



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

TESIS

**ADAPTACION DE LA TECNICA CROMATOGRAFICA
PARA LA IDENTIFICACION DE BACTERIAS PATOGENAS
AISLADAS DEL AMBIENTE**

PRESENTADA POR:

BIOL. ISAURA YAÑEZ NOGUEZ

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN MICROBIOLOGIA

DIRIGIDA POR:

DRA. MARIA TERESA ORTA LEDESMA

279816

Cuautitlán Izcalli, JUNIO



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado designado para obtener el grado:

Presidente: DR. ABEL CIPRIAN CARRASCO

Vocal: DRA. SILVIA GIONO CEREZO

Secretario: DRA. MARIA TERESA ORTA LEDESMA

Primer suplente: M. C. ALMA VIRGINIA LARA SAGAHON

Segundo suplente: M. C. PEDRO RAMIREZ GARCIA

AGRADECIMIENTOS:

Al Instituto de Ingeniería de la UNAM, por las facilidades otorgadas durante la realización estudio, especialmente a la Dra. Ma. Teresa Orta Ledesma.

A los integrantes del jurado por su tiempo, valiosas observaciones y sugerencias.

Con mucho más amor a mi esposo:

Chipigonio: una vez más, gracias por todo tu apoyo, por tu cansancio invaluable después de una larga jornada, por seguir confiando en mí, por que me has comprendido siempre, por ese tiempo que no te he dedicado y sobre todo por el amor que permanece con nosotros.

Con el más grande amor para mi hijo:

Millito: por que aún sin entender esperas el fin de mi jornada, por tu mirada impaciente que me alienta a seguir luchando, por ese tiempo que tampoco te he concedido y naturalmente por el amor que recibo día con día.

A mis padres y hermanos:

A ustedes, papá y mamá por su amor incondicional y su ejemplo de vida.

Por su amor y comprensión.

Por la unión que nos caracteriza y que espero sea perdurable.

A la familia Vargas Zamora:

Gracias por el apoyo brindado, ya que sin él habría sido muy difícil conseguir esta meta.

Con cariño I

Capítulo 1. TABLA DE CONTENIDO

Capítulo 1. TABLA DE CONTENIDO	
Capítulo 2. RESUMEN	
Capítulo 3. INTRODUCCION	
Capítulo 4. ANTECEDENTES	
4.1 Importancia de las bacterias patógenas en el ambiente.....	
4.2 Generalidades de <i>Vibrio cholerae</i>	
4.2.1 Características particulares de <i>Vibrio cholerae</i>	
4.2.2 Cuadro clínico.....	
4.2.3 Epidemiología.....	
4.2.4 Determinantes de patogenicidad.....	
4.2.5 Características coloniales.....	
4.2.6 Pruebas bioquímicas diferenciales.....	
4.2.7 Serología.....	
4.3 Generalidades de <i>Salmonella</i>	
4.3.1 Características particulares de <i>Salmonella</i>	
4.3.2 Cuadro clínico.....	
4.3.3 Epidemiología:.....	
4.3.4 Determinantes de patogenicidad.....	
4.3.6 Características coloniales.....	
4.3.7 Pruebas bioquímicas diferenciales.....	
4.4 Importancia del tratamiento de aguas en bacteriología ambiental.....	
4.5 Métodos convencionales para la identificación de bacterias.....	
4.6 Fundamentos de cromatografía de gases.....	
4.7 Cromatografía de gases en bacteriología.....	

