

60
2ej.



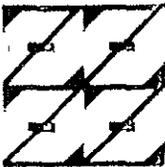
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

IDENTIFICACION DE *Salmonella sp* POR
CROMATOGRAFIA GAS-LIQUIDO MEDIANTE EL
ANALISIS DE LOS ESTERES METILICOS DE
SUS ACIDOS GRASOS CELULARES.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
BEATRIZ RIOS SORIANO

U N A M
FES
ZARAGOZA



LO HUMANO ES JE
DE NUESTRA REFLEXION

MEXICO, D. F.

1998.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

267518



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.

AGRADECIMIENTOS.

AL INSTITUTO DE INGENIERIA DE LA UNAM, EN ESPECIAL A LA DOCTORA MARIA TERESA ORTA LEDESMA, POR TODAS LAS FACILIDADES QUE ME BRINDARON PARA LA REALIZACION DE ESTE TRABAJO.

AGRADEZCO LOS COMENTARIOS Y SUGERENCIAS DE:

Q. CARLOS SALVADOR VALADEZ SANCHEZ

Q.F.B. J. OSCAR MORENO GONZALEZ

Q.F.B. VICTOR BECERRA LOPEZ

Q.F.B. PATRICIA PARRA CERVANTES

A MIS PADRES

BASILIDES RIOS ROJAS

SARA DE JESUS SORIANO DURAN

QUE ME HAN BRINDADO DOS COSAS INVALUABLES MI EDUCACION PROFESIONAL Y CARIÑO, GRACIAS POR TODO. CON CARIÑO ADMIRACION Y RESPETO.

A SAMUEL

DE QUIEN HE RECIBIDO TODO SU APOYO Y TODO EL AMOR EN LOS MOMENTOS QUE MAS LO HE NECESITADO. CON TODO MI AMOR GRACIAS.

A MIS HERMANOS

BLANCA, SARA, ALFREDO Y ALBERTO POR ESTAR PRESENTES CUANDO LOS NECESITO Y ALENTARME SIEMPRE. LOS QUIERO MUCHO.

A ISAURA

GRACIAS POR TODO EL APOYO Y AMISTAD QUE ME BRINDASTE PORQUE MAS QUE UNA ASESORA DE TESIS ENCONTRE UNA AMIGA.

CON MUCHO CARIÑO Y AGRADECIMIENTO.

A MIS AMIGOS

MIGUEL, SORAIDA Y ENRIQUE CON QUIENES HE COMPARTIDO MUCHOS MOMENTOS IMPORTANTES Y CON QUIENES TENGO UNA HERMOSA AMISTAD.

A MANUEL Y GERARDO.

POR SU COMPRESION Y AYUDA QUE ME BRINDARON PARA FACILITAR LA CONCLUSION DE ESTA META. GRACIAS.

**IDENTIFICACION DE *Salmonella sp.* POR CROMATOGRAFIA GAS LIQUIDO
MEDIANTE EL ANALISIS DE LOS ESTERES METILICOS DE SUS ACIDOS
GRASOS CELULARES.**

TABLA DE CONTENIDO

1. Resumen.	1
2. Introducción.	2
3 Fundamentación teórica.	
3.1 Antecedentes de identificación de bacterias por cromatografía de gases	4
3.2.Generalidades sobre cromatografía de gases.	6
3.3.Lípidos en bacterias.	9
3.4 Ácidos grasos constituyentes de la célula bacteriana.	9
3.5.Propiedades químicas de los ácidos grasos	11
3.6. Importancia en el tratamiento de aguas de <i>Salmonella sp.</i>	12
3 7. Características del género <i>Salmonella</i> .	14
3.7.1 Generalidades.	
3.7 2.Cuadro clínico, y epidemiología de salmonelosis.	
3 7.3 Determinantes de patogenicidad y cuadro clínico.	
3.7.4. Estructura, características coloniales y bioquímicas.	
4. Planteamiento del problema	19
5 Objetivos.	21
6 Hipótesis.	22
7. Metodología.	23
7 1. Material	
7 2. Método	
7 2.1 Aislamiento de <i>Salmonella sp.</i> a partir de aguas residuales crudas	
7 2 2. Preparación de cultivos puros de las cepas aisladas.	
7.2.3 Identificación por sistema miniaturizado API 20 E	
7 2 4. Cosecha de la bacteria.	
7 2 5. Esterificación y extracción de los ácidos grasos celulares.	
7.2.6 Análisis cromatográfico de los ésteres metílicos.	
7 2.7. Análisis estadístico.	
8.Resultados	32
9.Discusión de resultados.	64
10. Conclusiones	68
11.Propuestas.	69
12. Anexos	70
13. Bibliografía	71

1. RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue determinar el perfil cromatográfico de los ésteres metílicos obtenidos de los ácidos grasos celulares de la membrana de *Salmonella typhi*, por cromatografía gas-líquido con el fin de establecer un criterio quimiotaxonomico adaptando las condiciones necesarias para utilizar esta técnica como método de rutina para la identificación rápida de este microorganismo en aguas residuales crudas.

La metodología utilizada consistió en: aislamiento de *Salmonella sp* a partir de muestras de aguas crudas residuales provenientes del Gran Canal de la Ciudad de México, obtención de la biomasa a partir de una cepa pura, tanto para los aislamientos obtenidos, como para la cepa (ATCC 0779) de *Salmonella typhi* proveniente del Instituto Politécnico Nacional; esterificación y extracción de los ácidos grasos celulares, análisis por cromatografía gas-líquido de los ésteres metílicos obtenidos, identificación de los mismos en base a un estándar comercial de la familia *Enterobacteriaceae* analizado bajo las mismas condiciones.

Salmonella typhi cepa ATCC 0779 presentó la siguiente constitución de 11 ésteres metílicos provenientes de su respectivo ácido graso, distribuidos por orden de elución, el cual va en orden creciente tanto de su peso molecular como del número de átomos de carbono: C 11:0, C 12:0, C 14:0, C i-15:0, C 15:0, C 2-OH 14:0, C 3-OH 14:0, C 16:1^o, C 16:0, C 17:0^v, C 18:1^o, con los siguientes nombres: metil undecanoato, metil dodecanoato, metil tetradecanoato, metil 13-metiltetradecanoato, metil pentadecanoato, metil 2-hidroxitetradecanoato, metil 3-hidroxitetradecanoato, metil cis-9-hexadecenoato, metil hexadecanoato, metil cis-9,10-metilenhexadecenoato, y metil cis-9-octadecenoato. Las cepas aisladas de *Salmonella sp* presentaron el mismo perfil cromatográfico que el obtenido para *Salmonella typhi* por lo cual esta técnica resultó adecuada para identificar a dicho microorganismo en aguas residuales crudas.

2. INTRODUCCION

La identificación de microorganismos es uno de los problemas más complejos de la microbiología moderna, esta se basa en el análisis de características morfológicas, fisiológicas y de cultivo. En la mayoría de los grupos, la identificación se basa en las características más fácilmente observables y en las bacterias este criterio no es del todo satisfactorio. El estudio de una sola característica no es una base suficiente para clasificar o identificar a un organismo. En la actualidad la taxonomía de bacterias se basa en atributos funcionales; en la práctica se ha demostrado que los métodos en la identificación bacteriana proveen una amplia información que en ocasiones por razones técnicas y de tiempo no es utilizada totalmente, además de implicar mayor trabajo en laboratorio, con más consumo de tiempo en su proceso, sobre todo en áreas donde el acortar tiempo es importante como en la clínica, ingeniería sanitaria, calidad del agua, veterinaria e industria alimenticia. Para conocer con precisión las características bioquímicas de una determinada especie es necesario probar numerosas cepas y las reacciones de tal especie a cualquier prueba deben expresarse en forma de porcentajes. (45)

Para la identificación precisa deben utilizarse pruebas de tipificación serológica, fagotipificación y algunas otras determinaciones como el contenido de bases del ADN, hibridación, electroforesis de proteínas y diferencias en la microestructura celular. (20, 29)

En los años recientes se ha hecho un esfuerzo para acelerar y simplificar la identificación introduciendo varios métodos por micropruebas bioquímicas, tales como el sistema comercial API, que permite una automatización parcial de los procesos. En la aplicación de métodos por computadora, la identificación aún permanece muy complicada pues está basada en el mismo principio: la investigación de las propiedades bioquímicas de los microorganismos.

Es por ello que varios autores tratan de encontrar una solución reemplazándolos por un método simple que provea al menos la misma cantidad de información, llevando así la identificación hacia otros principios y buscando características o rasgos, principalmente en la composición química de los microorganismos, por lo que algunos autores centraron su atención en esta composición realizando un análisis cuantitativo y cualitativo.

Lo anterior se basa en el desarrollo de nuevos y avanzados métodos químicos de análisis de separación especialmente por cromatografía de líquidos y de gases con espectrometría de masas; electroforesis y espectroscopia de infrarrojo, el desarrollo de la instrumentación y automatización del proceso analítico hace una perfecta separación de los posibles componentes de la muestra analizada con una mínima demanda de tiempo así como de su expresión cuantitativa. La aplicación práctica de estos métodos en el campo de la taxonomía se denomina quimiotaxonomía. (24, 30, 33, 36)

La quimiotaxonomía con el uso del análisis de los lípidos en bacterias propone una alternativa: menos tiempo, métodos más sencillos y mayor exactitud. (25, 33)

Es así como surge la Cromatografía de gases como medio para realizar una clasificación quimiotaxonómica de los microorganismos. Se han realizado diversos estudios quimiotaxonómicos de diferentes microorganismos, principalmente de la familia *Enterobacteriaceae*, así como de otras familias como *Pseudomonadaceae*, y algunas levaduras. Los estudios que se han realizado son: análisis de proteínas, polisacáridos, aminoácidos y en especial de los ácidos grasos celulares.

En el caso particular de salud pública y contaminación de aguas, la detección e identificación de bacterias de manera rápida y eficaz es uno de los mayores problemas a los cuales se enfrenta la microbiología en nuestro país. Uno de los puntos principales en el análisis de agua es el examen bacteriológico en el cual se enfatiza, aparte del número de bacterias, la presencia del grupo coliforme que es prueba de contaminación fecal, y por lo tanto de la posible presencia de patógenos intestinales que causan la fiebre tifoidea, las fiebres paratíficas, el cólera y disentería. Debido a que las técnicas para la detección y aislamiento de estas bacterias es difícil e implica un tiempo mayor que se traduce en un aumento de costos, se hace necesario acelerar los procesos de identificación de los microorganismos que afectan directamente al hombre y su ambiente. (32)

La literatura abunda en descripciones de brotes de *Salmonella* transportada en alimentos y agua contaminada, siendo la fiebre tifoidea, la disentería y el cólera las enfermedades más comunes transmitidas por estos medios. La fiebre tifoidea y la salmonelosis no tífica son declarables a los laboratorios de salud pública. La incidencia de salmonelosis ha cambiado desde la mitad de este siglo; la salmonelosis no tífica ha aumentado considerablemente reflejando la mala manipulación de agua y alimentos. Los serotipos de *Salmonella* altamente adaptados al hombre son: *Salmonella typhi*, *S. paratyphi*, y *S. sendai*, no tienen ningún reservorio conocido aparte del humano. (22)

En México las enfermedades gastrointestinales ocupan un lugar importante en la estadística sanitaria. Entre los principales agentes etiológicos causantes de estas enfermedades se encuentran diversos microorganismos, principalmente las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, como *Salmonella sp* y *Shigella sp* (18). En estos casos el agua esta considerada como uno de las principales rutas de transmisión de estos microorganismos (10). De aquí nace la necesidad de buscar nuevos métodos más rápidos y eficaces para determinar en un menor tiempo y con mayor precisión la identidad de algún microorganismo, en este caso *Salmonella typhi*.

El objetivo principal del presente trabajo fue implementar una técnica alternativa para identificar a dicho microorganismo por cromatografía gas-líquido de manera rápida sencilla y eficaz en aguas residuales crudas. Se obtuvo un perfil cromatográfico de once ésteres metílicos característicos que permitió identificar a las cepas aisladas e identificadas por el método tradicional de API 20 E como *Salmonella sp* como *Salmonada typhu* por lo cual esta técnica es adecuada para aplicarse en la identificación de dicho microorganismo en aguas residuales crudas.

3. FUNDAMENTACION TEORICA.

3.1 Antecedentes de identificación de bacterias por Cromatografía de Gases.

La quimiotaxonomía con el uso del análisis de los lípidos en bacterias propone una alternativa: menos tiempo, métodos más sencillos y mayor exactitud con la utilización de nuevas técnicas, como la técnica de cromatografía de gases que reúne tales características.

Esta técnica consiste en identificar enterobacterias por cromatografía gas-líquido mediante los constituyentes de las células bacterianas, específicamente el contenido de ácidos grasos, para lo cual es necesario formar un banco de datos, donde se obtengan los perfiles cromatográficos de las principales especies de esta familia, para que después se puedan identificar muestras comparando los perfiles. (62)

La bacteriología se ha desarrollado como una disciplina científica, que sirve principalmente a propósitos epidemiológicos y médicos, sin embargo en los últimos años se ha puesto especial atención a los aspectos ecológico-ambientales y esto ha hecho necesario agilizar los procesos de identificación de microorganismos que de alguna manera afectan al hombre y su ambiente. Los procesos de identificación, tradicionalmente se han apoyado en las respuestas bioquímicas de cada microorganismo que presenta un sólo tipo de respuesta, positiva o negativa. (35)

Entre los primeros trabajos con aplicación microbiológica, en los que se utilizó la Cromatografía de gases, está el reportado por James y Martín 1956 (37), quienes trabajaron en la separación e identificación de ésteres metílicos de ácidos saturados e insaturados por cromatografía gas-líquido para determinar ácidos grasos bacterianos, al esterificar un extracto de *Pseudomonas aeruginosa*. En noviembre del mismo año elaboraron un aparato muy sensible para la detección de vapores de sustancias a separar, utilizando Cromatografía gas-líquido (38).

Abel (1) y colaboradores en 1963 sugirieron la clasificación de especies de la familia *Enterobacteriaceae* por medio del análisis de Cromatografía gas-líquido. En 1962 Kaneda (43) efectuó el aislamiento e identificación de los ácidos grasos provenientes de *Bacillus subtilis* y en 1967 (44) analizó la producción de ácidos grasos en especies del género *Bacillus* por Cromatografía gas-líquido. Para 1968 (16) Cecchini y O'Brien contribuyeron en la diferenciación de *Escherichia coli* con otras bacterias utilizando cromatografía de gases. Brooks *et al* en 1969 (11) diferenciaron *Clostridium sordelli* y *Clostridium bifermentans* por cromatografía de gases, y en 1971 (12) analizaron los ácidos grasos provenientes de extractos de especies de *Neisseria* por cromatografía de gases.

En 1971 Kaneda (44) estudió los factores que afectan la concentración de ácidos grasos en *Bacillus cereus*, como son la temperatura y el medio de cultivo utilizado. En 1972 (3) Amstein y Hartman diferenciaron algunos enterococos usando la técnica de cromatografía de gases.

En un intento para demarcar la taxonomía de la familia *Enterobacteriaceae*, Gehrke y Goerlits en 1963 (28), Brian y Gardner en 1967 (9), Boe en 1980 (6), Häusler en 1983 (33) y Veys en 1989 (71) utilizaron la cromatografía de gases para identificar y esclarecer la posición taxonómica de diversos géneros y especies de enterobacterias.

En 1975 Moss et al (54) realizaron un estudio para la identificación de microorganismos con el análisis de ácidos grasos celulares por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas. Posteriormente Holmes y Willcox (36) en 1978 contribuyeron al estudio e identificación de la familia *Enterobacteriaceae* por el sistema de identificación bioquímica comercial para enterobacterias API 20 E. Más tarde, Moss (55) reportó en 1980 el uso de cromatografía de gases para el análisis de los ácidos grasos de *Propionibacterium acnes* y *Propionibacterium shermanii*. En el año de 1982 (56) Moss y Montiel reportaron el análisis de ácidos grasos de cadenas cortas en *Clostridium difficile* por medio de cromatografía gas-líquido con una columna capilar de sílice fundido. En el mismo año Moss y Shiroda determinan la composición de ácidos grasos celulares de levaduras por cromatografía gas-líquido(58)

Bousfield et al en 1983 (8) elaboraron un análisis numérico del total de los perfiles de los ácidos grasos para la identificación de coryneformes, nocardioformes y algunas otras bacterias.

Lambert et al en 1983 (47) realizó la diferenciación de 10 especies de *Vibrio*, dos de *Aeromonas*, tres de *Photobacterium*; así como de *E. coli*; mediante el análisis de sus ácidos grasos celulares por una columna capilar en cromatografía gas-líquido.

Häusler y Richter realizaron la identificación de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* por cromatografía de gases, en 1985 (35). En 1986 Rasoamanjara et al (61), caracterizaron especies de *Flavobacterium* por el análisis de los ácidos grasos. Vershulst et al en 1987 (70) realizaron un análisis sistemático de los ácidos grasos celulares de cadena larga de *Eubacterium lentum*, así como Veysel et al realiza la identificación de bacterias no fermentadoras Gram negativas en muestras clínicas utilizando cromatografía gas-líquido.

En 1988 Moss realiza la caracterización química de varias especies de *Moraxella* y *Acinetobacter* (53). En el mismo año Monteoliva (57) realizó un estudio sobre la composición de ácidos grasos celulares de *Deleya halophila* y el efecto que provoca la temperatura y la concentración de sales en su crecimiento. En 1988 Eerola et al (27) estudiaron por medio de cromatografía de gases el procedimiento para la identificación de bacterias aisladas en clínica. En 1989 Johnson et al (41) desarrollaron un método específico de identificación de *Clostridium difficile* por cromatografía gas-líquido.

Brondz *et al* (13) en 1989 realizaron una evaluación de los ácidos grasos de levaduras por cromatografía de gases, como una alternativa a los métodos quimiotaxonomicos usuales. En 1990 Ahmad *et al* (2) elaboraron un árbol filogenético de un grupo de enterobacterias aplicando la biosíntesis de aminoácidos aromáticos, por otra parte Matsuyama en el mismo año estudia los niveles de glucolípidos y la producción de ácidos grasos en *Serratia rubidea*. Okuyama *et al* (59) analizaron los ácidos grasos trans-insaturados en bacterias psicrófilas, *Vibrio sp* cepa ABE-1. Finalmente, Urdaci *et al* (69) determina la composición de los ácidos grasos celulares de *Aeromonas* a través de cromatografía gas-líquido usando una columna capilar.

En la última década Bousfield, Cookson, Kaneda y Moss (8,21,43, 54) han definido las diferencias más importantes entre las bacterias Gram positivas y las Gram negativas. Las segundas presentan ácidos oléicos, palmíticos, y palmitoléicos, mientras que para las primeras aún no se han identificado varios ésteres metílicos.

3.2. Generalidades sobre Cromatografía de gases.

La cromatografía es una técnica desarrollada a principios de siglo, que permite la separación de sustancias que se encuentran en una mezcla. En general, la cromatografía es un proceso de migración diferencial en el cual los componentes de una mezcla son transportados por una fase móvil, gas o líquido y retenidos selectivamente, por una fase estacionaria que puede ser un líquido o un sólido.(23)

La cromatografía de gases ha sido hasta la fecha un invaluable auxiliar en muchos campos de la investigación científica. Dentro del campo tan amplio de la aplicación que tiene dicha técnica, se han incrementado de un tiempo a la fecha las investigaciones sobre los constituyentes de las células bacterianas específicamente en el contenido de los ácidos grasos, obteniendo con esto un avance en los aspectos taxonómicos, tomando en cuenta que cada día se requieren estudios más rápidos y precisos. (34, 61)

En la cromatografía de gases, la fase móvil es un gas y la estacionaria es un sólido (cromatografía gas-sólido) o un líquido (cromatografía gas-líquido). En la primera, el proceso de separación se lleva a cabo por adsorción entre el gas que transporta el soluto y el soporte, que puede ser alúmina, sílica gel, carbón, etc. y en la segunda, la partición se lleva a cabo entre una fase estacionaria líquida que cubre a un sólido inerte, como sílica o vidrio, y el gas que transporta el soluto. Cuando se introduce una sustancia en la corriente del gas, se volatiliza por la elevada temperatura y de esta manera es transportada por el gas acarreador en la columna donde se distribuye entre las fases sólida y líquida.(30, 4)

Las partes integrantes de un cromatógrafo de gases son:

1. Gas acarreador: generalmente está disponible en cilindros que tienen una válvula para regular la presión del gas, el cual es conducido hacia un medidor, que permite

el control adecuado de la velocidad de flujo del gas requerida para el análisis de una mezcla en particular. Los gases más utilizados son: Helio, Nitrógeno y Argón.

2. **Inyector:** es un dispositivo por el cual se introduce la muestra a la columna, la puerta de inyección se calienta a una temperatura lo suficientemente alta para conseguir una vaporización rápida de la mezcla sin causar degradación térmica. Las muestras se inyectan con una jeringa a través de un sello de hule o silicon que se encuentra en la puerta de inyección.
3. **Horno:** tiene como función elevar la temperatura de la columna para los cual cuenta con un material aislante y materiales necesarios para llevar acabo su calentamiento. El calentamiento es gradual y es programado según las necesidades del análisis
4. **Columna:** las columnas utilizadas en cromatografía de gases son básicamente de dos tipos: 1) columnas empacadas en las cuales influye la manera en como se ha llevado acabo el empaque en el movimiento relativo de los solutos a través del sistema. Las columnas pueden ser de vidrio a menos que se especifique otra cosa, se utilizan de varias dimensiones pero normalmente son de 0.6 m a 1.8 m de longitud y de 2 mm a 4 mm de diámetro interno. Los materiales utilizados como soporte deben ser totalmente inertes al sistema, se encuentran disponibles en varios tamaños de partícula entre los más usados se encuentran los de malla 80 a 100; 2) las columnas capilares están constituidas por un tubo metálico muy largo (0.01 a 0.02 pies) y son de diámetro pequeño (0.01 a 0.02 pulgadas) en donde la fase líquida se deposita en forma de película delgada (0.5 a 1 μ) en las paredes interiores de la columna, el gas de arrastre tiene un camino libre sin restricciones requiriendo alrededor de 20 psi para un flujo adecuado, por lo que poseen un coeficiente K elevado mejor que el de las empacadas. Se han diseñado columnas poseen todavía una mejor eficiencia que son las denominadas Scott.
5. **Detector:** cuando los componentes salen individualmente a través de la columna pasan a través del detector que emite una señal proporcional a la concentración del soluto en el gas transportador cuando éste sale de la columna. La temperatura del detector debe controlarse para prevenir la condensación. Los detectores más comúnmente utilizados son: el de conductividad térmica, ionización de flama (FID), ionización de flama alcalina y captura de electrones (ECD). La elección dependerá del análisis a realizar Para ésteres metílicos se utiliza el FID que se caracteriza por ser sensible a todos los compuestos orgánicos, insensible al agua y a gases inorgánicos, se basa en que la conductividad eléctrica de un gas es directamente proporcional ala concentración de las partículas cargadas del mismo, produciendo una corriente que pasa a través de una resistencia.
6. **Registrador:** las señales del detector pasan a través de un amplificador o electrómetro que está conectado a un aparato automático que gráfica la señal, de manera que cada producto aparecc como un pico a cada determinado tiempo La gráfica resultante es cromatograma, que se emplea para determinar la identidad o

concentración del componente, siempre y cuando se ocupe un estándar analizado bajo las mismas condiciones.

A la gráfica obtenida se le llama **cromatograma**, y los parámetros registrados son **tiempo** en las abscisas y **milivolts** en las ordenadas, el área bajo la curva de cada pico es proporcional a la masa total del componente. Debido a que la cromatografía de gases es principalmente un método de separación, no puede usarse para identificar compuestos sin comparar con una sustancia de referencia. (66)

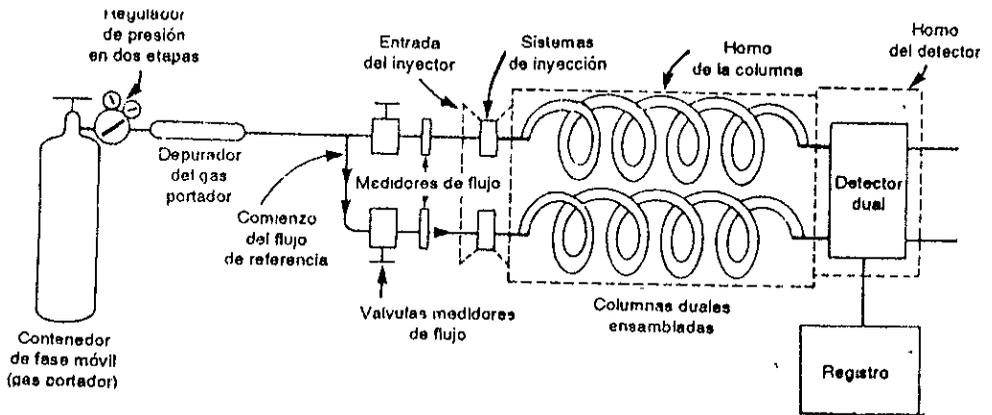


Fig. 1. Diagrama de un sistema cromatográfico.

El parámetro utilizado para determinar la elución de un compuesto es el tiempo de retención absoluto (TRA), bajo condiciones constantes de presión, flujo y temperatura, tomando en cuenta que el flujo es lineal con respecto al tiempo. Este tiempo de retención es característico de la muestra, además este parámetro se usa para la identificación de la muestra problema. (30)

La identificación se basa en una comparación de los tiempos de retención del componente desconocido con los datos obtenidos de un compuesto estándar, analizado bajo las mismas condiciones (51); los datos de los tiempos de retención de las sustancias se observan fácilmente en el cromatograma al no verse traslapados los picos obtenidos, permitiendo el uso de estos datos para alguna sustancia específica. Por esto la identificación de microorganismos por CGL requiere de especies tipificadas o cepas tipo, con el propósito de hacer comparaciones. (25)

3.3. Lípidos en bacterias.

De primordial importancia es el análisis de los polisacáridos, los aminoácidos y en especial los diferentes lípidos; en las dos últimas décadas se ha abordado el problema de determinar ácidos grasos utilizando la técnica de cromatografía de gases con muy buenos resultados, encontrándose como ventajas particulares, el reducir el tiempo del proceso total, además de minimizar el error humano, así como ampliar la información con respecto a las pruebas bioquímicas tradicionales en una sola operación, lo cual conlleva a la identificación en condiciones muy objetivas. (37)

La composición química de las bacterias es semejante a la de otros microorganismos; el 90% de agua y el 10% de peso seco, este último integrado por ADN, ARN, proteínas, polisacáridos, lípidos y fosfolípidos (14).

