado a una línea negra alrededor del fondo del tubo. Un castaño en el medio es una reacción negativa a menos que un depósito negro esté presente.
URE	Naranja	Amarillo	<i>Klebsiella</i> , <i>Proteus</i> y <i>Yersinia</i> dan rutinariamente una reacción positiva
TDA	Adicionando una gota de FeCl ₃ Café	Adicionando una gota de FeCl ₃ Amarillo	Reacción inmediata. Muchos organismos Indol + (que producen Indol) presentan un color anaranjado dorado, debido a la producción de Indol, esta es una reacción negativa
IND	Adicionar una gota del reactivo de Kovacs Rojo (superficial)	Adicionar una gota del reactivo de Kovacs. Amarillo	La reacción puede leerse después de dos minutos de la adición del reactivo de Kovacs. Después de unos minutos el HCl presente en el reactivo de Kovacs muchas veces reacciona con el plástico de la cúpula resultando un cambio de un negativo (amarillo) a un café o rojo, esta es una reacción negativa
VP	Adicionar una gota de KOH al 40% y luego una gota de alfa-naftol. Rojo	Adicionar una gota de KOH al 40% y luego una gota de alfa-naftol. Amarillo.	Esperar 10 minutos antes de considerar la reacción negativa. Un color rosa pálido después de 10 minutos será interpretado como negativo. La presencia de un color rosa pálido inmediatamente después de la adición de los reactivos, pero con tonos rosa oscuro o rojo después de los 10 minutos será interpretado como positivo.
GEL	Difusión del pigmento	Sin difusión	Las partículas de la gelatina se pueden difundir por todas partes del tubo después de la inoculación. A menos que la difusión ocurra la reacción es negativa. Cierta grado de difusión es una reacción positiva.
Fermentación MAN, IND, SOR, RHA, SAC, MEL, AMY, ARA.	Amarillo	Azul Azul-verdoso	Oxidación gram-negativas. La utilización de la oxidación de carbohidratos comienza en la porción aérea del tubo, por tanto esta reacción sólo puede ser leída de la superficie hacia el fondo del tubo. Un color amarillo en la porción superior del tubo y un azul en el fondo indica una utilización oxidativa del azúcar, esta reacción puede considerarse positiva sólo para las no enterobacterias, bacilos Gram-negativos, esta es una reacción negativa para organismos fermentadores de semejantes a enterobacterias
Fermentación GLU	Después de leer la reacción GLU adicionar dos gotas de ácido sulfúrico 0.3% y dos gotas de N-dimetil-alfa-naftilamina 0.5 N	Después de leer la reacción GLU adicionar dos gotas de ácido sulfúrico 0.3% y dos gotas de N-dimetil-alfa-naftilamina 0.5 N	Antes de adicionar reactivo observe el tubo GLU positivo o negativo para burbujas. Las burbujas son indicadores de la reducción de nitratos a nitrógeno N ₂ . Una reacción positiva puede tomar de 2 a 3 min. para que el color rojo aparezca. Confirme una prueba negativa añadiendo polvo de Zinc o granular. Un color rosa-anaranjado después de 10 min. confirma una reacción negativa. Una reacción de color amarillo indica la reducción de nitratos a nitrógeno N ₂ .
Reducción de Nitratos GLU	Rojo NO ₂ burbujas amarillas N ₂ después del reactivo y Zinc	Amarillo Naranja después del reactivo y Zinc	Las burbujas pueden tomar de 1 a 2 minutos en aparecer. El mejor resultado se obtiene de la prueba en tubos que no han tenido gas de fermentación.
MAN INO SOR CATALASA	Después de leer la reducción de carbohidratos adicionar una gota de H ₂ O ₂ al 15% Presencia de burbujas.	Después de leer la reducción de carbohidratos adicionar una gota de H ₂ O ₂ al 15% Ausencia de burbujas	