4.8 Lípidos en bacterias	
4.9 Acidos grasos constituyentes de la célula bacteriana.....	
4.9.1 Nomenclatura de los ácidos grasos.....	
4.9.2 Esterificación de ácidos grasos.....	
Capítulo 5. OBJETIVOS.....	
General.....	
Particulares.....	
Alcances.....	
Capítulo 6. JUSTIFICACION.....	
Capítulo 7. METODOLOGIA.....	
7.1 Siembra de hisopos en agua residual.	
7.2 Aislamiento de <i>Vibrio cholerae</i>	
7.2.1 Prueba de oxidasa.	
7.2.2 Identificación por API (Analytical Profile Index) 20E.	
7.2.3 Serología de <i>Vibrio cholerae</i>	
7.2.4 Determinación de la toxina colérica.	
7.3 Aislamiento de <i>Salmonella typhi</i>	
7.2.1 Prueba de oxidasa.	
7.2.2 Identificación por API (Analytical Profile Index) 20E.	
7.3 Conservación de cepas.....	
7.4 Cepas de referencia.....	
7.5 Extracción de los metil ésteres de los ácidos grasos celulares.....	
7.6 Análisis cromatográfico.....	
Capítulo 8. RESULTADOS.....	
8.1. Aislamiento de <i>Vibrio cholerae</i>	
8.1.1 Prueba de oxidasa.	
8.1.2 Identificación por API (Analytical Profile Index) 20E.	

8.1.3 Serología de *Vibrio cholerae*
8.1.4 Determinación de la toxina colérica.
8.2 Aislamiento de *Salmonella typhi*
8.2.1 Prueba de oxidasa.
8.2.2 Identificación por API (Analytical Profile Index) 20E.
8.3 Conservación de cepas.
8.4 Identificación de las bacterias mediante sus ésteres metílicos.....

Capítulo 9. DISCUSION.....

Capítulo 10. CONCLUSIONES.....

Capítulo 11. RECOMENDACIONES.....

Capítulo 12. BIBLIOGRAFIA.....

Capítulo 13. ANEXO.....

Capítulo 2. RESUMEN.

El uso de métodos inadecuados de tratamiento y saneamiento del agua, permite la proliferación de bacterias patógenas que provocan enfermedades de tipo gastrointestinal; los principales agentes etiológicos causantes de estas enfermedades, se encuentran *Vibrio cholerae* y *Salmonella typhi*, dichas bacterias, se transmiten principalmente por vía hídrica y en algunos casos por el consumo de verduras crudas contaminadas que han sido regadas con aguas no tratadas.

La presencia de estas bacterias patógenas en el agua residual trasciende debido a que las enfermedades diarreicas continúan representando una de las primeras causas de morbilidad en menores de 5 años en nuestro país, además del limitado progreso que en materia de saneamiento ambiental existe en los países en desarrollo.

La detección y aislamiento de dichas bacterias resulta difícil en muestras ambientales, a diferencia de las muestras clínicas la densidad de bacterias es baja, además de permitir que las bacterias sometidas a cierto tipo de estrés por las condiciones del medio. Las técnicas tradicionales de aislamiento e identificación de bacterias patógenas implican invertir mucho tiempo en el laboratorio, lo que se traduce en un aumento de costos. Por lo que es necesario acelerar el progreso de los procedimientos de identificación de los microorganismos que afectan directamente al hombre y su ambiente.

El desarrollo de la tecnología, ha permitido un incremento en la aplicación de técnicas instrumentales; y ha hecho posible que los microbiólogos, utilicen la cromatografía gaseosa para desarrollar metodologías que permitan auxiliar e incluso sustituir los métodos convencionales de identificación y diferenciación en microbiología.

La técnica por cromatografía de gases ofrece esta alternativa, ya que dentro del campo amplio que tiene dicha técnica, se han incrementado las investigaciones sobre los constituyentes de las células bacterianas.

El objetivo principal de esta investigación fue implementar una metodología para el análisis de los ácidos grasos celulares de bacterias patógenas presentes en agua residual, aplicando la cromatografía de gases. De tal forma que, se complementen los estudios sobre la calidad del agua utilizando técnicas de vanguardia.

La implementación de la técnica consistió en obtener los perfiles de los ácidos grasos de cepas tipo de *V. cholerae* O1 ATCC 14035 y *S. typhi* ATCC 0779. El perfil cromatográfico de *V. cholerae* O1 presentó 17 ácidos grasos y coincide con lo reportado anteriormente para esta especie. Así mismo, los resultados indican la presencia de 11 ácidos grasos para *S. typhi*. Cabe mencionar que tras una exhaustiva búsqueda bibliográfica, no se encontró reporte alguno del perfil de ácidos grasos de *S. typhi*, por lo menos en los últimos 20 años.