Los lípidos son una clase de constituyentes celulares insolubles en agua y solubles en disolventes no polares, tales como éter, cloroformo y benceno (5). Se han subdividido en lípidos complejos, que se caracterizan porque contienen ácidos grasos como componentes, comprenden a los acilglicéridos, los fosfoglicéridos, los esfingolípidos y las ceras, que difieren en la estructura de los esqueletos a los que se hallan unidos, por covalencia, los ácidos grasos. Reciben, también, el nombre de lípidos saponificables porque producen jabones por hidrólisis alcalina. El otro grupo son los lípidos sencillos, que no contienen ácidos grasos y no son saponificables. (48)

Los lípidos y sus ácidos grasos celulares se encuentran en todos los microorganismos, excepto cierto tipo de virus, este tipo de compuestos bioquímicos presentes en bacterias han sido estudiados por cromatografía de gas-líquido, más que cualquier otro tipo de componente bioquímico. (23, 27, 54)

La membrana es el principal sitio de constituyentes lipídicos, el 95 % de fosfolípidos están en la membrana, el otro 5 % en la fracción protoplasmática, ambos de composición química idéntica. Moss et al en 1988 (57) descubren que las Gram negativas poseen un alto grado de uniformidad, ya que 14 de 16 especies poseen cadenas lineales saturadas de 16 carbonos, mientras que las Gram positivas exhiben variación en su composición.

3.4. Ácidos grasos constituyentes de la célula bacteriana.

El contenido total de ácidos grasos de la mayoría de las especies de bacterias se encuentran distribuidos en la pared celular, membrana plasmática e inclusiones citoplásmicas. (61)

Incluyendo todos los lípidos, estos son mucho más abundantes en la pared de las células Gram negativas que en la de las Gram positivas (22). Las bacterias no acumulan

lípidos como material de reserva, sin embargo contienen cantidades considerables de ellos como constituyentes de sus sistemas membranosos. (28, 31)

Los ácidos grasos se sintetizan por separado y luego son esterificados para formar lípidos más complejos. Se han encontrado muchas clases de ácidos grasos en las bacterias: los que contienen un número diferente de átomos de carbono; son de cadena recta o de cadena ramificada; pueden tener o no dobles enlaces; pueden contener o no grupos -OH; y anillos de ciclopropano. (64)

Los ácidos grasos de las bacterias pueden ser saturados o no saturados, o tener uno o más dobles enlaces, y el precursor de dichos ácidos grasos es la Acetil Coenzima A. (23)

Los ácidos grasos saturados iso y anteiso se encuentran en las bacterias Gram positivas. Las Gram negativas contienen cadenas lineales de ácidos grasos con una doble ligadura. Esta característica se utiliza como guía para la clasificación taxonómica de bacterias. Los ácidos grasos no saturados iso y anteiso son aún raros en la naturaleza(60). La determinación de la posición de la doble ligadura en estos ácidos grasos se considera importante en aspectos de biosíntesis, incrementando así su valor para clasificaciones taxonómicas (7). La ausencia de ácidos con cadenas ramificadas da la característica de bacterias Gram negativas, mientras que las Gram positivas se caracterizan por ácidos con cadenas ramificadas, especialmente por ácidos grasos de cadena lineal saturada de 15 carbonos (42). La biosíntesis se lleva a cabo por un procedimiento que difiere significativamente del proceso opuesto a la oxidación de ácidos grasos y tal vez la diferencia más inesperada estriba en que el dióxido de carbono (CO_2) es esencial para la síntesis de ácidos grasos en extractos celulares. (48)

La composición de ácidos grasos presente en los fosfolípidos juega un papel importante en la membrana de los microorganismos ya que determina la extensión de los fluidos en la membrana. Este fluido es necesario para funciones relacionadas con la membrana en procesos metabólicos. (7)

Actualmente diversos trabajos, discuten la variación en los valores de los ácidos grasos, como producto de los cambios que ocurren en los parámetros experimentales (45). Los perfiles cromatográficos pueden variar con cambios asociados a la edad del cultivo (56), sustrato utilizado (15), temperatura de incubación (64), dilución usada en los cultivos (15), aereación (26), concentración de micronutrientes (52), vitaminas y pH (33).

Los ácidos grasos se analizan debido a que representan un medio rápido para la identificación de bacterias con fines taxonómicos, aunque también se han analizado en relación a estudios metabólicos (31). Sin embargo los ácidos grasos no se pueden analizar cromatográficamente como tales, por lo tanto es necesario obtener un derivado de estos, para ello es necesario revisar algunas de sus propiedades químicas.

3.5. Propiedades químicas.

Los ácidos grasos son compuestos de cadena recta con tres a dieciocho carbonos. Existen ácidos grasos saturados y no saturados con uno o más dobles enlaces por molécula, siendo los más importantes el ácido oleico, linoleico y linolénico. (5, 67)

Las cadenas de ácidos grasos saturados se hallan extendidas linealmente, en zigzag debido a los ángulos de enlace tetraédricos.

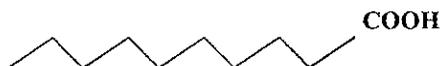


Fig. 2. Cadena extendida de un ácido graso saturado

Los ácidos grasos libres existen en proporción limitada en la célula, la mayoría de ellos se encuentran como ésteres triacil glicérol y fosfolípidos. (50)

La unión éster es susceptible tanto a la hidrólisis ácida como a la alcalina. La hidrólisis ácida difiere de la alcalina en que la primera es reversible mientras que la segunda es irreversible. El último paso de la hidrólisis alcalina es irreversible debido a que, en presencia de un exceso de álcali, el ácido existe como un anión totalmente disociado que no presenta tendencia a reaccionar con los alcoholes.

En la hidrólisis ácida, el sistema es esencialmente reversible en todas sus fases alcanzándose un equilibrio en vez de consumirse los reactivos. Así las bases fuertes se utilizan en la saponificación para hidrolizar las uniones éster de los lípidos simples y complejos. (48,5)

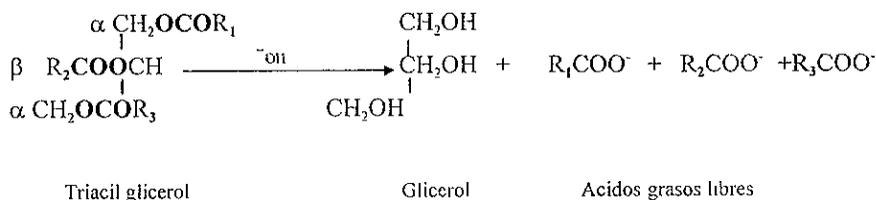


Fig. 3. Reacción de saponificación de un triacil glicérol

Una vez obtenidos los ácidos grasos libres se procede a formar el éster correspondiente, aprovechando las propiedades del ácido carboxílico, como se muestra en la siguiente reacción:

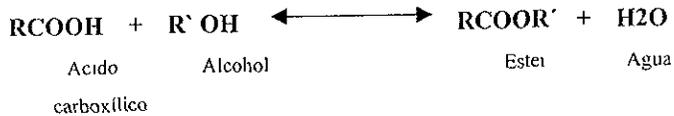


Fig. 4. Formación de ésteres

La reacción para efectuar la esterificación es un ejemplo importante de sustitución nucleofílica, en donde los ácidos grasos reaccionan con el alcohol metílico (CH₃OH) o con una molécula semejante a éste, en este caso se pretende obtener ésteres metílicos para lo cual se utiliza el alcohol metílico necesario también para la metilación del ácido graso o ácidos grasos.(28, 29)

Los principales ácidos grasos que se han aislado hasta el momento en bacterias y de los cuales se han obtenido sus ésteres metílicos son: undecanoico, dodecanoico, tetradecanoico, 13-metiltetradecanoico, pentadecanoico, 3-hidroxitetradecanoico, cis-9-hexadecanoico, hexadecanoico, heptadecanoico, 2-hidroxidecanoico, trans-9-octadecanoico, cis-11-octadecanoico, octadecanoico, nonadecanoico, y cis-vaccenato.(67)

3.6. Salmonella sp y su importancia en el tratamiento de aguas.

El abastecimiento de agua para uso y consumo humano con calidad de agua adecuada es fundamental para prevenir y evitar la transmisión de enfermedades gastrointestinales entre otras, por lo que se requiere establecer límites permisibles en cuanto a sus características bacteriológicas, físicas, organolépticas, químicas y radioactivas. Con el fin de asegurar y preservar la calidad del agua en los sistemas se debe de someter a tratamientos de potabilización hasta la entrega al consumidor.

La Norma Oficial Mexicana (NOM-127-SSA-1994) establece los límites permisibles de calidad y los tratamientos de potabilización del agua para uso y consumo humano, que deben cumplir los sistemas de abastecimiento públicos y privados o cualquier persona física o moral que la distribuya en todo el territorio nacional.

El agua para consumo humano es aquella que no contiene contaminantes objetables, ya sean químicos o agentes infecciosos que causen efectos nocivos al ser humano. Las características bacteriológicas son aquellas debidas a microorganismos nocivos a la salud humana. Para efectos de control sanitario se determina el contenido de

indicadores microbiológicos, específicamente organismos coliformes totales y organismos coliformes fecales; el contenido de estos organismos debe ajustarse a los límites establecidos que son: 2NMP/100 mL o 2UFC/100mL y no detectable NMP/100 mL o cero UFC/100 mL respectivamente.

La potabilización del agua proveniente de una fuente en particular, debe fundamentarse en estudios de calidad y pruebas de tratabilidad a nivel de laboratorio para asegurar su efectividad. Se deben aplicar tratamientos específicos siguientes o los que resulten a las pruebas de tratabilidad, cuando los contaminantes biológicos, las características físicas y los constituyentes químicos del agua excedan los límites permisibles en la NOM.

El tratamiento que se efectúa a las aguas para que sean de nuevo potables desde el punto de vista bacteriológico no tiene por objeto destruir todos los organismos vivos en el agua, pero sí garantizar la ausencia de gérmenes infecciosos y suprimir el riesgo de contaminación de un punto de agua o de un sistema de distribución que haya sufrido los efectos de una contaminación. La gama de medios disponibles para realizar esta operación es bastante extensa, va desde las técnicas químicas que utilizan reactivos oxidantes (cloro, bromo, ozono la floculación a pH elevado (aguas residuales), hasta los medios físicos (radiaciones ultravioleta o ionizantes), son los procedimientos químicos, particularmente el del cloro, los que se utilizan frecuentemente, pues proporcionan una seguridad satisfactoria y además se pueden llevar en la práctica con gran facilidad. (20, 62)

Las enfermedades transmitidas por agua (hidrotransmitidas) en países como México no han podido ser erradicadas, debido, en gran parte a la gran variedad de microorganismos que pueden ser transmitidos por el agua. El control de estas enfermedades es altamente dependiente de la educación a todos los niveles y el manejo apropiado de tratamiento, monitoreo y distribución del agua. En lo que se refiere al monitoreo de la calidad bacteriológica del agua se ha propuesto cuantificar la presencia de organismos indicadores es decir, el predecir la presencia de un organismo específico o de un grupo de patógenos. La presencia de estos indicadores está relacionada con el riesgo de infección de una población. Los estándares para el monitoreo de la calidad del agua actualmente en uso incluyen el conteo de coliformes totales, fecales, termotolerantes y *Escherichia coli*. Estos indicadores fueron desarrollados a principios del siglo XX, sin embargo se ha demostrado que *Vibrio cholerae*, *Salmonella sp*, *Shigella sp* y *Campylobacter jejuni* han producido epidemias. Actualmente se ha sugerido el uso de *Salmonella sp* como indicador de la calidad bacteriológica del agua.(62)

La fiebre tifoidea es una de las enfermedades febriles infecto contagiosas más comunes en México, esta enfermedad es producida por *Salmonella typhi*; este fenómeno se encuentra directamente relacionado con deficiencias en el saneamiento ambiental y en el aprovisionamiento del agua potable así como en el tiempo que requiere la detección de este microorganismo. (10)

3.7. Características del género *Salmonella*.

3.7.1. Generalidades.

Las salmonelas figuran entre las bacterias patógenas de más amplia distribución en la naturaleza. Se encuentran más comúnmente en aves de corral, en animales domésticos y roedores, artrópodos y animales salvajes, aves y reptiles. El hábitat acostumbrado del género es el tracto gastrointestinal de huéspedes animales y humanos. (65)

Las salmonelas de origen animal pueden producir esencialmente las mismas enfermedades clínicas humanas que las bacterias de origen humano, los mismos serotipos pueden existir en origen en infecciones humanas y animales. Las personas que contraen infecciones por *Salmonella* reaccionan en forma diferente según varios factores de los cuales los más importantes son la edad, el estado de salud del enfermo y en menor grado la cepa del microorganismo.

Dentro del género *Salmonella* existen tipos adaptados a huéspedes humanos o de ciertas especies inferiores y con algunas excepciones estas formas existen únicamente en sus huéspedes específicos como *Salmonella typhi*, *S. paratyphi A, C* y *S. sendai*, más o menos estrictamente adaptadas al hombre. La gran mayoría de tipos (más de 1500), no muestran especificidad de huéspedes y en ocasiones pueden producir enfermedad en cualquier animal de sangre caliente.

La ubicuidad de *Salmonella* plantea un importante problema de salud pública. La literatura abunda en descripciones de brotes de *Salmonella* transportada en alimentos, como leche en polvo, cremas, productos cárnicos, pescados y por contacto con animales. (14)

Los serotipos de *Salmonella* altamente adaptados al hombre son: *S. typhi*, *S. paratyphi A, B*, y *C*, *Salmonella sendai*, no tienen ningún reservorio conocido aparte del humano. *S. pullorum*, *S. gallinarum* afectan a las aves, *S. dublin* al ganado, *S. abursequi* al ganado y *S. choleraesuis* al cerdo. (22)

3.7.2. Cuadro clínico y epidemiología de salmonelosis.

Las salmonelas viven en los tejidos de los reptiles, aves, mamíferos y seres humanos, son éstas las fuentes de todas las infecciones por *Salmonella*. La infección se debe a la ingestión de alimento, agua, leche, o al consumo de tejidos animales que contienen salmonelas como por ejemplo las carnes no cocidas. La contaminación puede producirse mediante las excretas de humano o animal, por moscas que transportan excretas de animales, o por contaminación accidental de sistemas de agua con desechos o un pozo por filtración de agua superficial. También puede suceder que se presente difusión por portadores convalecientes, que pueden excretar los microorganismos 1-4 meses después de su curación, y los casos subclínicos no reconocidos. Los portadores crónicos de *Salmonella typhi* son un peligro para la salud pública y constituye el principal problema de eliminación de la fiebre tifoidea. (49)

Las manifestaciones clínicas de salmonelosis se han dividido en: 1) gastroenteritis, 2) bacteremia o septicemia con o sin lesiones focales, 3) fiebre entérica con su clásico ejemplo: fiebre tifoidea y 4) el estado del portador. Todas las cepas de *Salmonella* pueden producir cualquiera de los cuatro tipos de infección clínica.

1. **Gastroenteritis:** síntomas que van desde una ligera diarrea hasta la forma fulminante de iniciación repentina y violenta, esta es la manifestación clínica más común de la infección por *Salmonella*.

2. **Septicemia:** se caracteriza por fiebre alta con picos, cultivos de sangre positiva y manifestaciones focales tempranas. Estas infecciones pueden producirse en cualquier parte del cuerpo, produciendo abscesos de las regiones pelviana y perineal.

3. **Fiebre tifoidea:** causada por *Salmonella typhi*, se caracteriza por el aumento sostenido por etapas de la temperatura que llega a los 40 °C, por la aparición de diversos puntos rosados (rash) y por alteración al sistema nervioso central; el estreñimiento es común la primera semana, acompañado de hipersensibilidad abdominal. La hemorragia intestinal es frecuente y se presenta perforación intestinal que es poco común. El estado de la persona puede ir desde una ligera tos hasta abscesos pulmonares. La fiebre empieza a ceder hasta la tercera semana. Las fiebres entéricas causadas por otras salmonelas son más benignas.

4. **Estado del portador:** es más común con *S typhi*. Muchos pacientes continúan excretando este microorganismo días después de haberse recuperado y otros lo hacen aun por años. En los portadores permanentes de *Salmonella* se encuentra que hay reproducción generalmente en la vesícula biliar; estos portadores junto con los reservorios animales constituyen un grave problema de salud pública. (65)

Epidemiología:

La fiebre tifoidea y la salmonelosis no tífica son declarables a los laboratorios de salud pública. Durante los últimos años los estudios epidemiológicos de salmonelosis han empleado no solamente serotipificación, sino también susceptibilidad a los antibióticos, fagotipado y comparación de plásmidos. La incidencia de salmonelosis ha cambiado desde la mitad de este siglo (22) La salmonelosis no tífica ha aumentado considerablemente, reflejando la mala manipulación de alimentos. así como su distribución.

3.7.3. Determinantes de patogenicidad.

Toxinas:

Ocasionalmente, la infección por *Salmonella* produce diarrea abundante, similar a la del cólera, y se ha descrito también la existencia de una enterotoxina, similar a la del cólera y a la toxina termolábil de *E Coli*. Durante la gastroenteritis, producida por *Salmonella* se proceden cambios citopáticos, atribuibles probablemente a la citotoxina asociada con la fracción de membrana externa bacteriana, aunque su estructura y su papel en la enfermedad permanecen desconocido.

El lipopolisacárido (LPS) es el determinante de virulencia de *Salmonella* que ha sido caracterizado con más precisión. El lípido A (endotoxina) puede activar los macrófagos, lo que origina fiebre, leucocitosis e hipotensión (shock). El cuadro general de la infección sistémica por *Salmonella* es atribuible fundamentalmente a la porción tóxica del LPS.

Antígenos de superficie:

Los antígenos (Ag) O específicos son importantes para la virulencia de las salmonelas al disminuir la susceptibilidad a la fagocitosis, y por su capacidad de activar la vía alternativa del complemento. En las cepas de *S. typhi* el antígeno Vi capsular también contribuye a la virulencia.

Adhesión y movilidad:

La localización de *Salmonella* en el fleón terminal sugiere que estos organismos se adhieren al epitelio intestinal. *Salmonella* sintetiza fibras normales tipo I sensibles a manosa, pero el papel de estas estructuras virulentas parece ser mínimo. Los flagelos parecen ser los factores de virulencia más importantes.

Genes plasmídicos:

La mayoría de las especies de *Salmonella* (excepto *S. typhi*) contienen un gran plásmido esencial para su virulencia. Las células que han perdido el plásmido penetran normalmente en macrófagos y en las células epiteliales pero no logran sobrevivir. (22)

3.7.4. Estructura celular, características coloniales y bioquímicas.

Estructura celular.

Las salmonelas son bacilos Gram negativos, móviles, anaerobios facultativos, tienen una envoltura celular constituida por la membrana citoplasmática, la capa peptidoglicana y la membrana externa (22). La primera se compone de fosfolípidos (primordialmente fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol, y cardiolipina) y una gran variedad de proteínas. Los flagelos están anclados en el citoplasma y atraviesan a la membrana citoplasmática. La peptidoglicana confiere rigidez y está formada por cadenas paralelas de polisacáridos constituidos por ácido n-murámico, y N- acetilglucosamina. La membrana externa está formada por proteínas, fosfolípidos y polisacárido (LPS), este último ocupa aproximadamente el 45 % de la superficie (65). La membrana actúa como barrera impidiendo la entrada de sustancias tóxicas como antibióticos y detergentes, contiene los receptores para bacteriofagos y colicinas se relaciona con los procesos de conjugación, división celular y transporte de sustancias al interior de la célula. Asociados a la membrana externa se encuentran los pili y el antígeno "Vi".

El LPS establece interacciones con las otras moléculas que forman parte de la membrana, es un complejo macromolecular representado por el antígeno O y la endotoxina de las bacterias Gram negativas, estructuralmente es un heteropolímero constituido por tres regiones: el antígeno O, el núcleo basal, y el lípido A, que se inserta en la bicapa de

fosfolípidos y le confiere su actividad de endotoxina. El antígeno O es un polisacárido constituido por unidades oligosacáridicas de repetición, entre los monosacáridos que la forman se encuentran los azúcares neutros, azúcares aminados y ácidos urónicos; la estructura de las unidades de repetición de las bacterias Gram-negativas muestran una gran diversidad incluso dentro de una misma especie bacteriana. Esta propiedad ha permitido diferenciar cepas de una misma especie. El núcleo basal es una estructura común para las enterobacterias y es similar para todas las bacterias Gram-negativas, se trata de un complejo polisacárido. El lípido A como ya se dijo le confiere su actividad de endotoxina. Está formada por un disacárido de glucosamina en unión (1'-6) tiene fosfatos o pirofosfatos en posiciones 1 y 4'; el grupo hidroxilo de disacárido de glucosamina en posición 6' está sustituido por el ácido 3-desoxi-d-manotulónico. Los grupos hidroxilo y amino están sustituidos por ácidos grasos como el β -hidroxi mirístico, laúrico, mirístico, palmítico y otros ácidos grasos. (42)

Las salmonelas se dividen en grupos según sus antígenos principales O (somáticos). Los grupos se indican con mayúsculas (A, B, C) y se subdividen (serotipos) por sus diferencias en los antígenos H (flagelares). Los antígenos O se indican con números arábigos y los antígenos H con minúsculas y números arábigos. (fig.5)

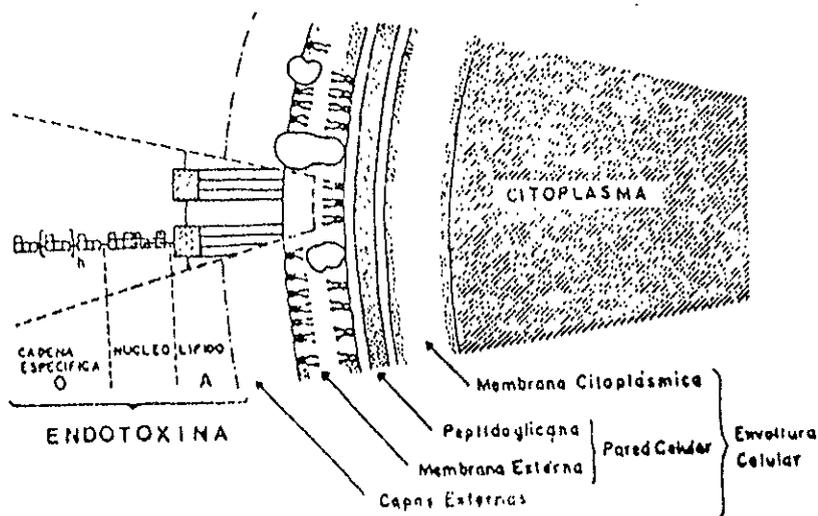


Fig. 5. Diagrama esquemático de la envoltura celular de bacterias Gram negativas.

Características coloniales.

Las salmonelas crecen bien en medios comunes de laboratorio. Para los fines de identificación es necesario utilizar medios selectivos que contengan sales biliares o desoxycolato como inhibidores. Las colonias son generalmente un poco más pequeñas y transparentes que las de microorganismos coliformes y se distinguen de estos por su morfología en medios diferenciales.

En agar Mac Conkey los bacilos de tifoidea, paratifoidea y disenteria no fermentan lactosa, estas colonias son incoloras y transparentes. En agar verde brillante las colonias típicas de *Salmonella* son ligeramente rosas a incoloras rodeadas de un color rojo de uno a dos mm de diámetro, *S. typhi* y otras especies de *Salmonella* crecen pobremente en este medio por el verde brillante, los fermentadores de lactosa producen una coloración verde pálido o bien pueden producir otras coloraciones; a veces hay que reincubar el medio si no se han observado a las 24 horas colonias sospechosas de *Salmonella*. En agar *Salmonella-Shigella* (SS) organismos que no fermentan lactosa forman colonias opacas, transparentes o tránslucidas, incoloras que generalmente son lisas. algunos tipos de *Proteus* y *Salmonella* pueden producir colonias de centro negro. En agar sulfito de bismuto (SB) después de 24 horas de incubación se observan colonias típicas de color negro con un brillo metálico y en ocasiones pueden presentar un halo; cuando existe un gran número de colonias puede producirse un crecimiento de puntos negros o grises verdosos. Algunas especies de *Salmonella* presentan coloración verde; la coloración negra también puede ser producida por otros organismos como *Proteus*. Si no se observan colonias típicas en 24 horas debe reincubarse por otras 24 horas. Este medio es especialmente efectivo para aislar cepas de *Salmonella typhi*. En agar desoxicolato xylosina-lisina las colonias de *Salmonella* producen colonias negras con centro rojo y difieren de las colonias coliformes en que estas producen colonias amarillas. El tiempo optimo de incubación es de 24 horas. (20, 22, 46)

Características bioquímicas:

Por definición las salmonelas no fermentan lactosa, sacarosa, rafinosa ni adonitol, no producen indol y no muestran actividad de ureasa en agar urea de Christensen. Además son positivas para rojo de metilo, negativas para Voges-Proskauer. Casi todas son móviles utilizan citrato y crecen en medio de acetato de sodio, decarboxilan lisina, arguina y ornitina, y producen ácido sulfhídrico, no utilizan malonato de sodio, no licuan gelatina ni desaminan fenilalanina. Las características diferenciales dentro el género *Salmonella* se muestran en el siguiente cuadro (65):

SUSTRATO	<i>Salmonella</i>	<i>S. paratyphi</i>	<i>S. typhi</i>
Gas de glucosa.	+	+	-
Lactosa	-	-	-
Sacarosa	-	-	-
Manitol	+	+	+
Salicina	-	-	-
Dulcitol	+	+	±
Lisina decarboxilasa	+	-	+
Movilidad	+	+	+
Gelatina	-	-	-
Urea	-	-	-
H ₂ S	+	-	+
Indol	-	-	-
Rojo de metilo	+	+	+
Voges-Proskauer	-	-	-
Citrato (Simmons)	+	+	-
Malonato	-	-	-

Tabla 1. Serie bioquímica para la identificación de *Salmonella*

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El incremento de la población durante los últimos años ha provocado la contaminación del medio ambiente. La contaminación del agua se debe a desechos de todo tipo: industriales, domésticos, y de agricultura, entre otros. Esto da como resultado que este recurso, que se escasea últimamente, se encuentre cada vez más contaminado, contribuyendo así en la incidencia de enfermedades transmitidas por el agua (hidrotransmitidas) tanto a nivel nacional como a nivel mundial.

En México las enfermedades gastrointestinales ocupan un lugar importante en la estadística sanitaria. Entre los principales agentes etiológicos causantes de estas enfermedades se encuentran: virus, protozoarios, y principalmente, bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* tales como: *Salmonella sp.*, *Escherichia coli*, *Shigella*, *Yersinia*, *Helicobacter* y *Campylobacter*.

La ingestión de alguno de estos patógenos generalmente producen episodios diarreicos, con deshidratación, vómito, fiebre, dolor abdominal además de otros síntomas que dependerán del tipo de organismo ingerido, si esto sucede con gran frecuencia puede llegar a tener serias consecuencias nutricionales, además de menoscabo en el desarrollo intelectual si estas enfermedades ocurren durante la niñez.