La importante presencia de las bacterias de mi interés *V. cholerae* y *S. typhi*, en el agua residual cruda, trasciende especialmente en términos de salud pública, ya que la deficiencia de los sistemas de tratamiento se deriva en la práctica común de irrigación de hortalizas con aguas negras no tratadas.

Es por esto, que las bacterias mencionadas fueron aisladas de agua residual cruda del canal de la ciudad de México. Se utilizó un método convencional de identificación como método de referencia, para comparar la metodología propuesta, por lo que se identificaron inicialmente

por el sistema comercial API 20 E (Analytical Profile Index), este método es uno de los más utilizados actualmente.

Posteriormente se identificaron mediante cromatografía de gases con la técnica implementada. Los resultados obtenidos indicaron que las cepas aisladas del ambiente de las especies, presentaron exactamente el mismo perfil de ácidos grasos que se observó en el tipo, por lo que fue posible entonces identificarlas como *V. cholerae* y *S. typhi*.

En el desarrollo del trabajo observé que las cepas presuntivas de *Salmonella* producían H₂S, y cuando se identificaron por el sistema miniaturizado API 20 E se identificaron como *Salmonella* spp, no obstante al identificarlas con la técnica de cromatografía gas-líquido presentaron exactamente el mismo perfil que se observó en la cepa tipo.

La bibliografía reporta alguna alteración en el metabolismo de *Salmonella typhi* como la habilidad para producir H₂S después de un tipo de desinfección, en el caso de las bacterias ambientales existe ciertas alteraciones metabólicas por diversos factores que pueden modificar sus propiedades bioquímicas. En este contexto, la técnica de cromatografía de gases ofrece una mejor alternativa ante las pruebas bioquímicas convencionales, puesto que es una técnica precisa para la identificación de bacterias, incluyendo aquellas que presentan modificaciones provocadas por el medio en el que se encuentran. Mediante esta técnica, se tiene la capacidad de identificar cepas como *S. typhi*, ya que por medio de los métodos convencionales es difícil identificar bacterias con ciertas modificaciones metabólicas.

El análisis de ácidos grasos por cromatografía de gases resulta de gran utilidad en las investigaciones microbiológicas en general, que apoya y complementa estudios ambientales.

estado grave. caracterizada por diarrea acuosa profusa, vómitos y entumecimiento de las extremidades. En estas personas, la pérdida rápida de líquidos corporales lleva a la deshidratación y a la muerte. Sin tratamiento adecuado, puede ocurrir la muerte en cuestión de algunas horas. Ocurre primariamente por la ingestión de agua contaminada, consumo de hortalizas irrigadas con agua no tratada y además por alimentos contaminados con heces o vómitos de individuos infectados, manipuladores asintomáticos de alimentos, contacto directo con heces del paciente o a través de vectores (moscas y cucarachas) (Davis, 1996).

Así también, la literatura abunda en descripciones de brotes de *Salmonella* transmitidos por alimentos y agua contaminada. La fiebre tifoidea es una de las enfermedades más comunes transmitidas por estos medios. La incidencia de salmonelosis ha cambiado desde la mitad del 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 (Davis, 1996).

Debido a que las técnicas para la detección y aislamiento de estas bacterias, son difíciles y implican una demanda de tiempo mayor que se traduce en un aumento de costos, es necesario acelerar los procesos de identificación de los microorganismos que afectan directamente al hombre y su ambiente (Gurr, 1980).

La eficiencia de técnicas tradicionales, para el aislamiento y la detección de bacterias patógenas en el agua, es con frecuencia muy baja. El examen morfológico de las colonias proporciona poca información, por lo que se recurrió a métodos de identificación basados en la expresión de ciertas propiedades bioquímicas en particular la actividad de enzimas (Informe técnico de proyecto, 1997).

Sin embargo, estas pruebas muy útiles y aún vigentes en bacteriología, sólo proporcionan datos binarios, los cuales, al ser evaluados estadísticamente por hipótesis sustentadas en métodos probabilísticos, limitan las conclusiones que se llegan a obtener, sobre todo en áreas donde se requiere acortar tiempo de análisis es importante, como sucede en el ámbito sanitario y ambiental (Informe técnico de proyecto, 1997).

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, por ello que se trata de encontrar otros métodos para reemplazarlos por uno simple que proporcione al menos la misma cantidad de información, llevando así la identificación hacia otros principios, tal manera que se buscan características en la composición química de los microorganismos (Informe técnico de proyecto, 1997).

Investigaciones relacionadas, se orientaron al estudio de sustancias que están presentes en la escala más amplia posible, tal es el caso de la cromatografía de gases que se ha utilizado para el análisis de células microbianas y productos metabólicos (Informe técnico de proyecto, 1997).

Esta técnica proporciona una descripción detallada de la bacteria, puesto que los parámetros analíticos son variables que se miden en una escala continua. En este sentido, la cromatografía

gases es superior a los análisis bioquímicos, ya que éstos últimos producen principalmente binarios (Bøe y Gjerde, 1980).

En la última década se ha incrementado la aplicación de técnicas instrumentales para sustituir los métodos convencionales de identificación y diferenciación en microbiología (Urdaci, 1995). Al respecto, el análisis cromatográfico es una técnica valiosa para caracterizar especies de bacterias y levaduras, el cual se ha utilizado en países desarrollados como Estados Unidos (Johnson, 1989; Lambert, 1983) España (Monteoliva-Soriano, 1988); además de países como Corea (Cho, 1999) y la República Checa (Häusler, 1988) entre otros.

No obstante, estudios referentes al medio ambiente siguen utilizando métodos convencionales para la detección de bacterias patógenas. Alonso 1992, Hu 1992, Papapetropoulou 1996 trabajaron en el aislamiento de *Salmonella* utilizando métodos bioquímicos para su caracterización.

Estudios similares en diferentes tipos de agua realizados por Madsen 1994, Silva 1993, Falcão 1993, Son 1998 y Gawthorne 1996, aislaron *Salmonella* y *V. cholerae* con diferentes técnicas de identificación basadas en pruebas bioquímicas convencionales.

En este contexto nuestro estudio pretende fundamentar que la técnica de cromatografía de gases es un método preciso para la identificación de organismos patógenos aislados de aguas residuales.

La investigación se enfocó principalmente a dos bacterias, *V. cholerae* y *S. typhi*. Se eligieron estas bacterias, debido a que se transmiten principalmente por vía hídrica y en ocasiones por el consumo de verduras regadas con aguas negras no tratadas, gracias a la falta de métodos adecuados en el tratamiento y saneamiento del agua que permite la proliferación de las mismas.

Capítulo 4. ANTECEDENTES.

4.1 Importancia de las bacterias patógenas en el ambiente.

Uno de los puntos principales en estudios de contaminación hídrica por bacterias que se enfoca a las de origen fecal, por lo que se hace énfasis en el grupo de enterobacterias), ya que sus miembros son claros indicadores de contaminación fecal. La consecuencia representan la existencia de un peligro potencial para la salud.

Se ha reportado que las enfermedades infecciosas más comunes por la ingestión de agua contaminada por bacterias incluyen campylobacteriosis, cólera, gastroenteritis por enterotoxigénica, salmonelosis, fiebre tifoidea y shigelosis.

Las enfermedades transmitidas por agua (hidrotransmitidas) en países como México han podido ser erradicadas, debido a que esta es el vehículo de una variedad de microorganismos. El control de estas enfermedades es altamente dependiente de la educación a todos los niveles, la distribución del agua, del manejo apropiado de tratamiento y del monitoreo. En lo que respecta al monitoreo de la calidad bacteriológica del agua se ha propuesto cuantificar la presencia de organismos indicadores para predecir la presencia de organismos patógenos.