Para solucionar este problema se han planteado diversas soluciones: educación de la población mediante campañas de salud impartidas por diversas instituciones, el abastecimiento de agua para uso y consumo humano con calidad fisicoquímica, radiactiva, organoléptica y microbiológica adecuada, lo cual no ha sido suficiente, ya que existen deficiencias en el análisis eficaz de estas propiedades, siendo esto fundamental para prevenir y evitar la transmisión de enfermedades gastrointestinales.

En México la fiebre tifoidea y la salmonelosis ocupan un lugar importante en la estadística sanitaria, por lo que es importante contar con un método rápido de identificación de *Salmonella typhi* agente patológico de dicha enfermedad, sin una intervención apropiada los brotes epidémicos pueden aumentar drásticamente.

Uno de los mayores problemas en el análisis de la calidad microbiológica del agua es la detección e identificación de bacterias de una manera rápida y eficaz. En la mayoría de los casos, la identificación se basa en las características macroscópicas y microscópicas de las bacterias en medios de cultivo específicos, así como en sus características bioquímicas, que en ocasiones como por razones técnicas y de tiempo no se analizan totalmente, ya que además de implicar mayor trabajo en el laboratorio, implica un mayor consumo de tiempo y reactivos en su proceso esto se convierte en un factor crítico sobre todo en áreas donde acortar el tiempo es vital, como en la clínica, ingeniería sanitaria, veterinaria, y alimenticia.

Aunque en años recientes se ha hecho esfuerzo para acelerar y simplificar la identificación introduciendo varios métodos por micropruebas bioquímicas, tales como el sistema comercial API 20 E, que permite una automatización parcial de los procesos y la

aplicación de métodos por computadora, la identificación aún permanece muy complicada pues está basada en el mismo principio: la investigación de las propiedades bioquímicas de los microorganismos, mediante lecturas de cambios de color después de transcurrido cierto tiempo o bien mediante la adición de un reactivo una vez inoculado el sistema, lo cual disminuye la confiabilidad de las lecturas ya que la apreciación o diferenciación de colores es muy subjetivo y varía enormemente de una persona a otra.

Una de las soluciones a este problema es la utilización de tecnología de punta. El avance tecnológico que se ha dado en los últimos años, permite buscar nuevas alternativas para lograr una detección e identificación de microorganismos de manera más rápida, sencilla y exacta proponiendo un método simple que provea la misma cantidad de información, basándose en principios de la composición química de los microorganismos.

El desarrollo de métodos químicos instrumentales tales como la cromatografía de líquidos y gases, espectrometría de masas, electroforesis y espectroscopía de infrarrojo, permite hacer una perfecta separación de los posibles componentes de una muestra analizada con una mínima demanda de tiempo y con una certeza altamente satisfactoria. La aplicación práctica de estos métodos en el campo de la taxonomía se denomina quimiotaonomía. (24, 30, 33)

Para realizar análisis de este tipo debe centrarse la atención en uno o más componentes específicos de la composición del microorganismo a identificar, estos componentes pueden ser polisacáridos, aminoácidos, ácido dextroirribonucleico, proteínas y en especial ácidos grasos celulares. Se ha puesto mayor énfasis en los ácidos grasos celulares ya que pueden analizarse por cromatografía de gases, el cual es un método sencillo, rápido y confiable a diferencia del análisis de otros componentes celulares que implican técnicas muy complicadas, equipo y reactivos sumamente costosos, además de personal altamente especializado.

Hasta hoy se han realizado diversos estudios quimiotaonomicos mediante la extracción de los ácidos grasos celulares con su correspondiente conversión a ésteres metílicos de diferentes microorganismos, principalmente de la familia *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae* y algunas levaduras, utilizando ésta técnica. La quimiotaonomía con el uso del análisis de los ácidos grasos en bacterias propone una alternativa, menos tiempo, métodos más sencillos y mayor exactitud. (39)

De aquí surge la necesidad de establecer un método de análisis por cromatografía de gases que pueda utilizarse como método de rutina, para identificar los ácidos grasos provenientes de la membrana celular de *Salmonella typhi*, con el fin de contar con un perfil cromatográfico que permita tener un criterio de identificación rápido, preciso y eficaz para dicho microorganismo aislado en aguas residuales crudas.

5. OBJETIVOS

5.1. GENERAL.

Establecer el perfil cromatográfico de los ésteres metílicos obtenidos de los ácidos grasos de la membrana celular de *Salmonella typhi*.

5.2. PARTICULARES.

- 5.2.1. Aislar *Salmonella sp* a partir de aguas residuales crudas provenientes del gran canal de la Ciudad de México
- 5.2.2. Cultivar *Salmonella sp* de los aislamientos obtenidos.
- 5.2.3. Identificar *Salmonella sp* por sistema miniaturizado (API 20 E).
- 5.2.4. Establecer las condiciones para el análisis por cromatografía gas-líquido de los ésteres metílicos de la cepa ATCC 0779 de *Salmonella typhi*.
- 5.2.5. Comparar de los perfiles obtenidos para *Salmonella typhi* ATCC 0779 y *Salmonella sp* aislada.
- 5.2.6. Identificar *Salmonella sp* aislada de aguas residuales crudas mediante las condiciones establecidas del análisis por cromatografía gas-líquido para *Salmonella typhi*.

6. HIPOTESIS

El análisis cromatográfico de los ésteres metílicos de ácidos grasos celulares provenientes de la membrana de *Salmonella typhi*, permitirá establecer un criterio quimiotaixonómico así como las condiciones del análisis cromatográfico para utilizar esta técnica como método de rutina para la identificación rápida y precisa de dicho microorganismo en aguas crudas residuales.

7. METODOLOGIA.

7.1. MATERIAL.

7.1.1. MATERIAL ESTERIL.

- Bolsas de polietileno.
- Hisopos de Moore.
- Solución salina 0.85 %
- Pipetas graduadas.
- Pipetas Pasteur.
- Tubos de ensaye con tapón de rosca.
- Cajas Petri.

7.1.2. MEDIOS.

- Caldo tetracionato
- Agar Salmonella y Shigella (Bioxon)
- Agar Sulfito y Bismuto (Merck)
- Agar Kliger
- Agar Base Cerebro Corazón (BHI)
- Agar Soya tripticasa (TSA)

7.1.3. MATERIAL NO ESTERIL.

- Pipetas Pasteur
- Pipetas graduadas de 2, 5 y 10 mL.
- Matraz Erlen Meyer, 1 L.
- Vasos de precipitado 100 mL. y 250 mL.
- Termómetro de mercurio (0 °C a 100 °C)
- Mechero Fisher
- Perillas de seguridad
- Guantes de látex.
- Cinta teflón
- Asa bacteriológica.
- Pinzas con punta de ratón.
- Microjeringas 10 μ l
- Viales de 1ml

7.1.4. EQUIPO

- Campana de flujo laminar
- Placas de agitación y calentamiento.
- Agitador clínico.

- Vórtex.
- Balanza semianalítica
- Incubadora
- Autoclave.
- Baño de agua.
- Refrigerador.
- Cromatógrafo Gas-Líquido Modelo GCHP6890

7.1.5. REACTIVOS

- Hidróxido de Sodio.
- Metanol.
- Agua destilada.
- Acido Clorhídrico 6.0 N
- Metanol.
- Hexano.
- Metil-terbutil-éter.
- Yodo resublimado.
- Yoduro de potasio.
- Fenol al 5 %
- Estándar comercial de los ésteres metílicos de *Enterobacteriaceae* SUPELCO BAME Bacterial Acid Methyl Esters Cat. 4-7080 Lote No. LA-697131
- Sistema comercial API 20 E.

7.1.6. GASES UTILIZADOS.

- Nitrógeno grado ultra alta pureza.
- Hidrógeno grado cromatográfico.
- Aire grado extraseco.

7.1.7. CEPAS.

- *Salmonella typhi* ATCC 0779 depositada en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional
- *Salmonella sp* aislada de aguas residuales crudas del influente de la planta de bombeo Lago.

7.2. METODO.

7.2.1. Aislamiento de *Salmonella* sp.

Se realizó un muestreo por semana durante 12 semanas, colocando el hisopo de Moore en el influente de agua proveniente del Gran Canal de la Ciudad de México en la planta de bombeo Lago por un período aproximado de 12 a 24 horas. Para el transporte al laboratorio se colocó el hisopo en caldo tetracionato que se incubó a 44.5°C, después de 6 horas se colocaron 10 mL de este medio nuevamente en caldo tetracionato, se continuo incubando hasta 72 horas en esta temperatura.

Se realizaron siembras en agar Sulfito y Bismuto (SB) y en agar *Salmonella* y *Shigella* (SS), los cuales se incubaron a 37°C por 24 horas; se continuó sembrando en estos medios cada 24 hrs durante tres días. Se seleccionaron en SS colonias opacas, transparentes o tránslucidas, incoloras, lisas; mientras que en SB se seleccionaron colonias de color negro con un brillo metálico.

Estas colonias se sembraron en medio kligler por picadura y estría. Los tubos que presentaron formación de gas y/o ácido sulfídrico (H₂S), así como reaccion alcalina/ácida se sembraron en placa de Agar Soya Tripticasa (TSA), se aislaron nuevas colonias a las cuales se les realizó la prueba de oxidasa, los cultivos que fueron oxidasa negativa se seleccionaron para realizar su identificación por el sistema miniaturizado API 20 E.

7.2.2.Preparación del cultivo puro.

La cepa de referencia utilizada de *Salmonella typhi* fue una cepa certificada ATCC 0779 depositada en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, la cepa pura se mantuvo en agar inclinado infusión cerebro corazón (BHI), y para el análisis por API 20 E se sembró en placa, con 25 mL de Agar Soya Tripticasa (TSA) para obtener colonias aisladas; de las cuales se volvió a sembrar nuevamente en TSA para su análisis cromatográfico. se realizó el mismo procedimiento para las cepas aisladas de *Salmonella* sp.

7.2.3. Identificación por sistema miniaturizado API 20 E.

Este sistema miniaturizado se utiliza para la identificación de organismos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* y otros bacilos Gram-negativos no exigentes, consiste en 23 pruebas bioquímicas estandarizadas y miniaturizadas, y una base de datos que indica con un 99 % de confiabilidad en su mayoría al microorganismo en cuestión, siempre y cuando sean cultivos puros. La galería API 20 E consta de 20 microtubos que contienen los sustratos deshidratados. Las pruebas se inoculan con una suspensión de bacterias en solución salina estéril que rehidrata los medios. Durante la

incubación el metabolismo de la bacteria produce cambios de color espontáneos o bien al añadir reactivos. La lectura de las reacciones se hace con la tabla de reactivos y la identificación por medio de la tabla de identificación API 20 E Index, del conjunto de reacciones se obtiene un perfil numérico que puede ser de 7 números básicos o 2 más complementarios. Cada cultivo puro se identificó por este sistema utilizando como referencia la cepa ATCC 0779 de *Salmonella typhi*.

7.2.4. Cosecha de la bacteria para el análisis cromatográfico.

Para la obtención de la biomasa, la inoculación se hizo a partir de una colonia aislada y se sembraron dos placas por cepa bacteriana utilizando 25 mL de Agar Soya Trypticasa por caja, incubando a 28 °C por 24 horas tanto para las cepas aisladas identificadas como *Salmonella sp.* como para la cepa ATCC 0779 de *Salmonella typhi*

Se cosechó la bacteria después de las 24 horas de incubación, raspando suavemente con una espátula metálica todo el crecimiento celular. El contenido de las dos cajas petri (0.45 g de peso húmedo aproximadamente) se depositó en tubos de vidrio con tapa de rosca limpios y enjuagados con hexano, utilizando uno diferente para cada cepa.

7.2.5. Esterificación y extracción de ácidos grasos.

Una vez que se colocó la biomasa bacteriana en el tubo se realizó la **saponificación** de la siguiente manera: se adicionó 1.0 mL del **reactivo de saponificación** (ver anexo). El tubo se selló perfectamente con cinta de teflón y se agitó en vórtex de 5 a 10 segundos, enseguida se incubó en baño de agua a 100 °C 5 minutos, se agitó nuevamente en vórtex 5 a 10 segundos y se reanudó la incubación a 100 °C 25 minutos.

Después se realizó la **metilación**: se dejó enfriar en baño de agua y se adicionaron 2.0 mL del **reactivo de metilación** (ver anexo), se sellaron los tubos nuevamente con cinta teflón, se agitó en vórtex por 5 a 10 segundos; se incubó a $80 \pm 1^\circ\text{C}$ por 10 ± 1 minuto en baño de agua y se enfrió rápidamente. **Nota:** este último paso es sumamente importante no debe pasarse ni un grado y ni un minuto.

Para la **extracción** de los ésteres metílicos de los ácidos grasos se adicionó 1.25 ml del reactivo de extracción (ver anexo) cerrando perfectamente el tubo. Se agitó en agitador clínico durante 10 minutos para después remover la fase acuosa del fondo y desecharla; la fase orgánica donde se encuentran los ésteres metílicos (capa superior) se conservó en el tubo.

El **lavado** de los ésteres metílicos obtenidos se realizó adicionando 30 ml del reactivo para lavado (ver anexo) y se agitó lentamente durante 5 minutos en el agitador clínico. Finalmente se recuperó la fase orgánica (superior) aproximadamente las $\frac{3}{4}$ partes de la fase superior, se transfirió a un frasco vial de 2 mL, la muestra se evaporó con Nitrógeno hasta aproximadamente 10 μL de la cual se tomaron 3 μL para su análisis por cromatografía gas-líquido.

7.2.6. Análisis cromatográfico de los ésteres metílicos obtenidos.

Condiciones del equipo:

Las muestras de los ésteres metílicos de los ácidos grasos celulares se analizaron en un Cromatógrafo de Gases Hewlett Packard modelo 6890. La columna utilizada fue una columna capilar modelo HP No. 19091B-102 Ultra 2, 5% de fenil metil silicona (25.0 m de largo X 200 μm de diámetro interno X 0.3 μm de película). Las condiciones de la columna son: temperatura inicial de 170°C con una rampa de 5°C por minuto hasta 270°C, con una post-corrída hasta 300°C durante 5 minutos para limpiar la columna. La temperatura del inyector fue de 250°C. El detector utilizado fue de ionización de flama (FID) y su temperatura fue de 270°C. El gas acarreador utilizado fue Nitrógeno con una velocidad de flujo total de 22.3 mL/min. El tamaño de muestra inyectado fue de 3 μL .

Los picos de los ésteres metílicos de los ácidos grasos obtenidos, fueron identificados comparando el tiempo de retención con un estándar comercial : SUPELCO BAME Bacterial Acid Methyl Esters Cat. 4-7080 Lote No. LA-697131 , el cual consta de 26 ésteres metílicos diferentes. El tiempo de análisis fue de 30 minutos para cada muestra.

Para la cepa tipo de *Salmonella typhi* se obtuvieron 50 cromatogramas y para cada cepa de *Salmonella sp* se obtuvieron 10 cromatogramas .

7.2.7. Análisis estadístico

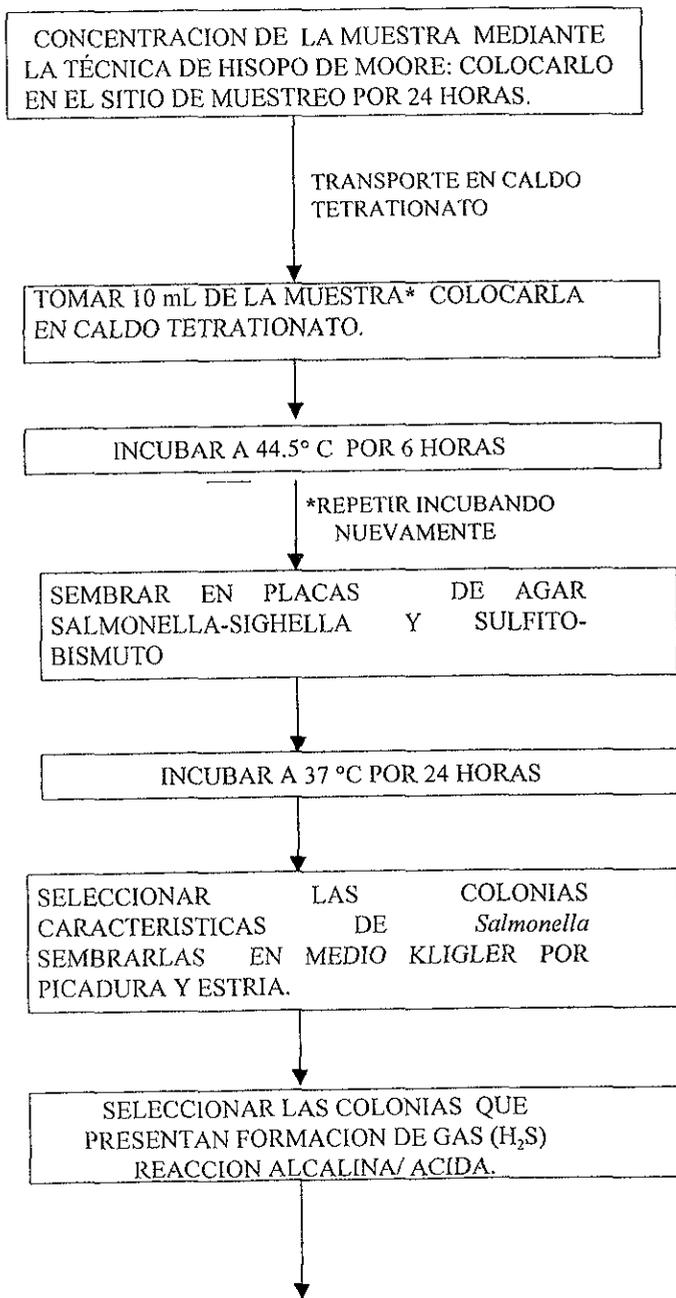
De los picos que representan los ésteres metílicos. el punto de interés son aquellos con el número de átomos de carbono en el intervalo de 10 a 28. Una vez seleccionados los picos representativos para *Salmonella typhi*, se procesó la información con las técnicas que se citan a continuación:

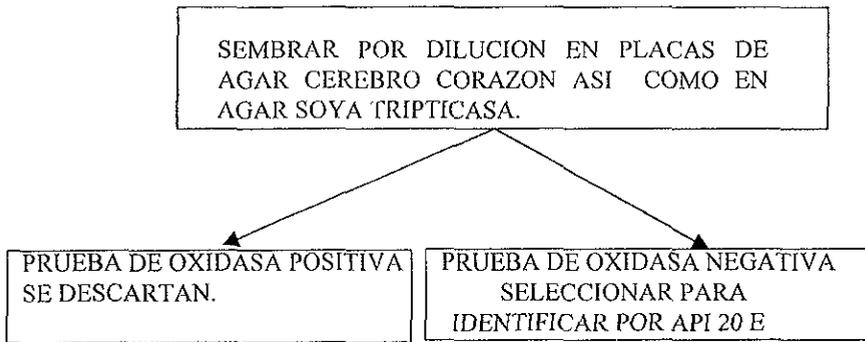
Normalización. Se realizó con el fin de estandarizar las unidades porcentuales de medición de las áreas dadas por el cromatograma preparando los datos de la especie *Salmonella typhi*. El proceso de normalización se efectuó transformando los datos numéricos de área y tiempo a partes proporcionales en porcentaje en relación a un dato de área y tiempo tomando como referencia el 100%.

El criterio para obtener el dato referente de área y tiempo se elige de los datos originales arrojados por el cromatograma, aquel que presenta el pico o área más alta y se toma como el 100%, en este caso se toma como referencia al metil hexadecanoato C 16:0. Una vez obtenidos los datos normalizados se procede a tabularlos y graficarlos para cada cepa.

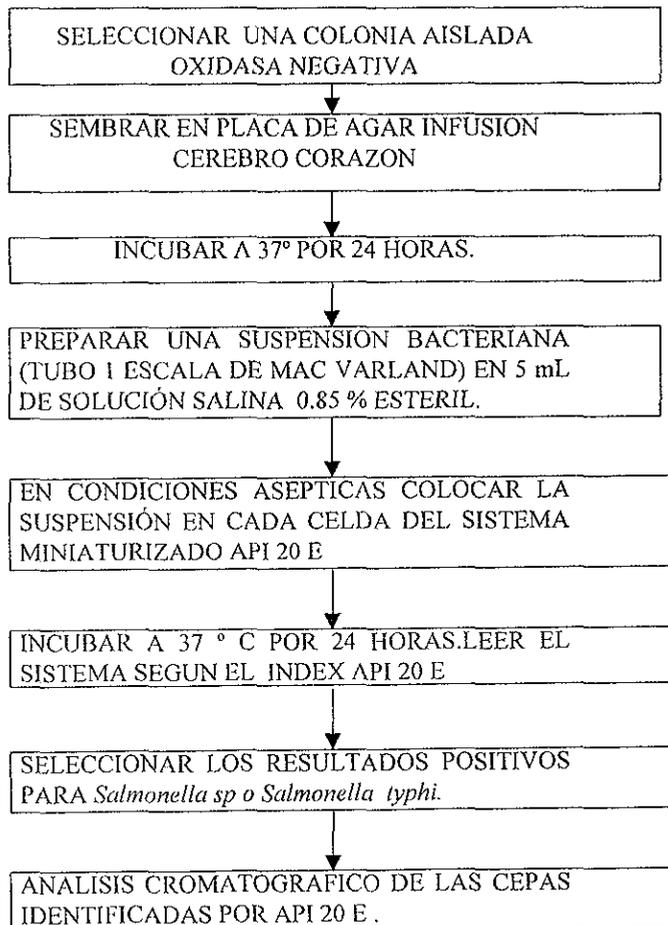
Medidas estadísticas. Se calculó la media aritmética, máximo, mínimo para las áreas de los picos y tiempos de retención para cada cadena de éster metílico obtenido. Para eliminar el efecto de la variación por el tamaño del inoculo, los valores se calculan como porcentajes del total del área del pico.

Esquema general de procedimiento para el aislamiento de *Salmonella typhi* a partir de aguas crudas residuales. (18,20,46,64)



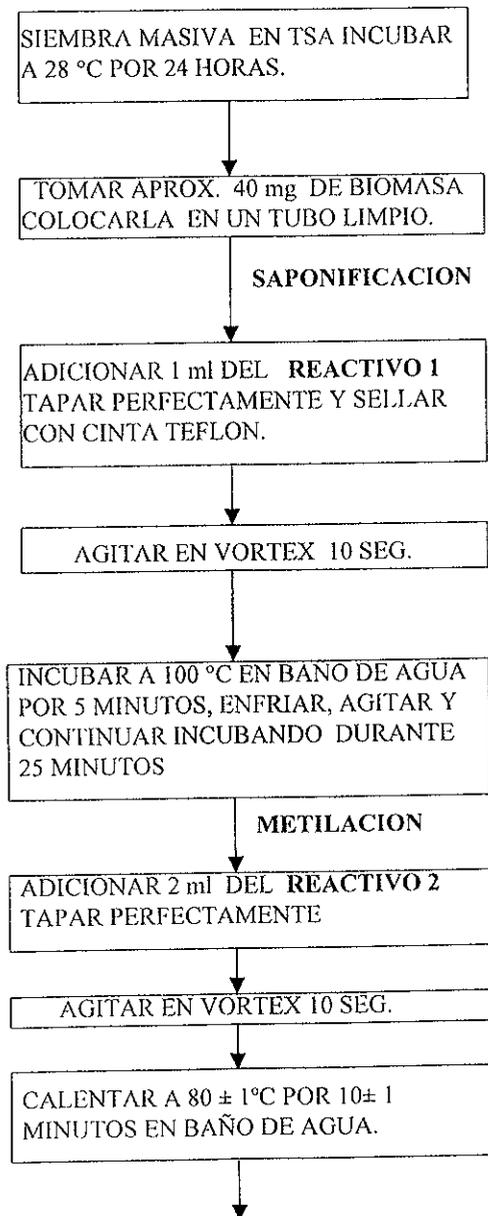


Esquema general de procedimiento para la **identificación de *Salmonella typhi*** por el sistema minaturizado API 20 E

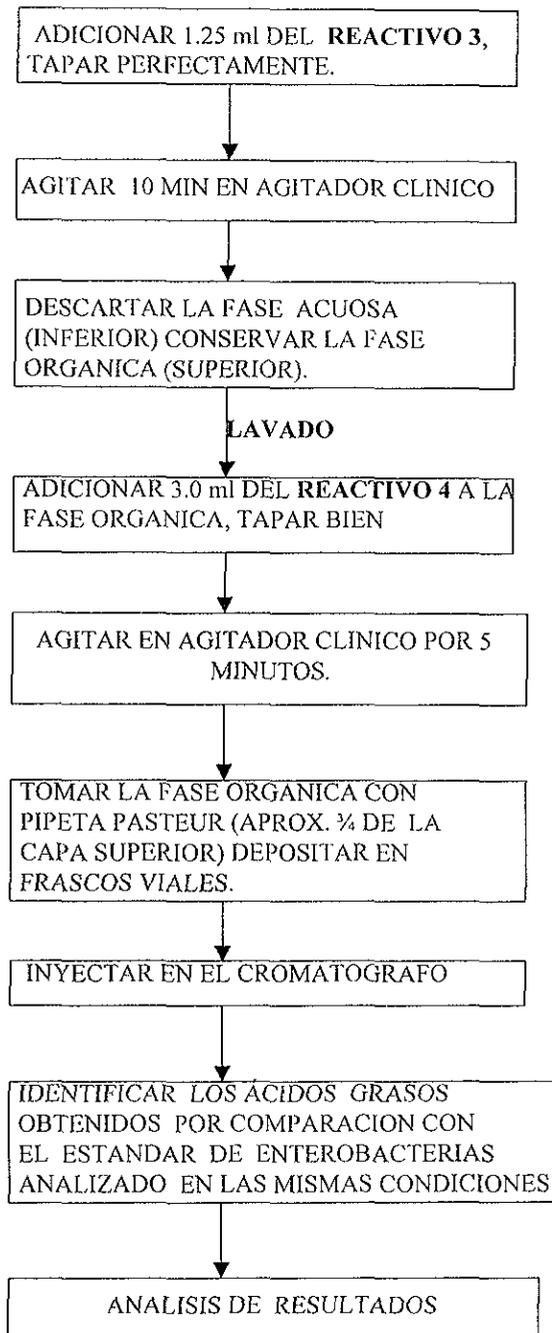


Esquema general para el análisis cromatográfico de los ésteres metílicos obtenidos de los ácidos grasos celulares de *Salmonella typhi* y para cepas aisladas de *Salmonella sp*

(17 19,40,55,56,67, 68,72)



EXTRACCION



8. RESULTADOS.

8.1. Perfil cromatográfico de *Salmonella typhi*.

La identificación de cada pico se realizó con base a un estándar de ésteres metílicos de ácidos grasos para enterobacterias SUPELCO BAME Bacterial Acid Methyl Esters Cat. 4-7080 Lote No. LA-697131 (fig. 6), analizado bajo las mismas condiciones. El perfil cromatográfico de la cepa ATCC 0779 de *Salmonella typhi* se obtuvo por el análisis cromatográfico de las extracciones esterificadas de los ácidos grasos hasta obtener al menos 50 cromatogramas representativos (fig 7).