La presencia de estos indicadores está relacionada con el riesgo de infección de la 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 *V. cholerae*, *Salmonella* spp, *Shigella* spp y *Campylobacter jejuni* han producido epidemias. Se ha sugerido el uso de *Salmonella* spp como indicador de la calidad bacteriológica del agua. (Rodier, 1987).

4.2 Generalidades de *Vibrio cholerae*

El cólera es una enfermedad intestinal bacteriana aguda y grave, causada por *V. cholerae* O1, biotipo Clásico ó El Tor, que generalmente ocurre en brotes explosivos y que se caracteriza por una diarrea acuosa abundante de color blanquecino, como "agua de arroz", vómitos ocasionales, deshidratación rápida, acidosis, calambres musculares y colapso respiratorio pudiendo llevar al paciente a la muerte en un periodo de 4 a 48 horas (en casos no tratados) (Sánchez, 1991).

Las infecciones asintomáticas y las formas benignas (diarreas discretas) son más comunes que los casos graves y estos casos son epidemiológicamente importantes para la permanencia del bacilo en la comunidad y en el medio ambiente.

La persistencia de la enfermedad en zonas endémicas está por los individuos infectados que eliminan vibriones durante una a dos semanas, por la elevada proporción de infecciones asintomáticas y corta inmunidad pos-infecciosa, lo que posibilita frecuentes reinfecciones.

La rápida propagación de la enfermedad, en varios países se debe principalmente a las características del biotipo El Tor (que causa muchos casos de infecciones asintomáticas y de leve sintomatología) falta de una vacuna eficaz, rápidos medios de transporte, turismo, flujo migratorio procedentes de áreas endémicas, malas condiciones de saneamiento y principalmente falta de agua potable.

Considerando que el medio principal de propagación del cólera es el agua, en zonas de probables de surgimiento de epidemias, debe incrementarse el monitoreo y control de los principales cursos de aguas superficiales (ríos, represas, lagos, etc.), aguas crudas y tratadas que se destinan para riego agrícola y aguas subterráneas (pozos y manantiales). Además de realizar cuidadosas investigaciones para asegurar su protección y la adopción de medidas preventivas para evitar la propagación de la enfermedad. Por lo tanto deberá darse prioridad a la aplicación de los principios fundamentales del saneamiento relacionados con la disposición de las heces humanas, la higiene y seguridad de los alimentos, y garantizar el agua potable para la comunidad.

La viabilidad de *Vibrio* en el medio acuático está directamente influenciada por el tipo de agua, temperatura, luz solar, presión osmótica, sales, materia orgánica y presencia de bacterias competidoras, por lo que sobrevive varios días y semanas dependiendo del tipo de agua con períodos de vida alrededor de 6 a 26 días en agua de mar, en agua dulce de 6 a 19 días, y de 5 a 12 días en aguas residuales, aunque la literatura internacional reporta hasta 60 días (Sánchez, 1991).

Por lo antes mencionado se considera que la vigilancia de *V. cholerae* en el medio acuático es de suma importancia para localizar focos de contaminación y de esta manera implementar las debidas medidas de emergencia para rastrear de origen la contaminación en regiones vulnerables (pues es reconocido el papel del agua como principal fuente de diseminación del agente colérico).

4.2.1 Características particulares de *Vibrio cholerae*.

V. cholerae es el agente etiológico del cólera epidémico y pandémico en humanos. El organismo es curvo, en forma de coma (de ahí su denominación inicial, *V. comma*) y muestra gran movilidad en el examen en fresco. Estas características distintivas permitieron a Pasteur describir el organismo casi 30 años antes de que fuera aislado en cultivo puro por Koch, en 1854.