Para el análisis se tomaron en consideración las cadenas de ácidos grasos con una composición de entre 10 y 28 carbonos, ya que son los característicos encontrados en estas células procariontes, los de menor longitud se omiten debido a que presentan un área menor al 1%, por lo que su aparición no fue significativa para la determinación, esto se apoya con un estudio realizado por Erola, 1988 (27).

De acuerdo a los ésteres metílicos aislados (tabla 2), los resultados cualitativos permiten determinar la siguiente constitución de ácidos grasos: C 11:0, C 12:0, C 14:0, C 15:0, C 15:0, C 2-OH 14:0, C 3-OH 14:0, C 16:1^o, C 16:0, C 17:0^v, C 18:1^o; con los siguientes nombres: undecanoico, dodecanoico, tetradecanoico, 13-metiltetradecanoico, pentadecanoico, 2-hidroxitetradecanoico, 3-hidroxitetradecanoico, cis-9-hexadecenoico, hexadecanoico, cis-9,10-metilenhexadecenoico, y cis-9-octadecenoico respectivamente. Con estos datos se establece la identidad de 11 picos de los ácidos grasos presentes en la membrana de *Salmonella typhi*

En la tabla 3 se observan los datos normalizados de cada éster metílico con respecto al Me. hexadecanoato; se presentan la frecuencia (número de veces) con la que se presentó cada uno de ellos, la media aritmética para los tiempos de retención normalizados, y el máximo y mínimo de cada uno.

TIEMPOS DE RETENCION

Se observó que el primer componente eluido, el Me. Undecanoato, presentó una frecuencia de 50 (100 % de los cromatogramas), con un tiempo medio de 31.84 con un mínimo y un máximo de 30.76 y 33.94 respectivamente; el cual está formado por una cadena lineal saturada de 11 carbonos, la más corta y sencilla que se presentó en el perfil cromatográfico, ya que no presenta dobles enlaces o hidroxilaciones. Enseguida apareció el Me. dodecanoato, con una frecuencia de 50 (100 % de los cromatogramas) con un tiempo medio de 43.48, un mínimo y un máximo de 42.70 y 45.27 respectivamente; formado por una cadena lineal saturada de 12 carbonos; otra de las cadenas más corta y sencilla que se presentó en el perfil ya que no presenta ni dobles ligaduras, ni metilaciones, ni hidroxilaciones. Posteriormente se presentó el Me. tetradecanoato, con una frecuencia de 50 (100 % de los cromatogramas) con 14 carbonos en su cadena y un valor promedio de 70.78 con mínimo y máximo de 70.00 y 71.90 respectivamente.

Poco después se presentó al Me. 13-metiltetradecanoato proveniente de un hidroxiácido sustituido en el carbono 13, presentó una frecuencia de 40 (80% de los cromatogramas) con una media de 78.02, mínimo y máximo de 77.75 y 79.12 respectivamente.

Inmediatamente se presentó el Me. Pentadecanoato con una cadena saturada de 15 carbonos y sin ninguna modificación química en su molécula, presentó una frecuencia de 25 (50 % de los cromatogramas) con un valor de media aritmética de 90.12, un mínimo y máximo de 89.75 y 91.12 respectivamente. A continuación apareció el Me 2-hidroxitetradecanoato, este compuesto de 14 carbonos en su cadena con un grupo hidroxilo en el carbono 2 proveniente también de un hidroxiácido, presentó una frecuencia de 25 (50% de los cromatogramas) el valor promedio del tiempo es de 91.00, con un mínimo y máximo de 91.89 y 92.15 respectivamente.

Después apareció el Me. 3-hidroxitetradecanoato, compuesto isomero del anterior, sustituido por un grupo hidroxilo en el C-3 tiene una frecuencia de 35 (70 % de los cromatogramas), el valor promedio del tiempo es de 92.65 un mínimo y un máximo de 92.29 y 93.34 respectivamente.

En octavo lugar se observa el pico correspondiente al éster metílico de un ácido graso insaturado que presenta una doble ligadura en el carbono 9 y una isomería geométrica con radicales -H en el mismo lado de la molécula, por lo que se le llama Cis-9-hexadecenoico con 16 carbonos en su cadena y una frecuencia de 50 (100 % de los cromatogramas) el promedio del tiempo de retención de 97.23, con un mínimo y máximo de 97.00 y 98.21; el siguiente éster metílico corresponde al ácido graso hexadecanoico (Me. Hexadecanoato) con 16 carbonos dispuestos en una cadena lineal saturada y sin ningún tipo de configuración; este ácido es el característico de la familia *Enterobacteriaceae* y presentó un valor promedio del 100%, por lo que fue el representativo y se tomó como dato referente.

Posteriormente se observó la presencia del Me. Cis-9,10-metilenhexadecenoato, que tiene como característica primordial un mecanismo de resonancia dado por el grupo metil presente, además de una doble ligadura en los carbonos 9 y 10 lo que le caracteriza como insaturado y con una frecuencia de 50 (100 % de los cromatogramas), presentó un valor de 111.98, un mínimo y máximo de 106.88 y 112.33.

Por último se presentó el Me. Cis-9-octadecenoato, que es el ácido graso más largo de todos los que se presentaron en el perfil, se compone de 18 carbonos, sin embargo este presenta un mecanismo de resonancia y es insaturado ya que hay una doble ligadura entre el carbono 9 y 10, con una frecuencia de 50 (100 % de los cromatogramas) presentó un tiempo de retención de 124.99 con un mínimo y máximo de 124.47 y 125.52.

El análisis cuantitativo revela que el área producida por cada pico es proporcional a la concentración del componente, donde el factor de respuesta va a ser específico para cada componente y su valor dependerá de las propiedades físicas y químicas, mediante las cuales se lleve a cabo el análisis así como el riguroso control de todas y cada una de las variables de este experimento. La exactitud obtenida por cromatografía de gases depende de la técnica usada, detector, método de integración y características propias de la muestra.

AREAS DE LOS PICOS

En la tabla 4 se muestran los valores normalizados de las áreas de los picos con respecto a C 16:0, los valores son el promedio de 50 determinaciones como ya se ha mencionado anteriormente. En la evaluación del análisis cromatográfico de los éteres metílicos, se observó que el éster más abundante para *Salmonella typhi*, fue el correspondiente al ácido graso hexadecanoico (C16:0), el cual mantiene su abundancia en las 50 corridas cromatográficas sin variación considerable, por lo que se tomó como referencia para obtener el porcentaje de los restantes ácidos grasos, ya que los valores obtenidos para este ácido presentan una desviación estándar sumamente baja 0.05 % por lo que se dice que este ácido graso mantiene sus propiedades químicas durante el análisis cromatográfico con una estabilidad alta

Siguió en abundancia el cis-9-octadecenoato con un valor medio de área de 79.28 con un mínimo de 53.95 y un máximo de 202.70 observándose una enorme diferencia entre estos valores. En tercer lugar de abundancia se encuentra el Me. cis-9-hexadecanoato, con una media de 72.19, con un mínimo de 47.48 y un máximo de 194.42 respectivamente. Posteriormente se presentó el Me. undecanoato que presenta una media de 41.27 con mínimo y máximo de 6.86 y 100.28 respectivamente. Después se obtuvo el Me. cis-9,10-metilenhexadecenoato con una media de 39.61, mínimo y máximo de 15.21 y 52.86 respectivamente. En sexto lugar de abundancia se encuentra el Me. tetradecanoato con una media de 31.71 y un máximo y mínimo de 2.59 y 90.09 respectivamente. Le sigue a éste el Me. 13-hidroxitetradecanoato con una media de 31.02, con un máximo y mínimo de 2.85 y 170.29. Los siguientes ésteres metílicos presentaron un valor medio mucho menor a los mencionados anteriormente; el dodecanoato con un valor medio de 20.15, mínimo y máximo de 2.93 y 56.58. Enseguida se presenta el 13-metil tetradecanoato, con una media de 7.78 y mínimo y máximo de 2.21 y 29.31 respectivamente. Por último los dos ésteres metílicos menos abundantes del perfil cromatográfico obtenido fueron: el pentadecanoato con una media de 2.56 un mínimo y máximo de 2.19 y 7.29 respectivamente, así como el 2-hidroxitetradecanoico con una abundancia de 2.29 un mínimo y máximo de 2.05 y 6.84 respectivamente.

En la gráfica 1, se representan los valores de los tiempos de retención normalizados para cada éster metílico con respecto a C 16:0 (Me. hexadecanoato) mientras que en la gráfica 2, las barras representan el valor promedio dado en porcentaje del área del pico normalizada de cada éster cuantificado de acuerdo a los resultados obtenidos de 50 determinaciones.

En base a los resultados normalizados de tiempo de retención y área del pico para cada éster metílico eluido, se presentó el perfil cromatográfico de once picos característicos para *Salmonella typhi* de la cepa ATCC 0779 con la siguiente constitución de ácidos grasos: C 11:0, C 12:0, C 14:0, C 15:0, C 15:0, C 2-OH 14:0, C 3-OH 14:0, C 16:1^o, C 16:0, C 17:0^o, C 18:1^o; con los siguientes nombres respectivos: undecanoico, dodecanoico, tetradecanoico, 13-metiltetradecanoico, pentadecanoico, 2-hidroxitetradecanoico, 3-hidroxitetradecanoico, cis-9-hexadecenoico, hexadecanoico, Cis-9,10-metilenhexadecenoico, cis-9-octadecenoico (gráfica 3)

1	11.0	Me undecanoate
2	2-OH 10.0	Me 2-hydroxydecanoate
3	12.0	Me dodecanoate
4	13.0	Me tridecanoate
5	2-OH 12.0	Me 2-hydroxydodecanoate
6	3-OH 12.0	Me 3-hydroxydodecanoate
7	14.0	Me tetradecanoate
8	1-15.0	Me 13-methyltetradecanoate
9	15.0	Me 12-methyltetradecanoate
10	15.0	Me pentadecanoate
11	2-OH 14.0	Me 2-hydroxytetradecanoate
12	3-OH 14.0	Me 3-hydroxytetradecanoate
13	1-16.0	Me 14-methylpentadecanoate
14	16.1'	Me cis-9-hexadecanoate
15	16.0	Me hexadecanoate
16	1-17.0	Me 15-methylhexadecanoate
17	17.0 Δ	Me cis-9, 10-methylhexadecanoate
18	17.0	Me heptadecanoate
19	2-OH 16.0	Me 2-hydroxyhexadecanoate
20	18.2''	Me cis-9, 12-octadecadienoate
21	18.1'	Me cis-9-octadecanoate
22	18.1''	Me trans-9-octadecanoate &
	18.1'''	Me cis-11-octadecanoate
23	18.0	Me octadecanoate
24	19.0 Δ	Me cis-8, 10-methylheptadecanoate
25	19.0	Me nonadecanoate
26	20.0	Me eicosanoate

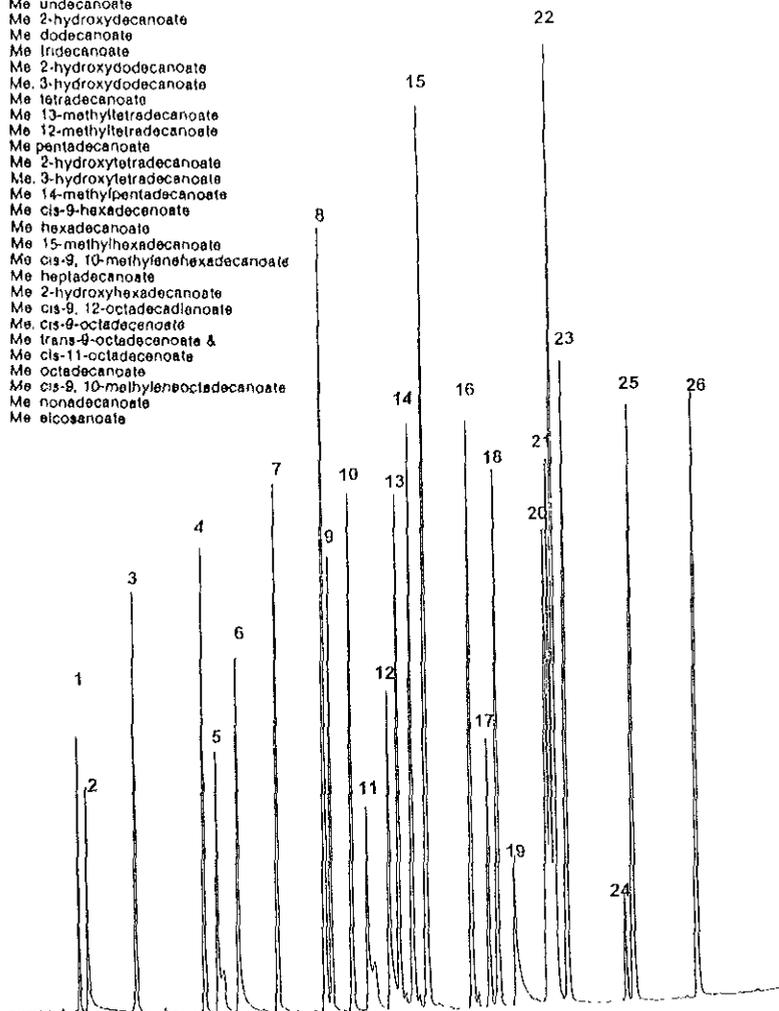


Fig. 6. Cromatograma del estándar para los ésteres metílicos obtenidos de los ácidos grasos de la familia *Enterobacteriaceae* (SUPPLCO BAME Bacterial Acid Methyl Esters Cat. 4-7080 Lote No. LA-697131) analizados en una columna capilar modelo HP No. 19091B102 Ultra 2, 5% de fenil metil silicona (25.0 m largo X 200 μ m D.I X 0.3 μ m de espesor). Velocidad lineal del gas acarreador Nitrógeno 22.3 mL/min Temperatura de la columna calentamiento 5°C por minuto de 170°C hasta 270°C, 300°C durante 5 minutos. Temperatura del detector (FID): 270°C Temperatura del inyector, 250°C Split : 50:1 La mezcla de ésteres metílicos contienen un total de 10 mg/ml en caproato de metilo

NUMERO NOMBRE

- 1 Me. UNDECANOATO
- 3 Me. DODECANOATO.
- 7 Me. TETRADECANOATO.
- 8 Me. 13-METILTETRADECANOATO.
- 10 Me. PENTADECANOATO.
- 11 Me. 2-HIDROXITETRADECANOATO
- 12 Me. 3-HIDROXITETRADECANOATO.
- 14 Me. CIS-9-HEXADECANOATO.
- 15 Me. HEXADECANOATO
- 17 Me. CIS-9,10-METILENHEXADECANOATO
- 21 Me. CIS-9-OCFADECANOATO.

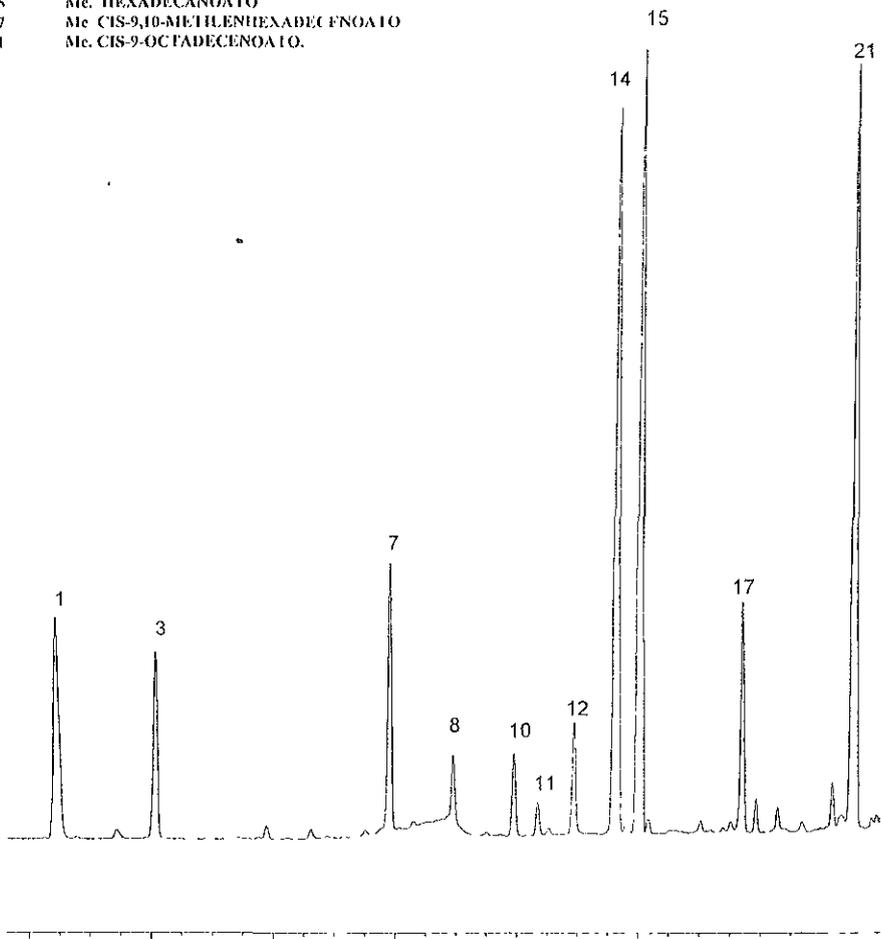


Fig. 7. Cromatograma de los esteres metilicos obtenidos de los ácidos grasos de la membrana celular de *Salmonella typhi*, analizados en una columna capilar modelo HP No. 19091B-102 Ultra 2, 5% de fenil metil silicona (25.0 m largo X 200 μ m d.i. X 0.3 μ m de espesor). Velocidad lineal del gas acarreador Nitógeno 22.3 mL/min. Temperatura de la columna: calentamiento 5°C por minuto de 170°C hasta 270°C, 300°C durante 5 minutos. Temperatura del inyector. 250 °C. Temperatura del detector (FID): 270 °C. Split 50:1

Tabla 2. Principales ésteres metílicos identificados en *Salmonella typhi*
cepa ATCC 0779.

No. de pico del STD. SUPELCO	Fórmula	Ester metílico.	Acido graso correspondiente
1	C 11:0	Me. Undecanoato.	Undecanoico.
3	C 12:0	Me. Dodccanoato	Dodecanoico
7	C 14:0	Me. Tetradecanoato	Tetradecanoico
8	C i-15:0	Me. 13-metiltetradecanoato	13-metiltetradecanoico
10	C 15:0	Me. pentadecanoato	Pentadecanoico
11	C 2-OH 14:0	Me. 2-hidroxitetradecanoato	2-hidroxitetradecanoico
12	C 3-OH 14:0	Me. 3-hidroxitetradecanoato	3-hidroxitetradecanoico
14	C 16:1 ⁹	Me. Cis-9-hexadecenoato	Cis-9-hexadecenoico
15	C 16:0	Me hexadecanoato	Hexadecanoico
17	C 17:0 [∇]	Me Cis-9,10- metilhexadecenoato	Cis-9,10- metilhexadecenoico
21	C 18:1 ⁹	Me cis-9-octadecenoato	Cis-9-octadecenoico

** El número corresponde al cromatograma de la figura 6 de acuerdo al orden de elución en la columna de fenil metil silicona.

Tabla 3. Tiempos de retención normalizados con respecto a Me. hexadecanoato de cada uno de los ésteres metílicos aislados de la cepa ATCC 0779 de *Salmonella typhi*

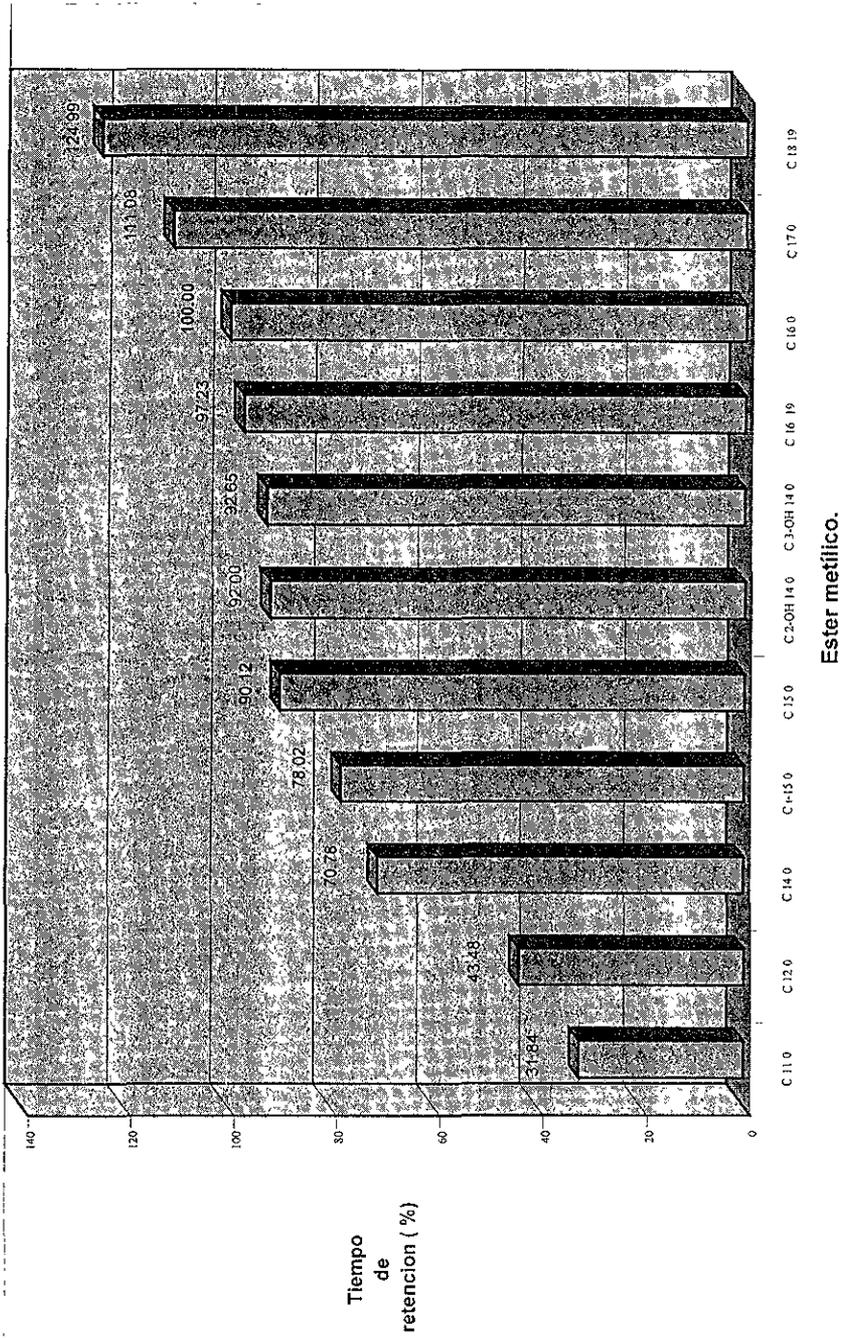
Fórmula	Ester metílico.	Frecuencia	Media	Mínimo	Máximo
C 11:0	Undecanoato.	50	31.84	30.76	33.94
C 12:0	Dodecanoato	50	43.48	42.70	45.27
C 14:0	Tetradecanoato	50	70.78	70.00	71.90
C i-15:0	13-metil tetradecanoato	40	78.02	77.75	79.12
C 15:0	Pentadecanoato	25	90.12	89.75	91.12
C 2-OH 14:0	2-hidroxitetradecanoato	25	91.00	91.89	92.15
C 3-OH 14:0	3-hidroxitetradecanoato	35	92.65	92.29	93.34
C 16:1 ⁹	Cis-9-hexadecenoato	50	97.23	97.00	98.21
C 16:0	Hexadecanoato	50	100	100	100
C 17:0 [∇]	Cis-9,10-metilenhexadecenoato	50	111.98	106.88	112.33
C 18:1 ⁹	Cis-9-octadecenoato	50	124.99	124.47	125.52

** Los valores fueron obtenidos a partir de los datos de 50 cromatogramas de la cepa ATCC 0779 de *Salmonella typhi*

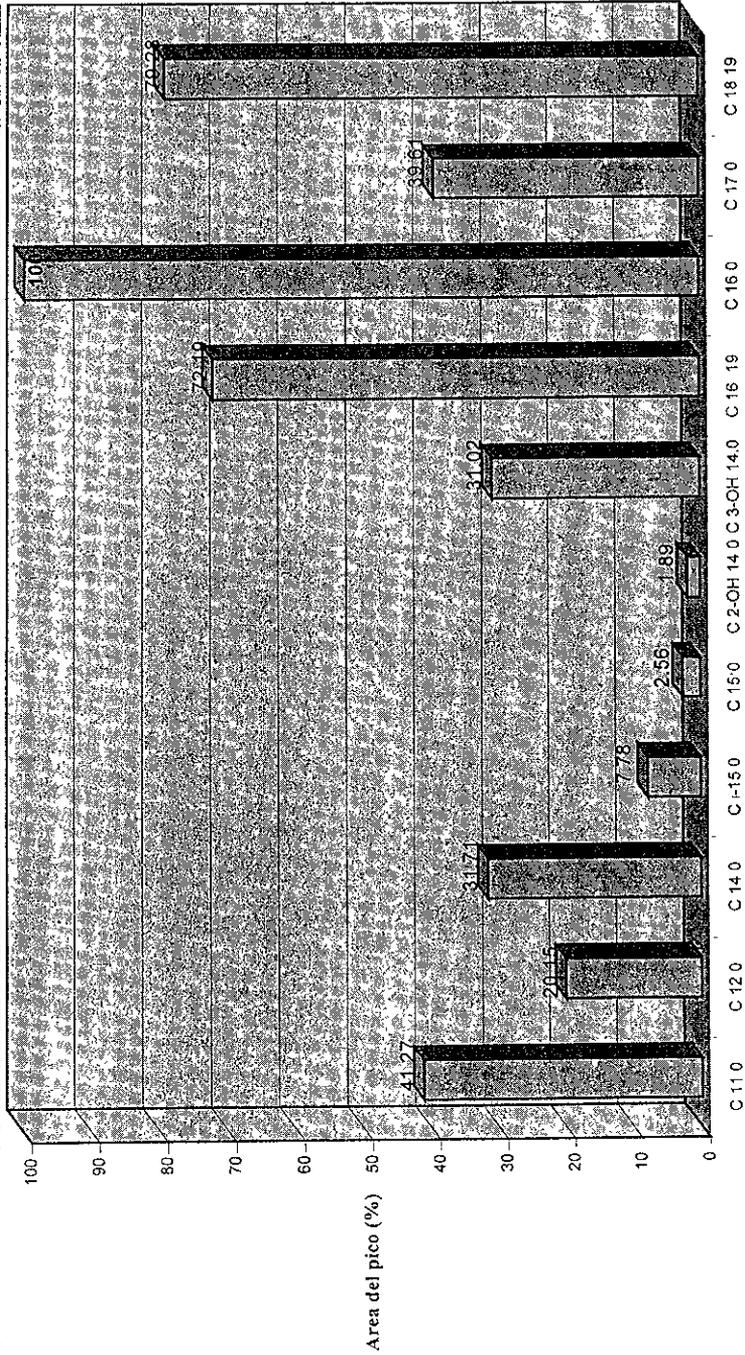
Tabla 4. Areas normalizadas con respecto a Me. hexadecanoato de cada uno de los ésteres metílicos aislados de la cepa ATCC 0779 de *Salmonella typhi*.