Las cepas de *V. cholerae* pueden dividirse en dos grupos o biotipos principales: clásico y El Tor, que pueden ser diferenciados por diversas pruebas inmunológicas y de resistencia a antibióticos, así como fagotipificación. El biotipo El Tor, que fue aislado por primera vez en 1901 a partir de peregrinos sanos en el campamento en cuarentena de cólera de El Tor, en el golfo de Suez, se creía originalmente no patógeno, pero fue aislado después en epidemias de cólera.

Endémico durante siglos en la región de Bengala de la India y en Bangladesh, el cólera ha diseminado por todo el mundo siete veces desde el comienzo del siglo XIX, empujando generalmente en la India. La última de estas grandes pandemias comenzó en Indonesia y se extendió por el norte a China, a través de Tailandia y la India y desde el continente a África. En el transcurso de una década alcanzó Europa, Japón y Estados Unidos. Las primeras seis pandemias fueron ocasionadas por el biotipo clásico, pero la más reciente ha sido producida por el biotipo El Tor. Desde 1986, el biotipo clásico ha sido aislado de enfermos en Bangladesh y la India con frecuencia creciente, surgiendo el principio de una nueva pandemia de cólera (Koneman, 1997).

4.2.2 Cuadro clínico.

El cólera es el prototipo de los síndromes diarreicos en los que la enfermedad es causada no por la invasión hística por parte de los microorganismos sino por la producción de toxinas que alteran el intercambio intestinal normal de agua y electrolitos (Koneman, 1997).

Se caracteriza por una abundante diarrea acuosa que contiene partículas de moco (conocida como "agua de arroz") pero sin sangre ni células inflamatorias. La enfermedad comienza entre uno y cinco días después de la infección por vía oral, con náuseas, vómitos, dolores y/o espasmos abdominales y diarrea. En casos extremos, la pérdida de líquidos por la diarrea puede exceder los 20 litros al día. Sin embargo, incluso con pérdidas moderadas de líquidos (10 litros por día) un choque hipovolémico puede ocasionar la muerte al cabo de unas pocas horas del inicio de los síntomas, especialmente en niños pequeños. Como las heces del cólera contienen la misma concentración de sodio, el doble de bicarbonato y más de cinco veces la concentración de cloruro que el plasma normal, los enfermos de cólera sufren un importante déficit de electrolitos y acidosis metabólica. En ausencia de tratamiento adecuado, el índice de mortalidad puede alcanzar el 50% pero se reduce al 1% con la reposición de las pérdidas electrolíticas (Davis, 1996).

4.2.3 Epidemiología.

El cólera se disemina primariamente por los alimentos y el agua contaminada con excrementos de individuos infectados. En áreas endémicas, los portadores asintomáticos indudablemente desempeñan un papel importante en la diseminación de la enfermedad, pero no por el contacto persona-persona, ya que son necesarios inóculos muy grandes para que se produzca la infección.

En ciertas regiones geográficas bien definidas, que no son consideradas típicamente como áreas endémicas de cólera, aparecen repetidamente diversos brotes esporádicos de cólera.

El fallo del control adecuado de las excretas (tras una inundación o en la época de lluvias en el trópico) puede exponer repentinamente a la enfermedad a una gran cantidad de víctimas potenciales. Por consiguiente, un saneamiento adecuado es el medio más eficaz para el control de la enfermedad.

del cólera. Una vez que se haya manifestado el cólera, se debe intentar el aislamiento del e y la desinfección de sus heces (Davis, 1996).

4.2.4 Determinantes de patogenicidad.

La reducida virulencia de mutantes que carecen de movilidad o quimiotaxis sugiere presencia de estas propiedades permite al organismo introducirse hasta lo más profundo criptas intestinales y penetrar en el epitelio. Las proteasas y la neuraminidasa producidas organismo pueden desempeñar también un papel importante en la penetración del gel mucoso como proporcionar quizá ciertos substratos para el crecimiento bacteriano por hidrólisis glucoproteínas (Davis, 1996).