Fórmula	Ester metílico.	Media	Mínimo	Máximo
C 11:0	Undecanoato.	41.27	6.86	100.28
C 12:0	Dodecanoato	20.15	2.93	56.58
C 14:0	Tetradecanoato	31.71	2.59	90.09
C i-15:0	13-metiltetradecanoato	7.78	2.21	29.31
C 15:0	Pentadecanoato	2.56	2.19	7.29
C 2-OH 14:0	2-hidroxitetradecanoato	2.29	2.05	6.84
C 3-OH 14:0	3-hidroxitetradecanoato	31.02	2.85	170.29
C 16:1 ⁹	Cis-9-hexadecenoato	72.19	47.48	194.242
C 16:0	Hexadecanoato	100	100	100
C 17:0 [∇]	Cis-9,10-metilenhexadecenoato	39.61	15.21	52.86
C 18:1 ⁹	Cis-9-octadecenoato	79.28	53.95	202.70

** Los valores fueron obtenidos a partir de los datos de 50 cromatogramas de la cepa ATCC 0779 de *Salmonella typhi*.

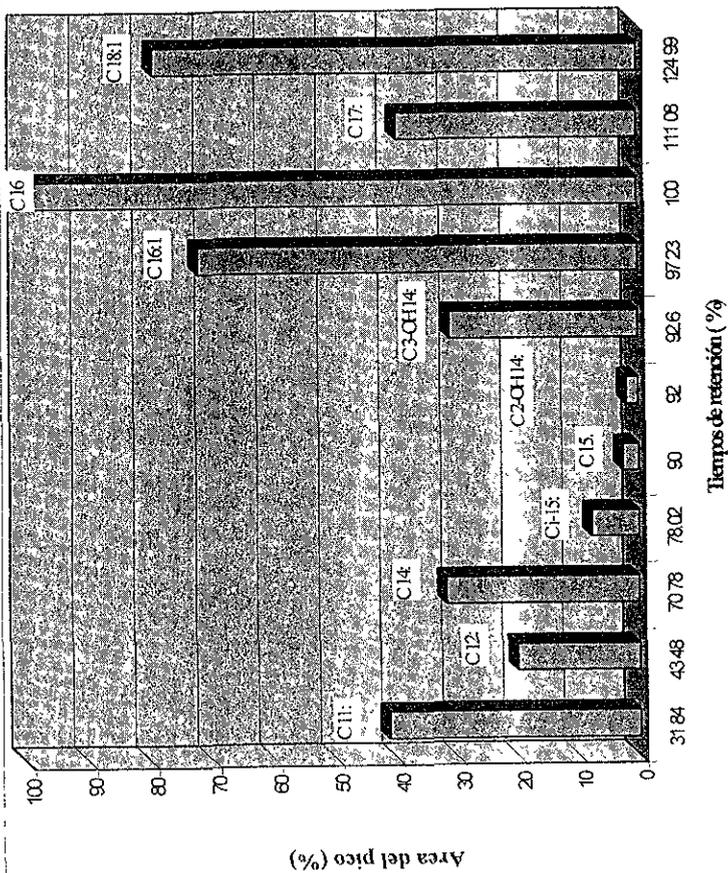


Gráfica 1. Media de los tiempos de retención normalizados para cada éster metílico de *Salmonella typhi*.



Estéer metílico.

Gráfica 2. Media para las áreas normalizadas de cada éster metílico de *Salmonella typhi*.



Gráfica 3. Perfil cromatográfico de los ésteres matúricos provenientes de los ácidos grasos celulares de la membrana de *Salmonella typhi*.

8.2. Perfil cromatográfico de cepas aisladas de *Salmonella sp.*

Del total de 12 muestreos realizados en el influente del Gran Canal de la Ciudad de México en la plant de Bombeo Lago, se obtuvieron nueve cepas de *Salmonella sp* (recuperación del 75 %), identificadas como tales por el sistema miniaturizado API20E a las cuales se les asignó un número de cepario correspondiente, según el orden en el que fueron aisladas: 049, 050, 051, 052, 053, 054, 057, 058 y 059.

La identificación de los ésteres metílicos obtenidos en el perfil cromatográfico de cada cepa se realizó en base al estándar comercial SUPELCO BAME Bacterial acid methyl esters, cat. No. 4-7080, lote No. La- 697131 (fig. 6) y posteriormente se realizó la comparación de estos picos con el perfil cromatográfico de la cepa de *Salmonella typhi* ATCC 0779 (fig. 7).

El perfil cromatográfico de cada cepa aislada se obtuvo por el análisis de 10 cromatogramas representativos, al igual que en la cepa tipo solo se tomaron en consideración los ácidos con cadenas entre 10 y 28 carbonos y con áreas bajo la curva mayores al 1 % (figs. 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16).

Para cada cepa se obtuvieron perfiles cromatográficos que presentaron once ésteres metílicos, iguales a los que se presentaron en el perfil cromatográfico de *Salmonella typhi* cepa ATCC 0779 (tabla 5)

TIEMPOS DE RETENCION

En la tabla 6, se presentan los datos normalizados de cada éster metílico para las nueve cepas aisladas de *Salmonella sp.*, se presentan la frecuencia de cada pico, la media aritmética, así como el mínimo y máximo.

La frecuencia para los once ésteres metílicos de las cepas marcadas como 049, 050, 051, 052, 053, 057, y 058 fue de 10, es decir se presentaron en los 10 cromatogramas obtenidos. La cepa 054 presentó una frecuencia de 10 para diez ésteres metílicos a excepción del Me. 3-hidroxitetradecanoato que fue el que presentó una frecuencia de 07. La cepa 059 presentó una frecuencia de 10 solo para ocho de sus ésteres metílicos, ya que el Me. 13-metiltetradecanoato y el Me. pentadecanoato presentaron una frecuencia de 08, en tanto que el Me. 2-hidroxitetradecanoato presentó una frecuencia de 07.

Para visualizar de mejor manera los resultados se presentan las medias, seguidas de los valores máximos y mínimos de acuerdo al orden en que apareció cada éster metílico con su correspondiente cepa.

El Me. undecanoato presentó un tiempo de retención promedio normalizado de 31.2, mínimo y máximo de 30.8 y 31.6 para la cepa 049; 31.3, 31.0 y 32.1 para la cepa 050, 31.4, 31.0 y 32.2 para la cepa 051. Para la cepa 052 fueron 30.6, 30.0 y 31.2 mientras que

para la cepa 053 fueron 31.6, 31.4 y 32.1; en tanto que la cepa 054 presentó los siguientes valores 31.2, 30.8 y 31.9, respectivamente. Para la cepa 057 fueron 31.2, 30.7 y la cepa 058 presentó 32.3, 30.5, 31.8 como resultado. Finalmente para la cepa 059 se presentaron valores de 31.1, 30.3 y 32.0 respectivamente.

El segundo componente eluido fue el Me. dodecanoato que presentó un tiempo de retención promedio normalizado, mínimo y máximo para la cepa 049 de 43.0, 42.5 y 43.3 respectivamente; 43.0, 42.7 y 43.1 para la cepa 050; 43.1, 42.8 y 43.3 para la cepa 051, 42.9, 42.0 y 43.2 para la cepa 52; 43.3, 42.8 y 43.7.1 para la cepa 053; para la cepa 054 de 43.4, 43.5, 44.1; mientras que la cepa 057 presentó los siguientes valores 43.5, 42.8 y 44.1 para la cepa 058 se obtuvieron valores de 43.6, 42.7 y 44.3, finalmente para la cepa 059 se presentaron valores de 43.7, 42.9 y 43.9 respectivamente.

El tercer componente eluido fue el Me. tetradecanoato que presentó un tiempo de retención promedio normalizado, mínimo y máximo para la cepa 049 de 70.1., 70.2 y 70.9 respectivamente; 70.8, 70.2 y 71.0 para la cepa 050; 70.0, 69.5 y 71.0 para la cepa 051, 71.8, 70.9 y 72.0 para la cepa 52; 70.2, 70.0 y 70.9 para la cepa 053; en la cepa 054 se obtuvieron valores de 70.7, 70.2 y 71.3; mientras que la cepa 057 presentó los siguientes valores 70.9, 70.3 y 71.4 para la cepa 058 se obtuvieron valores de 70.5, 70.1 y 71.2, finalmente para la cepa 059 se presentaron valores de 70.3, 69.8 y 70.6 respectivamente.

El cuarto orden de elución correspondió al Me. 13-metiltetradecanoato que presentó un tiempo de retención promedio normalizado, mínimo y máximo para la cepa 049 de 78.7, 78.0 y 78.9 respectivamente; 78.4, 77.9 y 79.0 para la cepa 050; 78.8, 78.0 y 79.6 para la cepa 051; 77.1, 76.5 y 77.8 para la cepa 052; 78.3, 78.1 y 78.7 para la cepa 053; en la cepa 054 se obtuvieron valores de 78.3, 78.0 y 78.9; mientras que la cepa 057 presentó los siguientes valores 78.4, 78.0 y 78.8. Para la cepa 058 se obtuvieron valores de 78.9, 78.4 y 79.4, finalmente para la cepa 059 se presentaron valores de 78.5, 78.0 y 79.1 respectivamente.

El quinto orden de elución perteneció al Me. pentadecanoato que presentó un tiempo de retención promedio normalizado, mínimo y máximo para la cepa 049 de 85.3, 85.2 y 85.6 respectivamente; 85.7, 85.2 y 86.3 para la cepa 050; 85.6, 85.3 y 86.1 para la cepa 051; 84.3, 84.0 y 84.6 para la cepa 052; 85.9, 85.0 y 86.2 para la cepa 053; en la cepa 054 se obtuvieron valores de 85.1, 84.9 y 85.8; mientras que la cepa 057 presentó los siguientes valores 85.8, 85.2 y 86.3. Para la cepa 058 se obtuvieron valores de 85.5, 85.3 y 85.9, finalmente para la cepa 059 se presentaron valores de 85.9, 85.2 y 86.3 respectivamente.

El Me. 2-hidroxitetradecanoato se presentó en sexto lugar de elución, que obtuvo un tiempo de retención promedio normalizado de 88.1, mínimo y máximo de 88.0 y 88.4 para la cepa 049; 88.3, 88.0 y 88.6 para la cepa 050; para la cepa 051 88.8, 88.1 y 89.2. La cepa 052 presentó los siguientes valores 87.9, 87.0 y 88.8, en tanto que 88.9, 88.5 y 89.2 fueron los valores obtenidos para la cepa 053. En la cepa 054 se obtuvieron valores de 88.9, 87.9 y 89.2; mientras que la cepa 057 presentó los siguientes valores 88.7, 88.0 y 89.1. Para la cepa 058 se obtuvieron valores de 88.6, 88.2 y 89.3, finalmente para la cepa 059 se presentaron valores de 88.3, 88.0 y 88.9 respectivamente.

En séptimo lugar se presentó el Me. 3-hidroxitetradecanoato, que presentó un tiempo de retención promedio normalizado, mínimo y máximo para la cepa 049 de 92.9, 92.1 y 93.0 respectivamente; 92.1, 91.6 y 92.4 para la cepa 050, 92.5, 91.9 y 92.9 para la cepa 051; 92.8, 92.1 y 93.2 para la cepa 052; 92.9, 92.3 y 93.0 para la cepa 053. En la cepa 054 se obtuvieron valores de 92.8, 92.4 y 93.3; mientras que la cepa 057 presentó los siguientes valores 92.2, 91.8 y 92.9. Para la cepa 058 se obtuvieron valores de 92.5, 91.4 y 93.5, finalmente para la cepa 059 se presentaron valores de 92.3, 92.0 y 92.9 respectivamente.

El Me. cis-9-hexadecenoato se presentó en octavo lugar del perfil, que presentó un tiempo de retención promedio normalizado de 97.0, mínimo y máximo de 96.8 y 97.5 para la cepa 049; 97.1, 96.5 y 97.8 para la cepa 050; para la cepa 051 97.2, 96.7 y 97.6. La cepa 052 presentó los siguientes valores 96.9, 96.5 y 97.7; en tanto que 97.8, 97.2 y 98.2 fueron los valores obtenidos para la cepa 053. En la cepa 054 se obtuvieron valores de 97.7, 97.0 y 98.5; mientras que la cepa 057 presentó los siguientes valores 97.6, 97.2 y 98.0. Para la cepa 058 se obtuvieron valores de 97.5, 97.1 y 97.8, finalmente para la cepa 059 se presentaron valores de 97.4, 97.2 y 98.3 respectivamente.

El siguiente éster metílico corresponde al Me. hexadecanoato con 16 carbonos dispuestos; este ácido es el característico de la familia *Enterobacteriaceae*, como ya se señaló anteriormente, y presentó un valor promedio del 100%, por lo que fue el representativo y se tomó como dato referente.

Posteriormente se presentó el Me. cis-9,10-metilenhexadecenoato, que presentó un tiempo de retención promedio normalizado de 112.3, mínimo y máximo de 119.3 y 113.0 para la cepa 049; en la cepa 050 se presentaron valores de 112.7, 111.9 y 113.5; para la cepa 051 112.7, 111.9 y 113.3 respectivamente. La cepa 052 presentó los siguientes valores 112.3, 111.9 y 112.7; en tanto que 112.0, 111.0 y 113.3 fueron los valores obtenidos para la cepa 053. En la cepa 054 se obtuvieron valores de 112.1, 111.9, y 112.8; mientras que la cepa 057 presentó los siguientes valores 112.2, 111.0 y 113.2. Para la cepa 058 se obtuvieron valores de 112.3, 111.7 y 112.8; finalmente para la cepa 059 se presentaron valores de 112.4, 111.3 y 112.6 respectivamente.

En último lugar se presentó el Me. cis-9-octadecenoato, que presentó un tiempo de retención promedio normalizado de 125.1, mínimo y máximo de 124.5 y 125.4 para la cepa 049; 125.1, 125.0 y 125.5 para la cepa 050; mientras que la cepa 051 presentó valores de 125.2, 125.9 y 126.1 respectivamente. La cepa 052 presentó los siguientes valores 124.5, 124.3 y 125.9; en tanto que 127.6, 126.9 y 127.8 fueron los valores obtenidos para la cepa 053. En la cepa 054 se obtuvieron valores de 125.7, 124.9 y 126.2; mientras que la cepa 057 presentó los siguientes valores 125.2, 124.7 y 125.6. Para la cepa 058 se obtuvieron valores de 125.9, 125.1 y 126.0; finalmente para la cepa 059 se presentaron valores de 125.7, 125.0 y 126.4 respectivamente.

AREAS DE LOS PICOS

Referente al aspecto cuantitativo en la tabla 6 se presentan los valores obtenidos para la media normalizada respecto al Me. hexadecanoato (C16:0), los valores mínimos y máximos obtenidos para cada éster metílico y para cada cepa. El orden en que se presentan los datos no está en función de la abundancia de cada uno de ellos.

El Me. undecanoato presentó un promedio de área normalizada de 39.2, mínimo y máximo de 38.9 y 39.5 para la cepa 049; 90.4, 89.2 y 91.5 para la cepa 050, 29.3, 28.3 y 30.7 para la cepa 051. Para la cepa 052 fueron 15.6, 14.9 y 16.2 mientras que para la cepa 053 fueron 21.6, 21.3 y 22.4; en tanto que la cepa 054 presentó los siguientes valores 20.9, 19.5 y 21.6, respectivamente. Para la cepa 057 fueron 20.8, 19.7 y 21.4; la cepa 058 presentó 30.6, 29.3 y 31.4 como resultado. Finalmente para la cepa 059 se presentaron valores de 91.5, 90.4 y 92.8 respectivamente.

El Me. dodecanoato presentó un promedio de área normalizada, mínimo y máximo para la cepa 49 de 25.1, 24.6 y 26.2 respectivamente; 28.3, 27.7 y 29.1 para la cepa 050; 25.9, 24.5 y 26.9 para la cepa 051, 12.8, 12.4 y 13.8 para la cepa 52; 20.6, 19.4 y 21.7 para la cepa 053; para la cepa 054 de 11.7, 10.6 y 12.3; mientras que la cepa 057 presentó los siguientes valores 13.9, 12.8 y 14.2 para la cepa 058 se obtuvieron valores de 29.6, 29.2 y 30.5, finalmente para la cepa 059 se presentaron valores de 79.2, 78.5 y 79.4 respectivamente.

El Me. tetradecanoato que presentó un promedio de área normalizada, mínimo y máximo para la cepa 49 de 28.8, 28.2 y 29.6 respectivamente; 32.7, 31.4 y 33.3 para la cepa 050; 30.2, 29.1 y 31.5 para la cepa 051; 16.9, 16.6 y 17.4 para la cepa 52; 23.8, 22.2 y 24.3 para la cepa 053; en la cepa 054 se obtuvieron valores de 18.9, 17.7 y 19.2; mientras que la cepa 057 presentó los siguientes valores 25.6, 25.0 y 26.5 para la cepa 058 se obtuvieron valores de 40.8, 40.7 y 42.6, finalmente para la cepa 059 se presentaron valores de 78.4, 77.9 y 79.3 respectivamente.

El cuarto componente el Me. 13-metiltetradecanoato presentó un promedio de área normalizada, mínimo y máximo para la cepa 49 de 6.4, 5.7 y 6.5 respectivamente; 7.9, 6.4 y 8.7 para la cepa 050; 5.8, 4.6 y 6.1 para la cepa 051; 2.8, 2.1 y 2.9 para la cepa 052; 4.9, 4.4 y 5.8 para la cepa 053; en la cepa 054 se obtuvieron valores de 2.1, 1.7 y 3.5; mientras que la cepa 057 presentó los siguientes valores 3.1, 2.3 y 3.4. Para la cepa 058 se obtuvieron valores de 5.2, 4.5 y 5.8, finalmente para la cepa 059 se presentaron valores de 6.3, 5.7 y 7.2 respectivamente.

El Me. 13-pentadecanoato presentó un promedio de área normalizada, mínimo y máximo para la cepa 049 de 6.2, 5.9 y 6.6 respectivamente; 7.0, 6.9 y 7.6 para la cepa 050; 15.6, 15.2 y 16.1 para la cepa 051; 5.6, 5.2 y 6.7 para la cepa 052; 4.2, 3.7 y 4.4 para la cepa 053; en la cepa 054 se obtuvieron valores de 3.7, 2.1 y 4.0; mientras que la cepa 057 presentó los siguientes valores 4.5, 4.1 y 5.1. Para la cepa 058 se obtuvieron valores de 6.4, 6.3 y 7.1, finalmente para la cepa 059 se presentaron valores de 3.8, 2.8 y 4.3 respectivamente. Este componente fue uno de los menos abundantes que se presentaron en el perfil de todas las cepas.

El Me. 2-hidroxitetradecanoato presentó un promedio de área normalizada, mínimo y máximo 3.8, 3.0 y 4.4 para la cepa 49; 5.5, 4.6 y 5.9 para la cepa 050; para la cepa 051 7.3, 6.4 y 8.7. La cepa 052 presentó los siguientes valores 5.1, 4.5 y 5.2; en tanto que 2.5, 2.1 y 3.0 fueron los valores obtenidos para la cepa 053. En la cepa 054 se obtuvieron valores de 2.2, 1.9 y 2.5; mientras que la cepa 057 presentó los siguientes valores 2.8, 2.4 y 3.8. Para la cepa 058 se obtuvieron valores de 2.9, 2.2 y 3.4, finalmente para la cepa 059 se presentaron valores de 2.1, 1.6 y 3.5 respectivamente. Este compuesto fue también el menos abundante en las cepas aisladas, sin embargo se consideró en el perfil por poseer un área mayor al 1 % y por presentarse de manera constante una vez que se tuvo mejor implementada la técnica.

En séptimo lugar se presentó el Me. 3-hidroxitetradecanoato, presentó un promedio de área normalizada, mínimo y máximo para la cepa 49 de 3.0, 2.5 y 3.1 respectivamente; 5.1, 4.5 y 5.8 para la cepa 050; 40.5, 39.6 y 40.4 para la cepa 051; 10.6, 9.3 y 10.8 para la cepa 052; 5.5, 4.8 y 6.1 para la cepa 053. En la cepa 054 se obtuvieron valores de 2.1, 1.8 y 3.4; mientras que la cepa 057 presentó los siguientes valores 2.0, 1.8 y 2.4. Para la cepa 058 se obtuvieron valores de 2.6, 1.4 y 2.9, finalmente para la cepa 059 se presentaron valores de 72.9, 71.3 y 73.4 respectivamente.

El Me. cis-9-hexadecenoato se presentó en octavo lugar del perfil presentó un promedio de área normalizada, mínimo y máximo 68, 67.3 y 69.2 para la cepa 49; 78.0, 77.1 y 78.4 para la cepa 050; para la cepa 051 92.9, 92.1 y 93.1. La cepa 052 presentó los siguientes valores 94.8, 93.4 y 95.1; en tanto que 9.3, 8.7 y 9.9 fueron los valores obtenidos para la cepa 053. En la cepa 054 se obtuvieron valores de 91.8, 91.1 y 92.2; mientras que la cepa 057 presentó los siguientes valores 96.3, 96.1 y 97.5. Para la cepa 058 se obtuvieron valores de 90.5, 89.7 y 91.1, finalmente para la cepa 059 se presentaron valores de 93.6, 93.5 y 94.3 respectivamente.

El Me. hexadecanoato con 16 carbonos dispuestos es el característico de la familia *Enterobacteriaceae*, como ya se señaló anteriormente, y presentó un valor promedio del 100%, por lo que fue el representativo y se tomó como dato referente.

Posteriormente se presentó el Me. cis-9,10-metilenhexadecenoato, presentó un promedio de área normalizada, mínimo y máximo 22.2, de 21.7 y 23.1 para la cepa 49; en la cepa 50 se presentaron valores de 24.0, 23.6 y 24.3; para la cepa 051 75.7, 75.1 y 76.2 respectivamente. La cepa 052 presentó los siguientes valores 18.2, 17.8 y 18.7; en tanto que 20.9, 20.1 y 21.2 fueron los valores obtenidos para la cepa 053. En la cepa 054 se obtuvieron valores de 23.1, 22.5, y 23.6; mientras que la cepa 057 presentó los siguientes valores 30.2, 30.0 y 31.1. Para la cepa 058 se obtuvieron valores de 45.3, 44.2 y 45.9; finalmente para la cepa 059 se presentaron valores de 75.7, 75.2 y 76.3 respectivamente.

En último lugar se presentó el Me. cis-9-octadecenoato, presentó un promedio de área normalizada, mínimo y máximo 93.3, 92.1 y 93.5 para la cepa 49; 67.8, 63.4 y 68.1 para la cepa 050; mientras que la cepa 051 presentó valores de 95.2, 94.1 y 95.5 respectivamente. La cepa 052 presentó los siguientes valores 30.5, 29.4 y 31.1; en tanto que 70.1, 69.2 y 71.3 fueron los valores obtenidos para la cepa 053. En la cepa 054 se obtuvieron valores de 80.4, 79.5 y 81.2; mientras que la cepa 057 presentó los siguientes valores 92.9, 92.6 y 93.4 Para

la cepa 058 se obtuvieron valores de 97.6, 97.1 y 98.3; finalmente para la cepa 059 se presentaron valores de 88.9, 88.5 y 89.6 respectivamente.

En la gráfica 4 se presentan los valores de los tiempos de retención representativos para cada éster metílico de las nueve cepas aisladas, mientras que la gráfica 5 presenta el porcentaje del área del pico normalizado representativo para cada éster metílico de las nueve cepas aisladas.

En la gráfica 6 se presenta el perfil cromatográfico representativo de las cepas de *Salmonella sp* aisladas. Estos resultados permiten determinar la siguiente constitución de ácidos grasos presentes en las nueve aisladas e identificadas previamente solo como *Salmonella sp*: C 11:0, C 12:0, C 14:0, C i-15:0, C 15:0, C 2-OH 14:0, C 3-OH 14:0, C 16:1ⁿ, C 16:0, C 17:0^v, C 18:1ⁿ; con los siguientes nombres respectivos: undecanoico, dodecanoico, tetradecanoico, 13-metiltetradecanoico, pentadecanoico, 2-hidroxitetradecanoico, 3-hidroxitetradecanoico, cis-9-hexadecenoico, hexadecanoico, cis-9,10-metilenhexadecenoico, y cis-9-octadecenoico respectivamente. Con estos datos se establece la identidad de 11 picos de los ácidos grasos presentes en la membrana de *Salmonella typhi*, por lo que estas cepas se identifican como dicho microorganismo.

NUMERO NOMBRE

- 1 Me. UNDECANOATO
- 3 Me. DODECANOATO.
- 7 Me. TETRADECANOATO.
- 8 Me. 13-METHILTETRADECANOATO.
- 10 Me. PENTADECANOATO.
- 11 Me. 2-HIDROXITETRADECANOATO.
- 12 Me. 3-HIDROXITETRADECANOATO.
- 14 Me. CIS-9-HEXADECANOATO.
- 15 Me. HEXADECANOATO
- 17 Me. CIS-9,10-METILENHEXADECENOATO
- 21 Me. CIS-9-OCTADECENOATO.