Adhesión: se realiza al borde en el cepillo de las células epiteliales intestinales por de adhesinas de las fimbrias de *V. cholerae*, especialmente por un factor de colonización I TCP (acrónimo de toxin coregulated pilus). Otro factor de colonización, llamado ACF, también parece ser importante y puede tratarse de un segundo tipo de pilus. Un gen regulador (toxR) de la enterotoxina del cólera, el factor TCP y el ACF aseguran su producción coordinada durante el curso de la infección (Davis, 1996).

Toxina: la enterotoxina colérica es claramente la causa principal de la diarrea severa observada en la enfermedad. La toxina, activa la adenilato ciclasa ligada a la membrana de las células. Los elevados niveles de AMP cíclico en las células de la mucosa del intestino delgado originan una cascada (involucrando tal vez a proteincinasas activadas por en AMPc) que conduce en último término a una hipersecreción de cloruros y bicarbonato en la luz intestinal. Consecuentemente, un flujo osmótico neto de agua hacia el exterior. La toxina colérica se compone de una subunidad A y cinco subunidades B, que en conjunto suponen unos 280 kilodaltons. Las subunidades B tienen una elevada afinidad para los receptores gangliósidos G_{M1} en la superficie de las células; los anticuerpos (Ac) contra estas subunidades bloquean esta unión y neutralizan la acción de la toxina. Tras la unión de la holotoxina, las subunidades A penetran en el citoplasma, donde catalizan y activan con ello, la transferencia del núcleo ADP-ribosilado de NAD a una proteína reguladora asociada a la membrana llamada G_s, que al activarse estimula la adenilato ciclasa por un mecanismo que involucra al GTP (Davis, 1996).

4.2.5 Características coloniales.

La morfología colonial en agar TCBS es útil para la identificación presuntiva. Después de 18-24 h de incubación crecen colonias lisas y amarillas de 2-4 mm de diámetro con un centro opaco y una periferia transparente. En GA (agar gelatina), forma colonias transparentes rodeadas por un halo que indica licuefacción de la gelatina. El biotipo EL Tor puede diferenciarse de las formas clásicas de *V. cholerae* por diversas características. Las cepas EL Tor son activamente hemo-

en agar-sangre y capaces de aglutinar eritrocitos de pollo en contraste con las cepas clásicas que no tienen esta propiedad (Koneman, 1997).

4.2.6 Pruebas bioquímicas diferenciales

En muchas características, *V. cholerae* se parece bastante a miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. Puede fermentar diversos carbohidratos, con producción de ácido, y producción de gas (al igual que *Shigella*). Utiliza lentamente la lactosa y en general se considera como negativo para este azúcar. Puede crecer (aunque lentamente) en la mayoría de los medios selectivos para bacterias gram negativas entéricas, incluyendo aquellos que contienen sales de sulfato de bismuto, telurito y colorantes tóxicos. Sin embargo *V. cholerae* difiere de la familia *Enterobacteriaceae* en que las bacterias recién aisladas muestran una morfología de bacilos muy móviles, con un único flagelo polar, una prueba positiva de la oxidasa, buen crecimiento en medios alcalinos (pH 9-9.6), pero no crece por debajo de un pH 6.5 y aglutina con antisuero anti-O y anti-H de *V. cholerae* sin dar reacciones cruzadas con otras especies entéricas como *V. parahaemolyticus* (Davis, 1996).

Son organismo anaerobios facultativos capaces de metabolismo respiratorio y fermentativo. Sin embargo, dado que crecen y reaccionan en medios con hidratos de carbono diseñados para el metabolismo fermentativo, se clasifican con los fermentadores. El hábitat natural del género *Vibrio* es acuático, en agua dulce y salada. El crecimiento y reactividad bioquímica de muchas especies de *Vibrio* incrementan en medios diferenciales suplementados con cloruro de sodio. Produce citocromo oxidasa y no reduce nitratos a nitritos, fermenta la glucosa y no la lactosa, en agar hierro de *Vibrio* (KIA) se ve una reacción de pico de flauta alcalino/profundidad ácida, produce lisina y ornitina descarboxilasas, es negativo a arginina dihidrolasa (tabla 1) (Koneman, 1997).