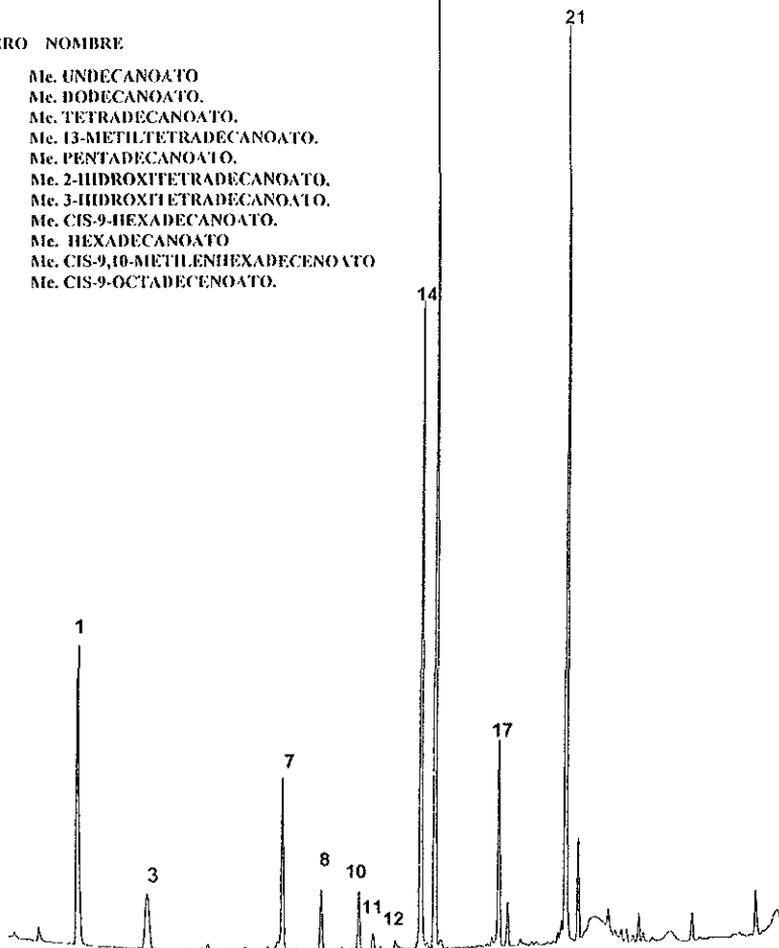


Fig. 8. Cromatograma de los ésteres metílicos obtenidos de los ácidos grasos de la membrana celular de *Salmonella sp* CEPA 49, analizados en una columna capilar modelo HP No. 19091B-102 Ultra 2, 5% de fenil metil silicona (25.0 m largo X 200 μ m di. X 0.3 μ m de espesor). Velocidad lineal del gas acarreador Nitrógeno 22.3 mL/min. Temperatura de la columna calentamiento 5°C por minuto de 170°C hasta 270°C, 300°C durante 5 minutos. Temperatura del inyector: 250 °C Temperatura del detector (FID): 270 °C Split 50:1

NUMERO NOMBRE

- 1 Me. UNDECANOATO
- 3 Me. DODECANOATO.
- 7 Me. TETRADECANOATO.
- 8 Me. 13-METILTETRADECANOATO.
- 10 Me. PENTADECANOATO.
- 11 Me. 2-HIDROXITETRADECANOATO.
- 12 Me. 3-HIDROXITETRADECANOATO.
- 14 Me. CIS-9-HEXADECANOATO.
- 15 Me. HEXADECANOATO
- 17 Me. CIS-9,10-METILENHEXADECENOATO
- 21 Me. CIS-9-OCTADECENOATO.

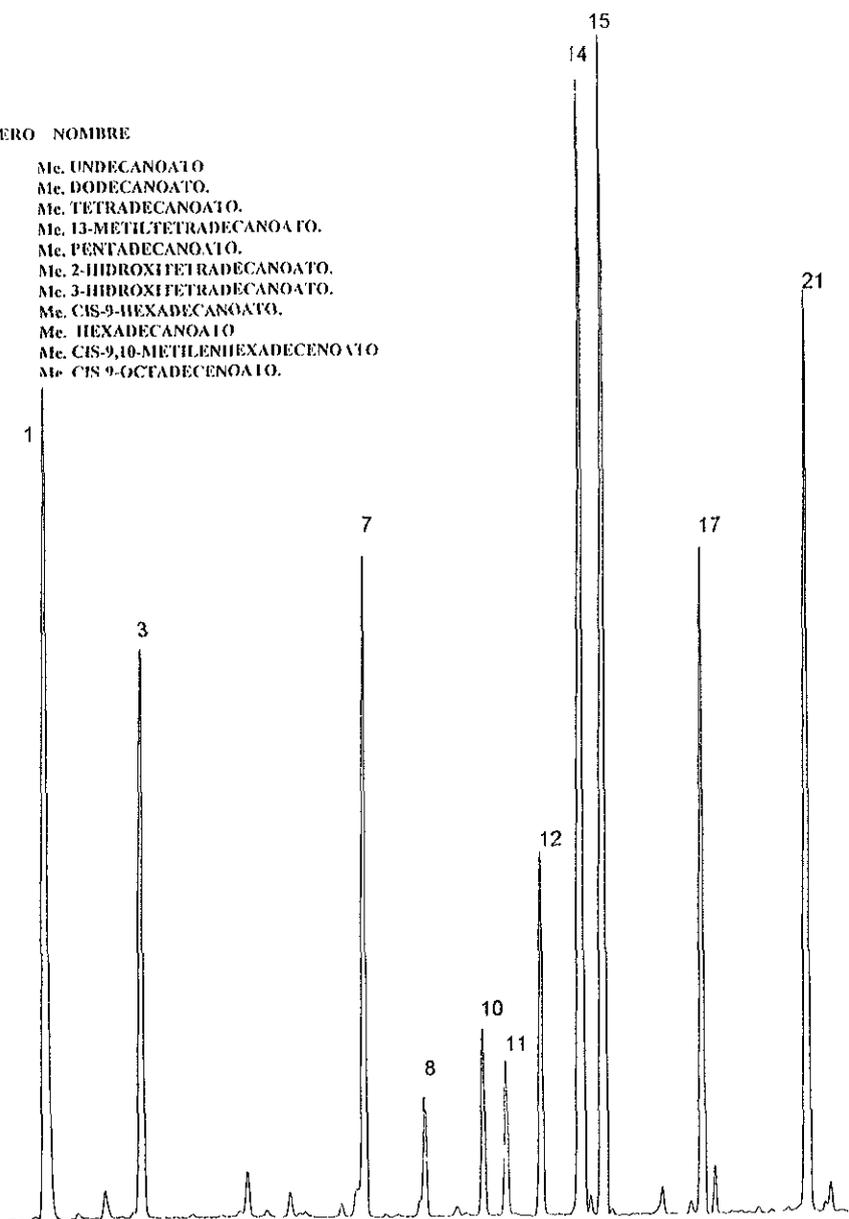


Fig. 9. Cromatograma de los ésteres metílicos obtenidos de los ácidos grasos de la membrana celular de *Salmonella sp* CEPA 50 analizados en una columna capilar modelo HP No. 19091B-102 Ultra 2, 5% de fenil metil sílica (25 0 m largo X 200 μ m di. X 0.3 μ m de espesor). Velocidad lineal del gas acarreador Nitrógeno 22.3 mL/min Temperatura de la columna: calentamiento 5°C por minuto de 170°C hasta 270°C, 300°C durante 5 minutos Temperatura del inyector 250 °C. Temperatura del detector (FID): 270 °C. Split 50:1

NUMERO NOMBRE

1	Me. UNDECANOATO
3	Me. DODECANOATO
7	Me. TETRADECANOATO
8	Me. 13-METILTETRADECANOATO
10	Me. PENADECANOATO
11	Me. 2-HIDROXITETRADECANOATO
12	Me. 3-HIDROXITETRADECANOATO
14	Me. CIS-9-HEXADECANOATO
15	Me. HEXADECANOATO
17	Me. CIS-9,10-MEILENHEXADECENOATO
21	Me. CIS-9-OCTADECENOATO

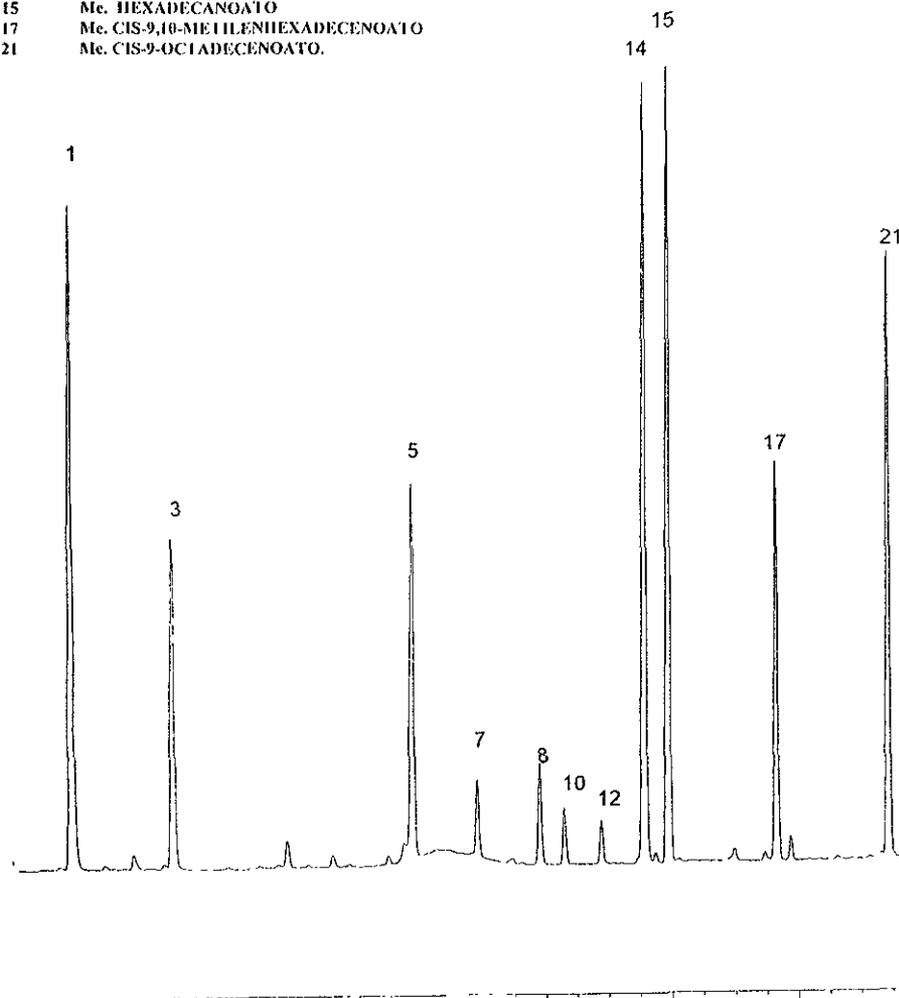


Fig 10. Cromatograma de los ésteres metílicos obtenidos de los ácidos grasos de la membrana celular de *Salmonella sp* CEPA 51 analizados en una columna capilar modelo HP No. 19091B-102 Ultra 2, 5% de fenil metil silicona (25.0 m largo X 200 μ m d.i. X 0.3 μ m de espesor). Velocidad lineal del gas acarreador Nitrógeno 22.3 mL/min. Temperatura de la columna: calentamiento 5°C por minuto de 170°C hasta 270°C, 300°C durante 5 minutos Temperatura del inyector: 250°C. Temperatura del detector (FID) 270°C Split 50:1

NUMERO NOMBRE

1	Me. UNDECANOATO
3	Me. DODECANOATO.
7	Me. TETRADECANOATO.
8	Me. 13-METHILTETRADECANOATO.
10	Me. PENTADECANOATO.
11	Me. 2-HIDROXITETRADECANOATO.
12	Me. 3-HIDROXITETRADECANOATO.
14	Me. CIS-9-HEXADECANOATO.
15	Me. HEXADECANOATO
17	Me. CIS-9,10-METILENHEXADECENOATO
21	Me. CIS-9-OCTADECENOATO.

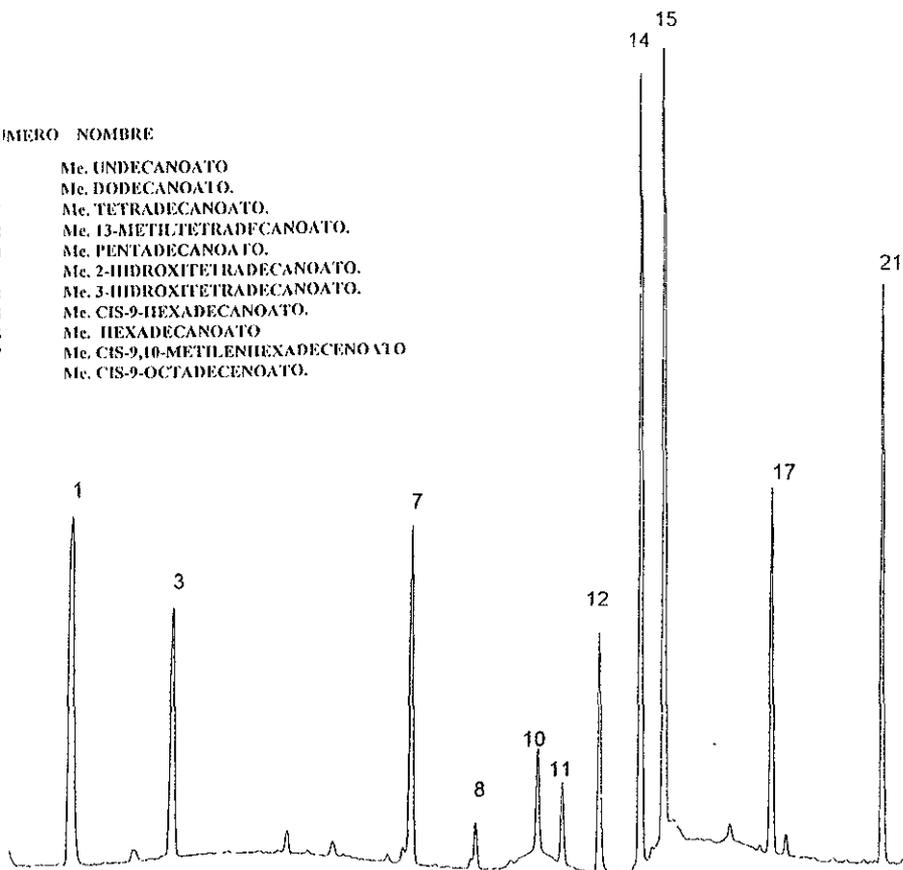


Fig. 11. Cromatograma de los ésteres metílicos obtenidos de los ácidos grasos de la membrana celular de *Salmonella sp* CEPA 52 analizados en una columna capilar modelo HP No 19091B-102 Ultra 2, 5% de fenil metil silicona (25.0 m largo X 200 μ m di. X 0.3 μ m de espesor). Velocidad lineal del gas acarreador Nitrógeno 22.3 ml/min. Temperatura de la columna calentamiento 5°C por minuto de 170°C hasta 270°C, 300°C durante 5 minutos. Temperatura del inyector: 250 °C Temperatura del detector (FID). 270 °C Split 50 : 1

NUMERO NOMBRE

1	Me UNDECANOATO
3	Me. DODECANOATO.
7	Me. TETRADECANOATO.
8	Me 13-METHILTETRADECANOATO.
10	Me. PENTADECANOATO.
11	Me. 2-HIDROXITETRADECANOATO.
12	Me. 3-HIDROXITETRADECANOATO.
14	Me. CIS-9-HEXADECANOATO.
15	Me. HEXADECANOATO
17	Me. CIS-9,10-METILENHEXADECENOATO
21	Me. CIS-9-OCTADECENOATO.

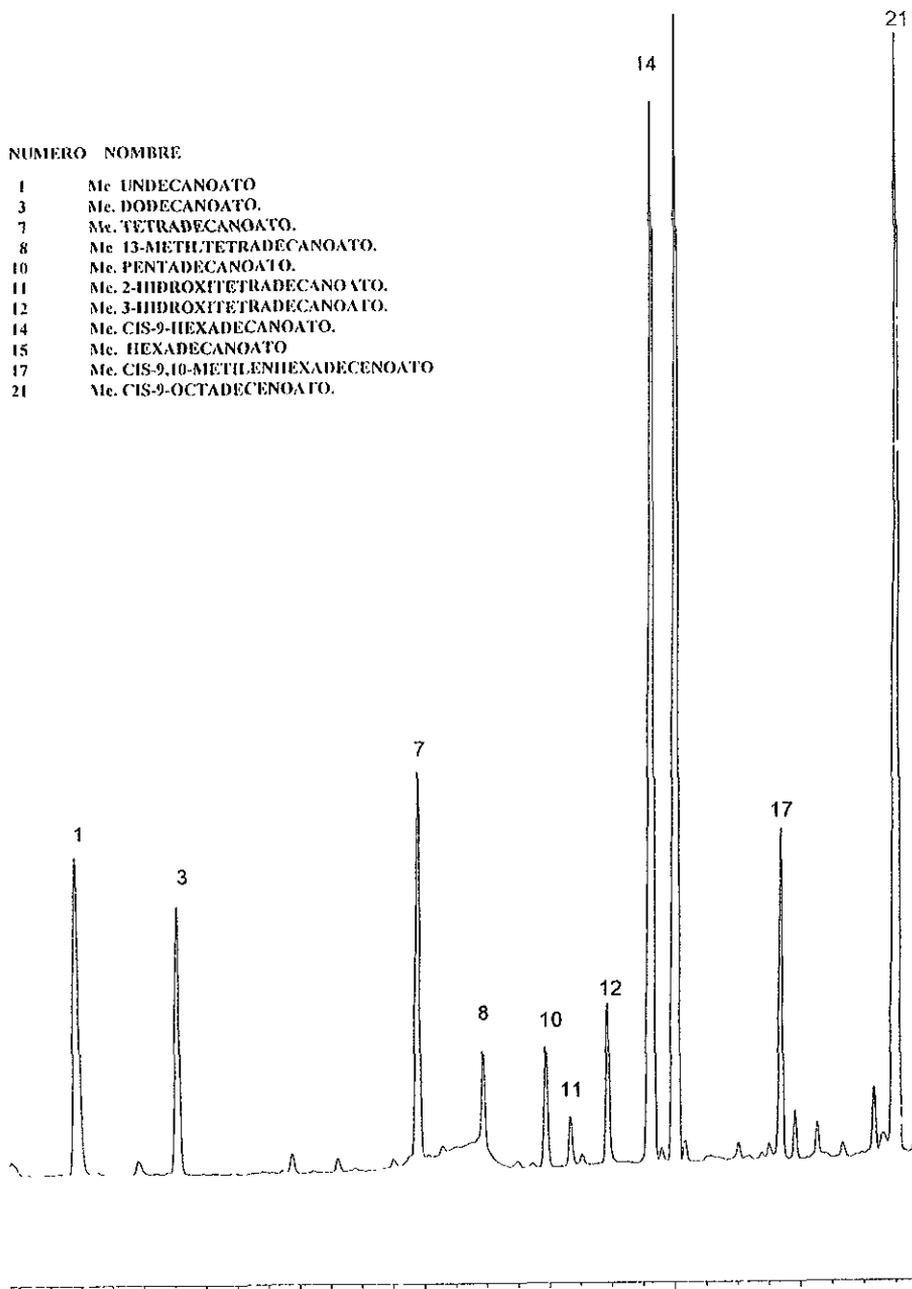


Fig. 12. Cromatograma de los ésteres metílicos obtenidos de los ácidos grasos de la membrana celular de *Salmonella sp* CEP4 53 analizados en una columna capilar modelo HP No. 19091B-102 Ultra 2, 5% de fenil metil silicona (25.0 m largo X 200 μ m di. X 0.3 μ m de espesor). Velocidad lineal del gas acarreador Nitrógeno 22.3 mL/min. Temperatura de la columna: calentamiento 5°C por minuto de 170°C hasta 270°C, 300°C durante 5 minutos. Temperatura del inyector: 250 °C. Temperatura del detector (FID): 270 °C Split 50:1.

NUMERO NOMBRE

1	Me. UNDECANOATO
3	Me. DODECANOATO.
7	Me. TETRADECANOATO.
8	Me. 13-METHLTETRADECANOATO.
10	Me. PENTADECANOATO.
11	Me. 2-HIDROXITETRADECANOATO.
12	Me. 3-HIDROXITETRADECANOATO.
14	Me. CIS-9-HEXADECANOATO.
15	Me. HEXADECANOATO
17	Me. CIS-9,10-METHLENHEXADECENOATO
21	Me. CIS-9-OCTADECENOATO.

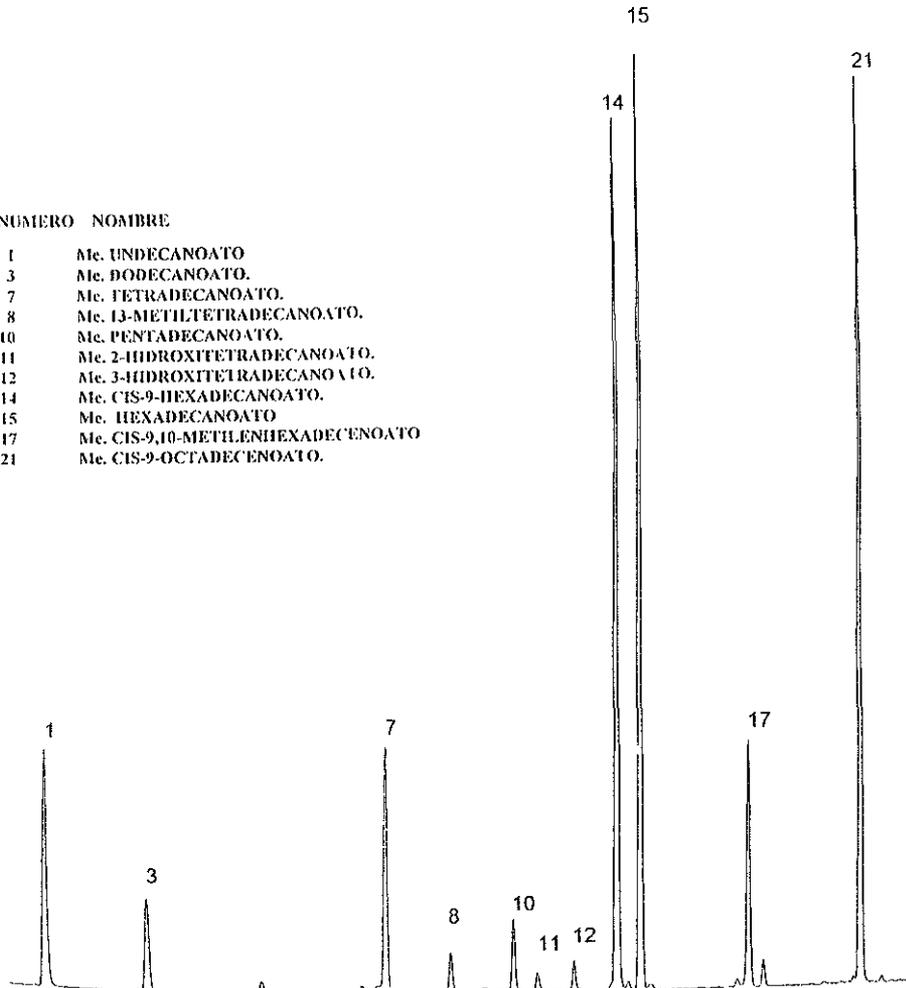


Fig. 13. Cromatograma de los ésteres metílicos obtenidos de los ácidos grasos de la membrana celular de *Salmonella sp* CEPA 54 analizados en una columna capilar modelo HP No. 19091B-102 Ultra 2, 5% de fenil metil silicona (250 m largo X 200 μ m di. X 0.3 μ m de espesor) Velocidad lineal del gas acarreador Nitrógeno 22.3 mL/min Temperatura de la columna: calentamiento 5°C por minuto de 170°C hasta 270°C, 300°C durante 5 minutos Temperatura del inyector: 250°C. Temperatura del detector (FID): 270°C. Split 50:1

NUMERO NOMBRE

1	Me. UNDECANOATO
3	Me. DODECANOATO.
7	Me. TETRADECANOATO.
8	Me. 13-METILTETRADECANOATO.
10	Me. PENTADECANOATO.
11	Me. 2-HIDROXITETRADECANOATO.
12	Me. 3-HIDROXITETRADECANOATO.
14	Me. CIS-9-HEXADECANOATO.
15	Me. HEXADECANOATO
17	Me. CIS-9,10-MEILENHEXADECENOATO
21	Me. CIS-9-OCTADECENOATO.

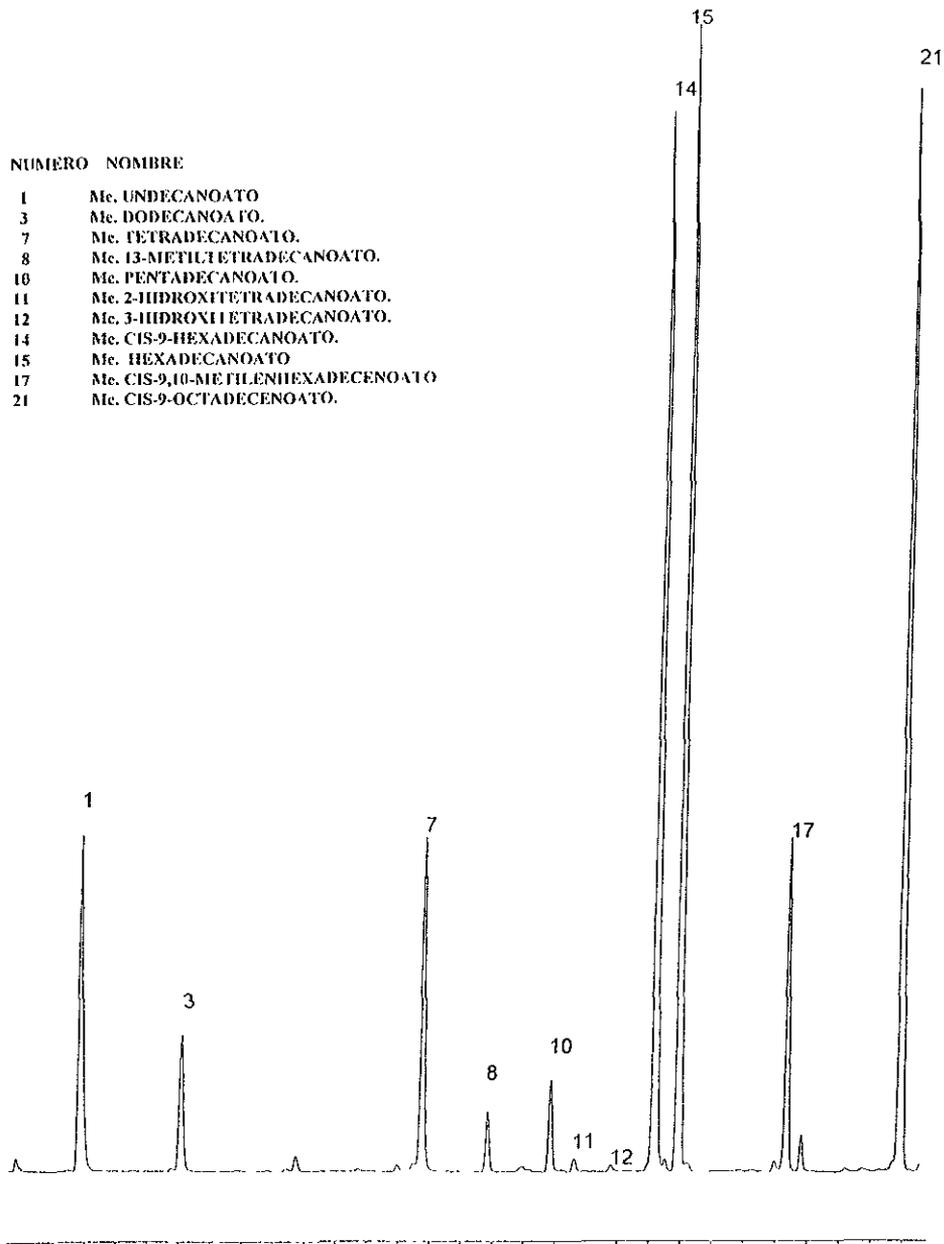


Fig. 14. Cromatograma de los ésteres metílicos obtenidos de los ácidos grasos de la membrana celular de *Salmonella sp* CEPA 57 analizados en una columna capilar modelo HP No 19091B-102 Ultra 2, 5% de fenil metil silicona (25 0 m largo X 200 μ m di. X 0.3 μ m de espesor). Velocidad lineal del gas acarreador Nitrógeno 22.3 mL/min. Temperatura de la columna: calentamiento 5°C por minuto de 170°C hasta 270°C, 300°C durante 5 minutos. Temperatura del inyector: 250 °C. Temperatura del detector (FID): 270 °C. Split 50:1

NUMERO NOMBRE

1	Me. UNDECANOATO
3	Me. DODECANOATO.
7	Me. TETRADECANOATO.
8	Me. 13-METILTETRADECANOATO.
10	Me. PENTADECANOATO.
11	Me. 2-HIDROXITETRADECANOATO.
12	Me. 3-HIDROXITETRADECANOATO.
14	Me. CIS-9-HEXADECANOATO.
15	Me. HEXADECANOATO
17	Me. CIS-9,10-METILENHEXADECENOATO
21	Me. CIS-9-OCTADECENOATO.

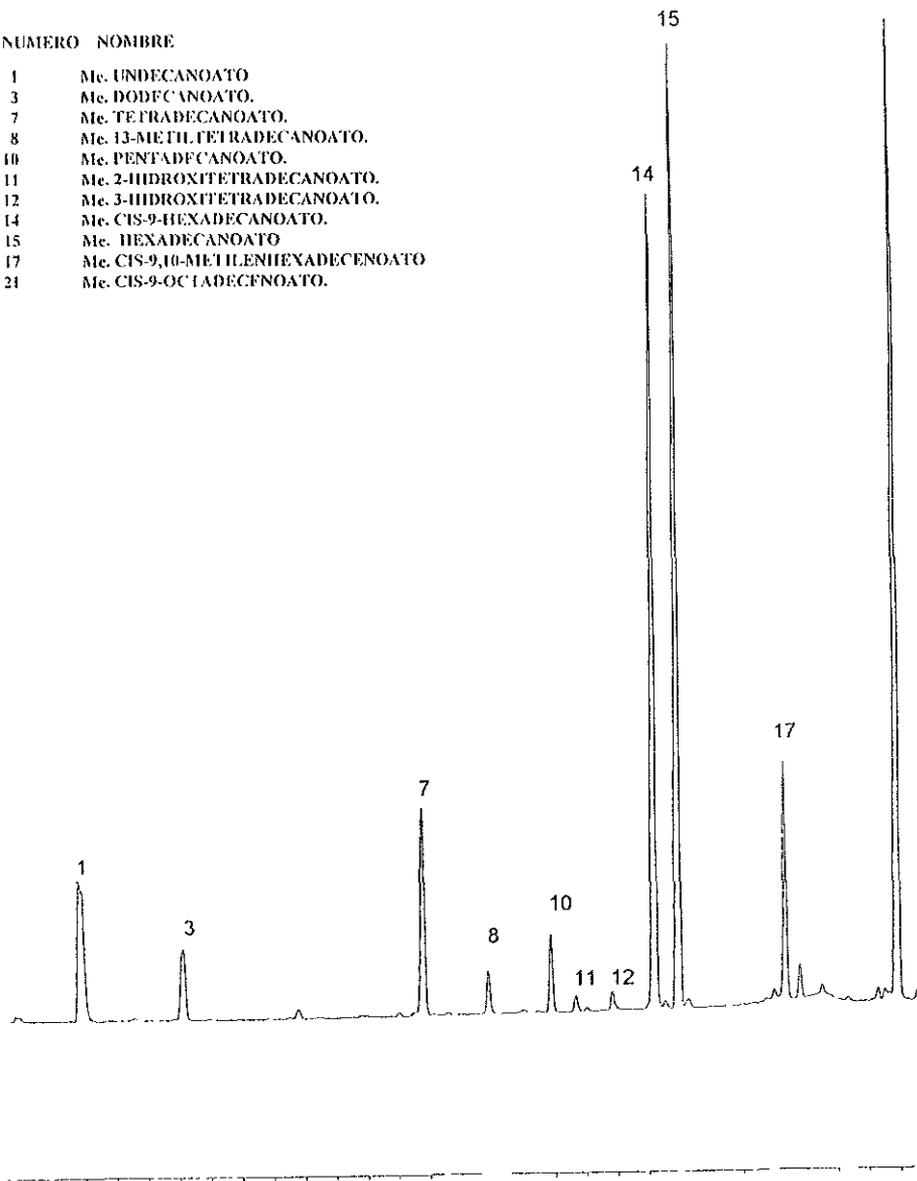


Fig. 15. Cromatograma de los ésteres metílicos obtenidos de los ácidos grasos de la membrana celular de *Salmonella sp* CEPA 58 analizados en una columna capilar modelo HP No. 19091B-102 Ultra 2, 5% de fenil metil silicona (25.0 m largo X 200 μm di. X 0.3 μm de espesor). Velocidad lineal del gas acarreador Nitrógeno 22.3 mL/min. Temperatura de la columna. calentamiento 5°C por minuto de 170°C hasta 270°C, 300°C durante 5 minutos. Temperatura del inyector. 250 °C. Temperatura del detector (FID) 270 °C. Split 50:1.

NUMERO NOMBRE

1	Me. UNDECANOATO
3	Me. DODECANOATO.
7	Me. TETRADECANOATO.
8	Me. 13-METILTETRADECANOATO.
10	Me. PENTADECANOATO.
11	Me. 2-HIDROXITETRADECANOATO.
12	Me. 3-HIDROXITETRADECANOATO.
14	Me. CIS-9-HEXADECANOATO.
15	Me. HEXADECANOATO
17	Me. CIS-9,10-METILENHEXADECENOATO
21	Me. CIS-9-OCTADECENOATO.

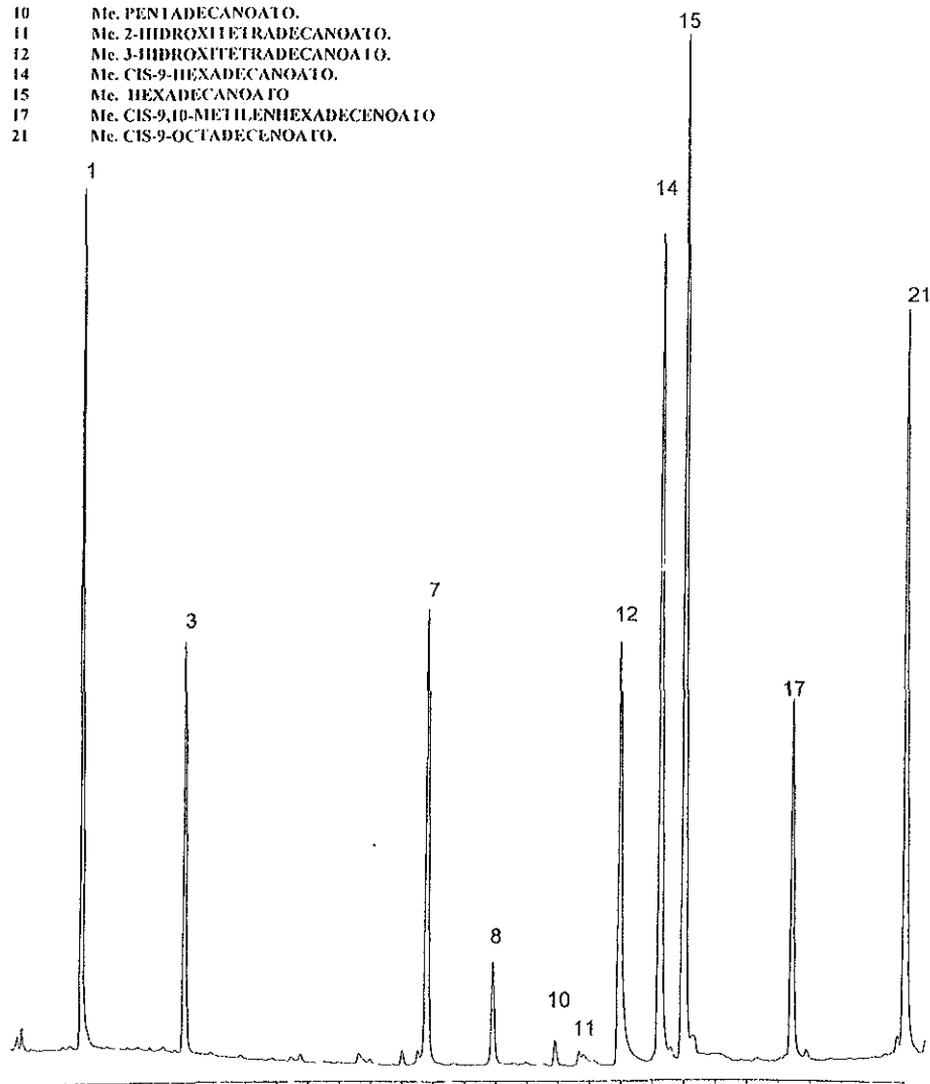


Fig. 16. Cromatograma de los ésteres metílicos obtenidos de los ácidos grasos de la membrana celular de *Salmonella sp* CEPA 59 analizados en una columna capilar modelo HP No 19091B-102 Ultra 2, 5% de fenil metil silicona (25.0 m largo X 200 μ m d.i. X 0.3 μ m de espesor). Velocidad lineal del gas acarreador Nitrógeno 22.3 mL/min. Temperatura de la columna: calentamiento 5°C por minuto de 170°C hasta 270°C, 300°C durante 5 minutos. Temperatura del inyector: 250 °C. Temperatura del detector (FID): 270 °C Split 50:1

Tabla 5. Principales ésteres metílicos identificados en las cepas aisladas marcadas como 049, 050,051,052,053, 054, 057, 058, y 059 de *Salmonella sp*

No. de pico del STD. SUPELCO	Fórmula	Ester metílico.	Acido graso correspondiente
1	C 11:0	Me. Undecanoato.	Undecanoico.
3	C 12:0	Me. Dodecanoato	Dodecanoico
7	C 14:0	Me. Tetradecanoato	Tetradecanoico
8	C i-15:0	Me. 13-metiltetradecanoato	13-metiltetradecanoico
10	C 15:0	Me. pentadecanoato	Pentadecanoico
11	C 2-OH 14:0	Me. 2-hidroxitetradecanoato	2-hidroxitetradecanoico
12	C 3-OH 14:0	Me. 3-hidroxitetradecanoato	3-hidroxitetradecanoico
14	C 16:1 ⁹	Me. Cis-9-hexadecenoato	Cis-9-hexadecenoico
15	C 16:0	Me hexadecanoato	Hexadecanoico
17	C 17:0 ⁷	Me Cis-9,10- metilhexadecenoato	Cis-9,10- metilhexadecenoico
21	C 18:1 ⁹	Me cis-9-octadecenoato	Cis-9-octadecenoico

** El número corresponde al cromatograma de la figura 6 de acuerdo al orden de elución en la columna de fenil metil silcona.

Tabla 6. Tiempos de retención normalizados con respecto a Me. hexadecanoato de cada uno de los ésteres metílicos aislados en las nueve cepas de *Salmonella sp.*

CEPA	049			050			051			052			053			054			057			058			059								
	F	X	m	F	X	m	F	X	m	F	X	m	F	X	m	F	X	m	F	X	m	F	X	m	F	X	m						
C 11:0	10	112	70.8	10	113	71.0	10	114	71.2	10	70.6	70.0	71.2	10	71.6	71.4	72.2	10	71.2	70.8	71.9	10	71.2	70.7	72.1	10	71.5	70.5	71.8	10	71.1	70.3	72.0
C 12:0	10	110	42.7	10	110	42.7	10	111	42.8	10	42.9	42.0	41.2	10	41.1	42.8	41.7	10	41.4	41.0	41.1	10	41.6	41.8	42.1	10	41.6	41.7	42.1	10	41.7	42.9	41.9
C 14:0	10	70.1	70.2	10	70.8	70.2	10	71.0	71.0	10	71.8	70.9	72.0	10	70.2	70.0	70.9	10	70.7	70.2	71.1	10	70.9	70.1	71.4	10	70.4	70.1	71.2	10	70.1	69.8	70.6
C 1-15:0	10	78.7	78.0	10	78.1	77.9	10	78.0	78.0	10	77.1	76.5	77.8	10	78.1	78.1	78.7	10	78.1	78.0	78.9	10	78.4	78.0	78.3	10	78.9	78.4	79.4	10	78.8	78.0	79.1
C 15:0	10	85.1	85.2	10	85.7	85.2	10	86.1	86.1	10	84.1	84.0	84.6	10	85.9	85.0	86.2	10	85.1	84.9	85.8	10	85.8	86.2	86.3	10	85.5	85.3	85.9	10	85.2	86.1	86.1
C 2-OH 14:0	10	88.1	88.0	10	88.3	88.0	10	88.6	88.6	10	87.9	87.0	88.8	10	88.9	88.5	89.2	10	88.9	87.9	89.2	10	88.7	88.0	89.1	10	88.6	88.2	89.1	10	88.1	88.0	88.9
C 3-OH 14:0	10	92.9	93.1	10	93.1	93.0	10	93.4	93.4	10	92.8	92.1	92.2	10	92.9	92.3	93.0	07	92.8	92.4	93.1	10	92.2	91.8	92.9	10	92.5	92.0	92.9	10	92.1	91.4	91.5
C 16:1 ⁹	10	97.0	96.8	10	97.1	96.5	10	97.8	97.8	10	96.9	96.5	97.7	10	97.8	97.2	98.2	10	97.7	97.0	98.5	10	97.6	97.2	98.0	10	97.5	97.1	97.8	10	97.4	97.2	98.3
C 16:0	10	100	100	10	100	100	10	100	100	10	100	100	100	10	100	100	100	10	100	100	100	10	100	100	100	10	100	100	100	10	100	100	100
C 17:0 ⁹	10	112.1	111.9	10	112.7	111.9	10	113.3	113.3	10	112.1	111.9	112.7	10	112.0	111.0	113.3	10	112.1	111.9	112.8	10	112.2	111.0	113.2	10	112.3	111.7	113.8	10	112.4	111.3	112.6
C 18:1 ⁹	10	125.1	124.5	10	125.1	125.0	10	125.5	125.5	10	124.5	124.3	125.9	10	127.6	126.9	127.8	10	125.7	124.9	126.2	10	125.5	124.7	125.6	10	125.9	125.1	126.0	10	125.7	125.0	126.4

F= frecuencia o número de veces en que se presenta en los cromatogramas, X =media aritmética, m=valor mínimo, M=valor máximo

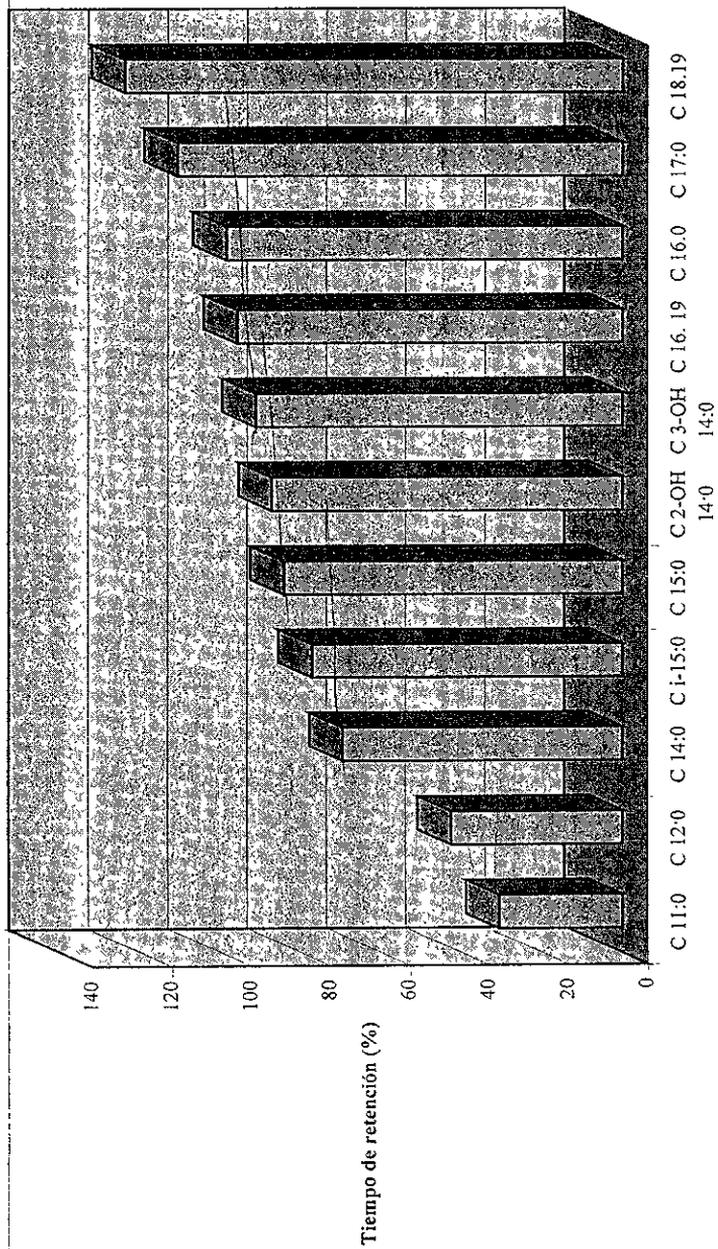
** Los valores fueron obtenidos de un promedio de 10 cromatogramas.

Tabla 7 Areas normalizadas con respecto a Me. hexadecanoato de cada uno de los ésteres metílicos aislados en las nueve cepas de *Salmonella sp.*

CEPA	049		050		051		052		053		054		057		058		059	
	X	M	X	M	X	M	X	M	X	M	X	M	X	M	X	M	X	M
C 11:0	39.2	38.7	39.5	39.4	39.2	39.5	39.3	39.7	39.6	39.2	39.3	39.9	39.5	39.7	39.6	39.3	39.5	39.4
C 12:0	24.1	24.6	26.2	26.3	27.7	29.1	26.9	26.9	24.5	26.9	24.8	24.7	24.5	23.9	29.6	29.2	30.5	29.4
C 14:0	28.8	29.1	29.6	29.7	31.4	30.3	30.2	31.5	31.5	23.8	22.2	24.3	18.9	25.6	40.7	26.5	28.4	29.3
C 1-15:0	6.4	5.7	6.5	7.9	6.4	6.7	5.8	4.6	6.1	4.9	4.4	5.8	2.1	3.1	4.5	5.8	6.3	7.2
C 15:0	6.2	5.9	6.6	7.6	6.9	7.6	6.6	4.6	6.7	4.3	3.7	4.4	3.7	4.5	6.4	7.1	3.8	4.3
C 2-OH 14:0	3.8	3.0	4.4	6.5	4.6	8.9	7.3	6.4	8.7	2.5	2.1	3.0	2.2	2.8	2.4	2.2	3.4	3.5
C 3-OH 14:0	3.0	2.5	3.1	5.3	4.5	5.8	40.5	39.6	40.4	10.6	9.3	10.8	5.5	4.8	6.1	2.1	1.8	3.4
C 16:1 ^o	68.0	67.3	69.2	76.0	73.1	78.4	92.9	92.1	93.1	94.8	93.4	95.1	9.3	8.7	9.9	91.8	91.1	92.2
C 16:0	106	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
C 17:0 ^o	22.2	21.7	23.1	24.0	23.6	24.3	24.7	24.1	26.2	18.2	17.8	18.7	21.1	22.5	30.2	31.1	45.3	44.2
C 18:1 ^o	93.3	92.1	93.5	67.8	68.4	68.1	95.2	94.1	95.5	39.5	29.4	31.1	69.2	71.3	89.4	97.6	97.3	98.5

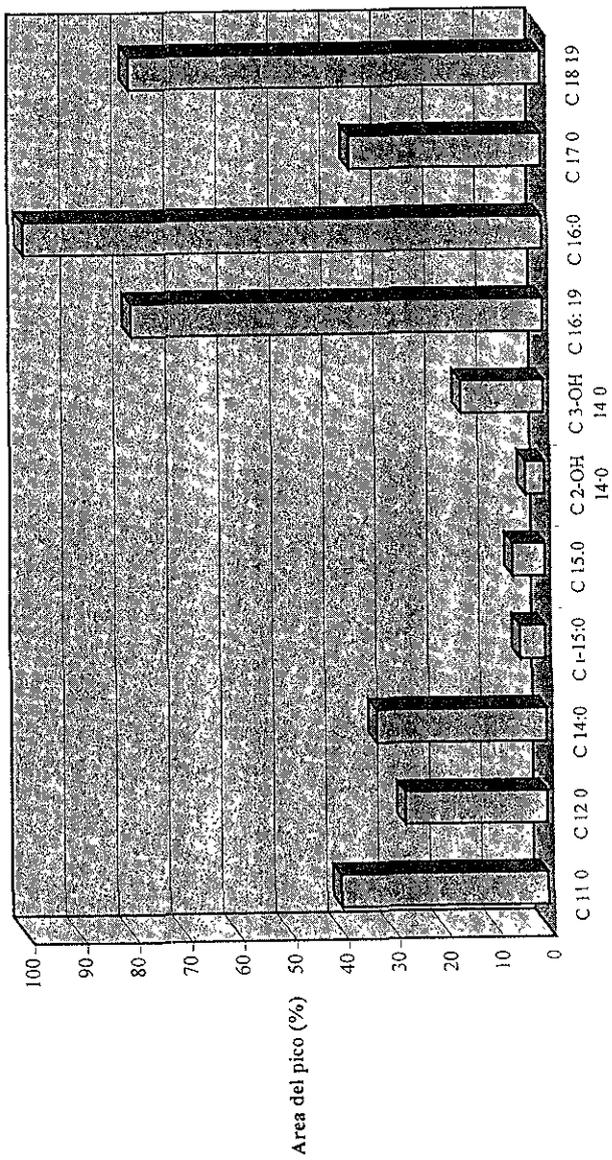
X = media aritmética, m=valor mínimo, M=valor máximo.

** Los valores fueron obtenidos de un promedio de 10 cromatogramas



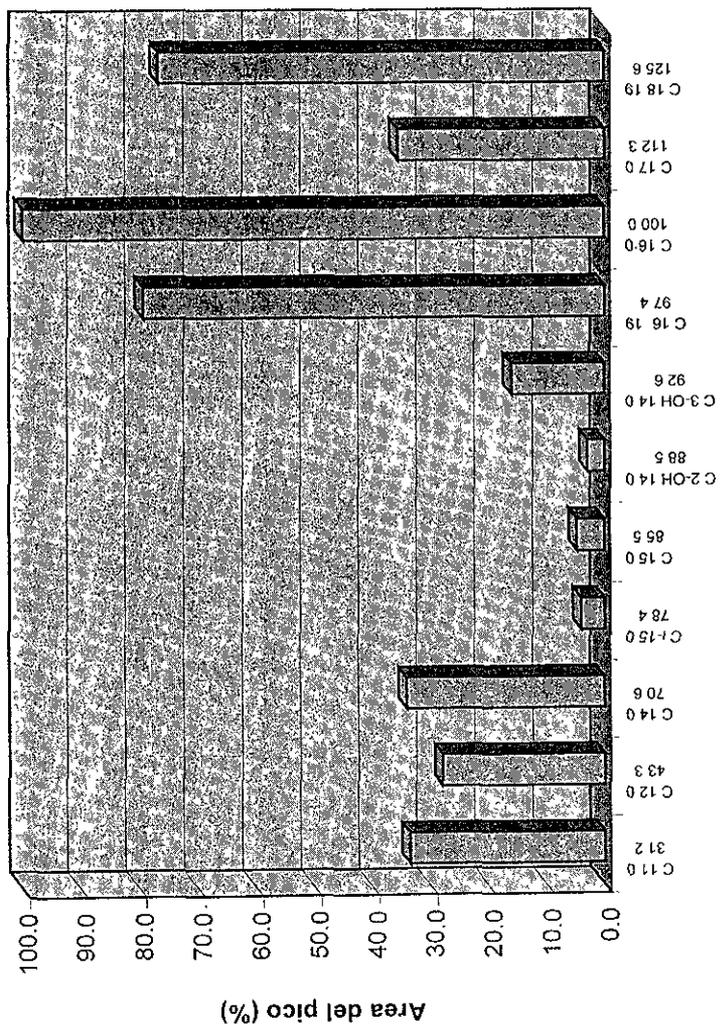
Ester metílico

Gráfica 4. Tiempo de retención promedio para las nueve cepas de *Salmonella* sp.



Ester metílico

Gráfica 5. Area del pico promedio para las nueve cepas de Salmonella sp.



Tiempo de retención para cada ester metílico (%)
 Gráfica 6. Perfil cromatográfico representativo para las nueve cepas de Salmonella sp.

9. DISCUSION

Para el análisis de la composición de los ácidos grasos celulares totales de *Salmonella typhi* se utilizó una columna capilar de sílice fundido, debido a que los isómeros iso y anteiso de los ácidos grasos con la misma longitud de carbonos y también los derivados hidroxilados y metilados presentes en bacterias gram negativas como es el caso del presente análisis, se separan completamente en esta columna. (66)

La separación de los componentes se logró en un tiempo total aproximado de 30 minutos; esta característica de la cromatografía de gases en cuanto a la rapidez del análisis, es debida primordialmente a la baja densidad del gas acarreador Nitrógeno(fase móvil), el cual permitió la difusión rápida del componente vaporizado en la columna, así como el equilibrio casi instantáneo logrado entre las fases, según Dabrio. (23)

El tiempo de retención es una propiedad característica para cada componente de la muestra, va desde la inyección de la muestra hasta el máximo del pico (30); este parámetro es importante ya que es característico de cada éster metílico y se incrementa de manera directa con el aumento en el número de carbonos de la cadena, además se mantiene constante con una fase líquida estable en condiciones constantes de operación referidas a la velocidad del flujo y la temperatura. Su importancia radica en su utilización para identificar cada componente, expresado como un pico en el cromatograma; por lo que este tiempo da la pauta para la identificación de los picos. Esta identificación se hizo comparando el cromatograma de la muestra problema contra un estándar conocido, como lo reporta Mc Nair (51), que se inyectó diariamente bajo las mismas condiciones del cromatógrafo en las que se analizaron las muestras de *Salmonella typhi*, así como también se tuvo especial cuidado en que la frecuencia de aparición de los picos no variara, lo cual es recomendado por Gehrke, 1963 (28).

Esto quiere decir que las condiciones bajo las cuales se manejó el cromatógrafo se mantuvieron constantes, permitiendo la migración diferencial entre los componentes; dicha migración depende, según Martin (50), en gran medida de las diferentes afinidades de los componentes por la fase estacionaria ya que los componentes con mayor afinidad se mueven con mayor lentitud a través de la columna y consecuentemente alcanzan el extremo final después de aquellos con afinidad relativamente menor, sin embargo también hay que tomar en cuenta que el orden de elución de los componentes va en sentido creciente tanto de su peso molecular como de el número de átomos de carbono de la cadena, también se debe tener presente que al llevar a cabo la metilación durante el proceso de esterificación la polaridad de los ácidos grasos aumenta, por lo que aunque tengan el mismo número de carbonos, e incluso menor, aparecen después como es el caso del 3-hidroxitetradecanoico que presenta 14 carbonos y sin embargo aparece después del pentadecanoico que tiene 15.

La comparación de los cromatogramas a partir de muestras esterificadas de los ácidos grasos de la membrana celular de *Salmonella typhi* cepa ATCC 0779 con el perfil de referencia de los ésteres metílicos de los ácidos grasos para la familia *Enterobacteriaceae*,

permitió la identificación de once picos característicos de un total de 24 picos que contiene el estándar comercial SUPELCO Cat 4-7080 Lote LA69713.

El tipo de ácidos grasos celulares presentes en *Salmonella typhi* son cadenas lineales saturadas e insaturadas, lo cual es característico de Enterobacterias. De los picos presentes, los correspondientes a los ácidos dodecanoico, tetradecanoico, hexadecanoico y octadecanoico, se han establecido como característicos de la familia *Enterobacteriaceae*, los cuales permiten incluir a *Salmonella typhi* dentro de esta según Boe, 1980 (6); Cecchini, 1968 (16) y Häusler, 1985 (34).

Debido a que la técnica utilizada es sensible a los cambios producidos durante su seguimiento, se realizaron estimaciones de valores máximos y mínimos alrededor del porcentaje del valor medio calculado para cada uno de los ésteres metílicos eluidos.

Por lo que respecta a los valores medios de los porcentajes de los tiempos de retención, se puede hablar en términos generales de once ésteres metílicos obtenidos que conforman el perfil lipídico, ya que no se observó traslape de picos y estos fueron perfectamente diferenciados, esta característica se tomó en cuenta basándose en lo reportado por Drucker, (25) cada uno de los ácidos se presentó en un tiempo determinado que mantuvo su constancia sin variaciones significativas.

La frecuencia con la que se presentaron el 13-metiltetradecanoato en la cepa de *Salmonella typhi* fue de 40 es decir se presentó en 40 de 50 cromatogramas por lo que aunque no estuvo presente en todos se tomó en consideración por presentarse en la mayoría de los cromatogramas además de presentar en todos los casos un área mayor al 1 %, según Erola (27), como es el caso del Me. 3-hidroxi tetradecanoato que presentó una frecuencia de 35, al igual que el Me. pentadecanoato y 2-hidroxi tetradecanoato que presentaron una frecuencia de 25, es decir que solo estuvo presente en 25 de los 50 cromatogramas obtenidos. Se incluyen estos ácidos grasos en base a lo reportado por Kaneda (45) en la que se atribuyen ligeras diferencias en los perfiles cromatográficos tanto en la presencia como en concentración de los ésteres metílicos obtenidos, debido a las condiciones experimentales en las cuales se llevó a cabo el análisis; cabe señalar que en un inicio se obtuvieron solo en algunos cromatogramas y una vez que se implementó completamente la técnica utilizada se presentaron de manera consecutiva en todos los demás cromatogramas. También se consideró para la inclusión de estos picos lo reportado por Moss (56) y Sinesky (64) que señalan la influencia de la edad del cultivo sobre la producción metabólica de los ácidos grasos, aquí cabe aclarar que la cepa utilizada en este estudio provenía de un cultivo refrigerado ya por demasiado tiempo. Por último se tomó en cuenta las propiedades químicas de los ésteres metílicos ya que pueden existir variaciones debido a las estructuras químicas que son estructuras inestables que bien pueden descomponerse al entrar en contacto con el detector de ionización de flama, por otra parte se puede relacionar con lo dicho por Tuppie (68), quien menciona que la variación en la abundancia de los hidroxiacidos puede explicarse a partir del tipo de columna y el tiempo de uso, ya que en columnas capilares de sílice fundido como la que se utilizó en el presente estudio y cuyo uso haya sido extensivo, el análisis de los ácidos grasos de enterobacterias se afecta variando los resultados, por lo que es necesario tener muy presente el tiempo de vida media de las columnas.

La mayoría de los ácidos grasos presentes en *Salmonella typhi*, son cadenas lineales saturadas, aunque también hay ácidos grasos de cadenas insaturadas, así como metilaciones e hidroxilaciones. Este estudio concuerda con los reportados por Boe (6) y Cecchini (16), que indican la ausencia de cadenas ramificadas, polinsaturadas y oxigenadas para la familia *Enterobacteriaceae*.

Las cadenas insaturadas de los ácidos grasos del perfil obtenido sólo presentan una doble ligadura, lo cual concuerda con lo reportado anteriormente, esto es característico de las bacterias gram negativas según lo reportado por Boon, 1977 (7); el cual establece que la posición de la doble ligadura se considera necesaria en aspectos de biosíntesis; esta característica se utiliza como guía para la clasificación taxonómica de bacterias.

Por lo que se refiere al análisis cualitativo, el método empleado resulta adecuado ya que se lograron caracterizar once ácidos grasos que representan el perfil de *Salmonella typhi*.

El análisis por cromatografía gas líquido es una técnica valiosa para caracterizar muchas especies de bacterias como lo reporta Moss (58); esto se usa subsecuentemente para ayudar a la identificación y clasificación de una gran variedad de microorganismos, incluyendo miembros de la familia *Enterobacteriaceae*.

Las ventajas de la cromatografía, como lo reporta Martin (50), son su sensibilidad extrema, que permite separar mezclas de cantidades muy pequeñas, y el hecho de que las columnas puedan usarse repetidamente, aunque como se dijo con anterioridad se debe tener presente el tiempo de vida media de la columna ya que nos puede llevar a reportar resultados variables; otra de las ventajas que presenta la cromatografía gas-líquido es la de proponer mayor exactitud en menos tiempo, ya que en la práctica se ha demostrado que los métodos en la identificación bacteriana proveen una amplia información que en ocasiones por razones técnicas y de tiempo no se utilizan totalmente, además de implicar mayor trabajo en el laboratorio según lo reportado por Häusler (33) y Holmes (36), ya que para conocer con precisión las características bioquímicas de una determinada especie es necesario probar muestras amplias y diversas de cepas aunque en años recientes se ha hecho un esfuerzo para acelerar y simplificar la identificación introduciendo varios métodos por micropruebas bioquímicas, tales como el sistema comercial API, que permite una automatización parcial de los procesos y la aplicación de métodos por computadora, la identificación aún permanece muy complicada pues se basa en el mismo principio que es la investigación de las propiedades bioquímicas de los microorganismos, es por esto que la ventaja de la técnica por cromatografía de gas-líquido consiste en el análisis principalmente de la composición química de los microorganismos, básicamente ácidos grasos constituyentes de los lípidos de la membrana en las bacterias, haciendo una perfecta separación de los posibles componentes de la muestra analizada, con una mínima demanda de tiempo así como su expresión cuantitativa.

No obstante la sola caracterización cualitativa no es del todo suficiente para establecer un perfil lipídico de la especie analizada, por lo que es mejor recurrir a complementar con el análisis cuantitativo donde se asocia la abundancia relativa en términos de su área normalizada.

El análisis cuantitativo presentó enormes diferencias entre los datos de los promedios de las áreas, mínimos y máximos obtenidos. Algunos autores como Gottschalk (31) indican que los ácidos grasos son los componentes básicos de los lípidos de todos los microorganismos y que el área bajo la curva que presentan estos depende de la cantidad de muestra inyectada, considerando que en un inicio no se contaba con un sistema adecuado de concentración de la muestra este factor no se descarta como probable fuente de variaciones, también se señala como fuente de variación en las áreas obtenidas, la posibilidad de que sean lípidos variables a nivel de ruta metabólica como ya lo han señalado Cookson (21) y Jones (42). Así mismo Moss (55) señala que existen ácidos grasos en los diferentes grupos de bacterias que tienden a presentar alteraciones en su abundancia como respuesta a la regulación genética en la construcción de lípidos celulares en microorganismo, la variación temporal en la abundancia de los lípidos celulares es aún un campo poco conocido y requiere mayor investigación.

Los resultados del área bajo la curva permiten establecer que el ácido graso hexadecanoico es el que se presenta con mayor abundancia en *Salmonella typhi* al igual que en otros microorganismos como *Enterobacter agglomerans*, *Salmonella choleraesuis* y *Escherichia coli*, que también pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*. (17, 67,72)

Referente al perfil cromatográfico de las nueve cepas aisladas de *Salmonella sp* se observó que éstas presentaron el mismo perfil de once ésteres metílicos que la cepa ATCC 0779 de *Salmonella typhi*. En el análisis cualitativo se observó que las nueve cepas presentaron tiempos de retención promedio, mínimos y máximos semejantes entre sí, y que no difieren de los valores obtenidos para la cepa tipo representados por las barras.

Respecto al análisis cuantitativo los valores obtenidos para el área bajo la curva de cada éster metílico presentan una gran diferencia entre las nueve cepas aisladas, siendo el único éster metílico más abundante y que presenta el área constante el hexadecanoato, estas variaciones, como ya se explicó anteriormente se atribuyen a variaciones metabólicas.

Con base en los estudios reportados por Drucker (25) se asevera que el perfil cromatográfico de la composición de los ésteres metílicos de los ácidos grasos en las bacterias representan la "huella digital" de estas.

En los resultados del presente estudio se obtuvo el perfil cromatográfico de *Salmonella typhi* cepa ATCC 0779 con la siguiente constitución de ácidos grasos: C 11:0, C 12:0, C 14:0, C 15:0, C 16:1^o, C 16:0, C 17:0^o, C 18:1^o; con los siguientes nombres respectivos: undecanoico, dodecanoico, tetradecanoico, 13-metiltetradecanoico, pentadecanoico, 2-hidroxitetradecanoico, 3-hidroxitetradecanoico, cis-9-hexadecanoico, hexadecanoico, Cis-9,10-metilenhexadecanoico, cis-9-octadecanoico, presentado en la Gráfica 3, así como la identificación, utilizando este perfil como referencia de nueve cepas aisladas a partir de aguas residuales provenientes del Gran Canal de la Ciudad de México, identificadas primero como *Salmonella sp* por API 20 E y posteriormente con ayuda de esta técnica cromatográfica como *Salmonella typhi* en un menor tiempo y con una mayor precisión que por un análisis tradicional de micropruebas

10. CONCLUSIONES

- I. Los resultados del presente estudio permiten identificar a *Salmonella typhi* a partir de la técnica de análisis de ésteres metílicos de los ácidos grasos celulares por Cromatografía Gas-líquido ya que cada microorganismo posee su propia "huella química" que le permite diferenciarse de otros.
- II. El perfil presentado se puede tomar como criterio quimiotaixonómico y utilizarse a nivel de identificación de especie para la identificación de *Salmonella typhi*.
- III. La técnica utilizada en este trabajo es útil para identificar *Salmonella typhi* en aguas crudas residuales y puede adaptarse como técnica de rutina para una identificación rápida, confiable además de ofrecer una alternativa a las pruebas bioquímicas que requieren más tiempo y que son menos precisas.
- IV. El análisis realizado en el presente estudio pone de manifiesto por primera vez (de acuerdo a la revisión bibliográfica realizada), la composición de los ácidos grasos presentes en la membrana celular de *Salmonella typhi*, contribuyendo así al conocimiento de esta célula bacteriana a nivel bioquímico.
- V. Los resultados obtenidos en este trabajo permitieron cumplir de manera satisfactoria con el objetivo principal y los particulares planteados inicialmente.

11. PROPUESTAS

- I. Deben de realizarse estudios más profundos sobre la regulación en síntesis de los *lipidos bacterianos* a nivel bioquímico para determinar las variaciones en cuanto a concentración de los diferentes ácidos grasos de la membrana celular de bacterias.
- II. Se sugiere probar esta técnica para otras especies de *Salmonella* con la finalidad de apreciar las diferencias que existen en los ácidos grasos dependiendo la especie y el serotipo al que pertenecen
- III. Realizar la validación del método con la finalidad de comprobar que cumple con los parámetros mínimos necesarios establecidos para métodos analíticos.
- IV. Evaluar esta técnica en cepas de *Salmonella* aisladas de diferentes ambientes, no solo de aguas residuales, para determinar la influencia del medio sobre la producción de ácidos grasos tanto en cantidad como en presencia o ausencia de los mismos.
- V. Para estudios posteriores con esta técnica se sugiere realizar la evaporación con Nitrógeno y el sellado con cinta teflón de los tubos factores importantes que no están señalados en la bibliografía consultada.

ESTA TESIS NO DEBE
CALAR DE LA BIBLIOTECA

12. ANEXO

REACTIVO 1

Reactivo para saponificación.

- 45 g de Hidróxido de Sodio
- 150 mL de Metanol
- 150 mL de Agua destilada

REACTIVO 2.

Reactivo para metilación.

- 325 mL de ácido Clorhídrico 6.0 N
- 275 mL de metanol.

REACTIVO 3.

Reactivo para extracción.

- 20 mL de hexano.
- 2000 mL de metil-terbutil-éter.

REACTIVO 4.

Reactivo para lavado.

- 10.8g de Hidróxido de sodio.
- 900 mL de agua destilada.

13.BIBLIOGRAFIA.

1. Abel, K., De Sechmertzing, H. & Peterson, J. I. 1963. Classification of microorganisms by analysis of chemical composition easibility of utilizing gas chromatography J. Bacteriol. 85: 1039-1044.
2. Ahmad, S., Weisburg, G. W. & Jensen, R. A. 1990. Evolution of aromatic amino acid biosynthesis and application to the fine-tuhed phylogenetic positioning of enteric bacteria. J. Bacteriol. 172: 1051-1061.
3. Amstein, C. F. & Hartman, P. A. 1973 Differentiation of some enterococci by gas chromatography. J. Bacteriol. 133: 38-41.
4. Bender, G. 1987. Métodos instrumentales de análisis en Química clínica. Ed. Acribia. Zaragoza.p.p.225-250.
5. Blanco, A. 1988. Química Biológica. Ed. El Ateneo. Argentina.
6. Boe, B. & Gjerde, J. 1980. Fatty acid patterns in the classification of some representative of the families *Enterobacteriaceae* and *Vibrionaceae*. J. Gen. Microbiol. 116: 41-49.
7. Boon, J., Leew, J. W., Hock, G. J. & Vasjan, J. H. 1977. Significance and taxonomic value of Iso and Anteiso monoenoic fatty acids and branched α -hydroxy acids in *Desulfovibrio desulfuricans*. J. Bacteriol. 129 (3): 1183-1191.
8. Bousfield, I. J., Smith, G. L., Dando, T. R. & Hobbs, G. 1983. Numerical analysis of total fatty acid profiles in the identification of coryneform, nocardioform and some other bacteria. J. Gen. Microbiol. 129: 375-394.
9. Brian, B. L. & Gardner, E. W. 1967. Preparation of bacterial fatty acid methyl esters for rapid characterization by gas liquid chromatography. Appl. Microbiol. 15: 1499-1500.
10. Britton, G. Waste Water Microbiology. Edit. Wiley-Liss. USA.
11. Brooks, J. B., Moss, W. C. & Dowel, V. R. 1969. Differentiation between *Clostridium sordelii* and *Clostridium bifermentans* by gas chromatography. J. Bacteriol. 100: 528-539.
12. Brooks. J. B., Kellogg, D. S., Thacker, L. & Turner, E. M. 1971 Analysis by gas chromatography of fatty acids found in whole cultural extracts of *Neisseria* species. Can. J. Microbiol. 17: 537-543.
13. Brondz, I., Olsen, I. & Sjm, M 1989 Gas chromatography assessment of alcoholized fatty acids from yeasts a new chemotaxonomic method. J. Clin Microbiol. 27: 2815-2819.

14. Carpenter, P., 1979. Microbiología. 4a Ed. Interamericana. México
15. Canonica, F., & Pisano, M. 1989. GL-C Analysis of fatty acids methyl esters of *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria* and *Aeromonas caviae*. J. Clin. Microbiol. 4:681-685.
16. Cecchini, G. L. & O'Brien, R. T. 1968. Detection of *Escherichia coli* by gas chromatography. J. Bacteriol. 95: 1205-1206.
17. Cerero, C.M:A:1992. Análisis de los ésteres metílicos de los ácidos grasos celulares de *Enterobacter aerogenes* por Cromatografía Gas-Líquido. Tesis de Licenciatura en Biología ENEP Iztacala. UNAM México.
18. Cerezo, G. Gutierrez, E., Valdespino, G. 1993. Diagnóstico de laboratorio de infecciones gastrointestinales. S.S.A. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. México.
19. Clark. A. J., Burger, A. C. & Sabatino, E. L. 1982. Characterization of indicator bacteria in municipal raw water, drinking water and new main samples. Can. J. Microbiol. 28: 1002-1013.
20. Clesceri, L., Greenberg, E., & Trussell, R. 1989. Standard Methods for the examination of water and wastewater. 17th Ed. American Public Health Association. USA.
21. Cookson, B., Talsania, S., & Philips, I. 1989. A qualitative and quantitative study of cellular fatty acids of *Streptococcus milleri* with capillary Gas Chromatography. J. Gen Microbiol. 135: 831-838.
22. Davis, L. Dulbecco, L. 1996. Tratado de microbiología. 4ta. Ed. Masson. Barcelona.
23. Dabrio, M. V. 1973. Cromatografía de gases II. Ed. Alhambra. Madrid.
24. De Simón Serra, M., Ferrer, E. D., Dericos, B. E. & Fernández, P. F. 1986. Study of microbiological contamination of cacao derived and products. Ann Bromatology. 37: 341-349.
25. Drucker, D. B., Griffith, C. J. & Melville, T. II. 1973. Fatty acids fingerprints of *Streptococcus mutans* grown in chemostat. Microbios. 7:17-23.
26. Edwards, P. R. & Ewing, W. H. 1962. Identification of *Enterobacteriaceae*. 2nd Ed. Burgess Publishing Co. Minneapolis Minn.
27. Erola, E. & Lehtonen, O. 1988. Optimal data processing procedure for automatic bacterial identification by gas-liquid chromatography of cellular fatty acids. J. Clin. Microbiol. 9: 1745-1753.
28. Gehrke, C. W. & Goerlitz, D. F. 1963. Quantitative preparation of methyl esters of fatty acids for gas chromatography. Analyt. Chem. 35: 76-80

29. Glass, R. L. 1971. Alkohlisis, Saponification and preparation of fatty Acids Methyl Esters. *Lipids*. 6 919.
30. González. A. 1987. Fundamentos teóricos y principios de la cromatografía en fase de vapor. Proyecto de conservación y mejoración del ambiente. ENEP Iztacala. UNAM. México
31. Gottschalk, G 1979. *Bacterial metabolism*. Springer Verlag Ed. New York.
32. Gurr, M. I. & James, A. T. 1980 Fatty acids, In *Lipid Biochemistry: and introduction*. p. 18-88. Chapman & Hall, New York.
33. Häusler, J. & Richter, V. 1983. A process of identification microorganism using chromatography. UKpatent application GB 2 121-434 A.
34. Häusler, J. & Richter, V. 1985. Identification of bacteria of family *Enterobacteriaceae* by gas chromatography. Separatum, Publishing House of the Hungarian Academy of Sciences. Budapest.
35. Häusler, J & Richter, V 1989. Identification of *Pseudomonas* Insolated from water by chromatography. V Curso Simposium Internacional sobre Biología de la contaminación. UNAM, ENEP-IZTACALA, SEDUE, IPN. México.
36. Holmes, B., Willcox, W. R. & Lapage, S. P. 1978. Identification of *Enterobacteriaceae* by the API 20E System. *J. Clin Pathol*. 31: 22-30.
37. James, A. T. & Martin, J P. 1956. Gas-liquid chromatography: The gas-density meter, a new apparatus for the detection of vapours in flowing gas streams. *J. Biochem* 63: 138-143.
38. James, A. T. & Martin, J. P. 1956. Gas-liquid chromatography: The separation and identification of methyl esters of saturated and unsaturated acids from formic acid to n-octadecanoic acid. *J. Biochem*. 63: 144-152.
39. Janzen, E., 1984. Analysis of cellular components in bacterial classification and diagnosis, p. 257-302. In G. Odhan L. Larson, and P. A. Mardh (ed.), *Gas chromatography mass spectrometry applications in microbiology*. Plenum Publishing Corp. New York.
40. Jantzen, E., Bryn, K., & Bovre, K.1974. Gas chromatography of bacterial whole cell methanosylates. *Acta Pathol Microbiol. Scand Sect. B* 82:753-766.
41. Johnson, L. L., McFarland, L., Dearing, P, Raisys, V. & Shoenknecht, F. D. 1989 Identification of *Clostridium difficile* in stool specimens by culture-enhanced gas-liquid Chromatography. *J. Clin. Microbiol*. 27: 2218-2221.
42. Jones, D. 1988. Composition and Propierties af the Family *Enterobacteriaceae* *J. Appl. Bacter. Symp. Supp.* 1S-19S

43. Kaneda, T., 1962. Biosynthesis of branched chain fatty acids: Isolation and Identification of fatty acids from *Bacillus subtilis* ATCC 7059. J. Biol. Chem. 238: 1222-1228.
44. Kaneda, T., 1967. Fatty acids in the genus *Bacillus*: Iso and anteiso fatty acids as characteristic constituents of lipids in 10 species. J. Bacteriol. 93: 894-903.
45. Kaneda, T., 1971. Factors affecting the relative ratio of fatty acids in *Bacillus cereus*. Can J. Microbiol. 17: 269-275.
46. Koneman, M. 1997. Diagnóstico microbiológico. 3era. Ed Panamericana. México.
47. Lambert, M., Brenner, J., Farmer, J. , & Moss, W. 1983. Differentiation of *Vibrionaceae* Species by Their Cellular Fatty Acid Composition. Int. J. System. Bac. 33(4)777-792.
48. Lehninger, A. L. 1979. Bioquímica. 2a Ed. ENUSA. Barcelona.
49. Loiraine, S. A., 1980. Fundamentos de microbiología. ENUSA. Barcelona.
50. Martin, W. D., Mayes, A. P., Rodwell, W. V. y Granner, K. D. 1986. Bioquímica de Harper. 10a Ed. El manual moderno. México.
51. Mc Nair, H. M. & Bonelli, E. J. 1968. Basic gas chromatography. Varian Co. Consolidate Printers, Berkeley, California 123-125.
52. Monteoliva-Sanchez, M., Ferrer, M. R., Ramos, C. A., Quesada, E. & Monteoliva. M. 1988. Cellular fatty acid composition of *Deleya halophila*: effect of growth temperature and salt concentration. J. Gen. Microbiol. 134: 199-203.
53. Moss, C. 1988 Cultural and chemical characterization of CDC groups EO-2, M-5 an M-6 *Moraxella* species, *Oligella urethralis*, *Acinetobacter* species, and *Psychrobacter immobilis*. J. Clin. Microbiol. 26:484-492.
54. Moss, C. W. & Dees, S. B. 1975. Identification of microorganisms by gas chromatographic-mass spectrometric analysis of cellular fatty acids. J. Chromatogr. 112: 595-604.
55. Moss, C. W., Dees, S. B. & Guerrant, G. O. 1980. Gas-liquid chromatography of bacterial fatty acids with a fused-silica capillary column J. Clin. Microbiol. 12: 127-130.
56. Moss, C. W. & Montiel, N. L. 1982 Analysis of short-chain acids from bacteria by gas-liquid chromatography with a fused-silica capillary column. J. Clin. Microbiol. 15: 308-311.
57. Moss, C. W., Samuels, S. B., Liddle, J. & McKinney, R. M. 1988. Occurrence of branched-chain hydroxy fatty acids in *Pseudomonas malthophilia*. J. Bacteriol. 114(3): 1018-1024.
58. Moss, C., & Shinoda, T. 1982. Determination of cellular fatty acid compositions of various yeasts by gas-liquid chromatography J. Clin Microbiol. 16:1073-1079.

59. Okuyama, H., Sasaki, S., Higashi, S. & Murata, N. 1990. A transunsaturated fatty acid a psychrophilic bacterium. *Vibrio sp* strain ABE-1. *J. Bacteriol* 172: 3515-3518.
60. O'Leary, W. W. 1962. The fatty acids of bacteria. *J. Bacteriol.* 26: 421-447.
61. Rasoamanjara, D., Peladan, F., Turlot, C. J., Monteil, H. & Richard, C. 1986. Characterization of *Flavobacterium* species by analysis of volatile fatty acids production. *J. Gen. Microbiol.* 132: 2723-2732.
62. Rodier, J. 1987. Análisis de las aguas. Ed. Omega. España.
63. Schleichner, K. H., et al. 1983. Molecular systematics of prokaryotes. *Ann. Rev. Microbiol.* 37: 143-171.
64. Sinensky, M. 1971. Temperature control of phospholipid biosynthesis in *E. coli*. *J. Bacteriol.* 106:449-495.
65. Sommenwirth A. 1984. Métodos y Diagnóstico del Laboratorio Clínico. Tomo 2. Ed. Medica -Panamericana. México.
66. Storch de Gracia, J. M. 1975. Fundamentos de cromatografía de gases. 2a Ed. Alhambra. Madrid.
67. Torres, V. 1995. Análisis de los ésteres metílicos de seis enterobacterias. Tesis de Doctorado en Biología. Facultad de Ciencias. UNAM. México.
68. Tuppic, M. L. 1982. Single derivation method for routine analysis of bacterial whole-cell fatty acid methyl esters, Including Hydroxy Acids. *J. Clin. Microbiol.* 16:584-586.
69. Urdaci, M., Marchand, M. & Grimont, R. 1990. Characterization of 22 *Vibrio* Species by Gas Chromatography Analysis of their Cellular Fatty Acids. *Res. Microbiol.* 141: 437-452 .
70. Verhulst, A., Van Hespden, H., Symons, F. & Eyssen, H. 1987. Systematic Analysis of the long-chain components of *Eubacterium lentum*. *J. Gen. Microbiol* 133: 275-286.
71. Veys, A., Callewaert, W., Waelkens, E. & Van Den Abbeele, K. 1989 Application of gas-liquid chromatography to the routine identification of nonfermenting gram-negative bacteria in clinica specimenens. *J. Clin. Microbiol.* 7: 1538-1542.
72. Yañez, N. I. 1992. Análisis por Cromatografía Gas-Líquido de los ácidos grasos totales de *Enterobacter agglomerans*. Tesis de Licenciatura en biología. ENEP Iztacala UNAM. México.