4.2.7 Serología

Una característica de las propiedades serológicas de especies de *Vibrio*, es que todas las cepas en una especie dada poseen idénticos antígenos H (flagelar) y son divididas dentro de serogrupos O, aún así se encuentran determinantes antigénicos en flagelinas del flagelo polar.

Los organismos con antígeno O del grupo 1 producen casi siempre enfermedad marítima. Para *V. cholerae* se han reconocido más de 80 serovares (serogrupos) O. *V. cholerae* O1 el agente causal del cólera se divide en tres formas antigénicas "O" llamadas Ogawa, Inaba e Hikojima. Las formas antigénicas son algunas veces llamadas "serotipos" o "subtipos" pero esta es una designación incorrecta. Para los aislamientos de *V. cholerae* se determina fácilmente el serogrupo O1 realizando una prueba de aglutinación con el antisuero O1 polivalente (Sakazaki, 1992).

Tabla 1. Serie bioquímica para la identificación de *Vibrio cholerae*

SUSTRATO	<i>Vibrio cholerae</i>
Gas de glucosa	-
Lactosa	-
Sacarosa	+
Manitol	+
Inositol	-
Lisina decarboxilasa	+
Ornitina decarboxilasa	+
Movilidad	+
Gelatina	+
Urea	-
H ₂ S	-
Indol	+
Voges-Proskauer	-
Citrato (Simmons)	+
KIA pico de flauta profundidad	K/A
Catalasa	+
Oxidasa	+
Esculina	-
ONPG	+

(Koneman, 1997)

4.3 Generalidades de *Salmonella*

La fiebre tifoidea y la salmonelosis se encuentran distribuidas en todo el mundo y constituyen un problema de salud, no sólo en México sino en todos los países del mundo donde se encuentran distribuidas, variando su frecuencia de uno a otro y con una importancia relevante en áreas que no han alcanzado las condiciones de saneamiento e higiene, ni cuentan con medidas de salud pública óptimas.

Afectan a todos los grupos de edad, sin embargo se observa mayor daño en las extremas de la vida (niños menores de 5 años y adultos mayores de 60 años) que constituyen grupos más vulnerables a la enfermedad. Ambas enfermedades infecciosas muestran claramente una incidencia estacional, de tal forma que el canal endémico registra aumento de casos a partir de mayo, alcanzan el pico máximo en los meses de julio y agosto y la declinación se observa a partir de septiembre. La larga lista de serotipos conocidos rebela un notable potencial para desarrollar cambios genéticos que conducen a nuevas formas antigénicas, cambios que afectan la epidemiología de brotes y casos. En México los serotipos más frecuentes aislados de casos y en brotes son *S. typhimurium* y *S. enteritidis*.

En el caso especial de la salmonelosis el problema adquiere una complejidad especial a que algunos de sus serovares son específicos para un huésped, en tanto que otros pueden infectar mismo a animales que al hombre. Los alimentos más frecuentemente involucrados son: productos cárnicos, lácteos, pescado y verduras (López , 1993).

Las salmonelas se transmiten por vía indirecta cuando la materia fecal de los pacientes o los portadores contaminan el agua potable y los alimentos. Así mismo es posible encontrar alimentos que han sido regados con agua contaminada o que han sido manipulados por portadores (Giono,1993).

4.3.1 Características particulares de *Salmonella*.

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, roedores, artrópodos y animales salvajes, aves y reptiles. El hábitat acostumbrado del género es el tracto gastrointestinal de huéspedes animales y humanos (Sommenwirth, 1984).

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 otras especies inferiores y con algunas excepciones estas formas existen únicamente en sus huéspedes específicos como *S. typhi*, *S. paratyphi A*, *C* y *S. sendai*, estrictamente adaptadas al hombre. La gran mayoría de tipos (más de 1,500), excepto *S. typhi* y *S. paratyphi*, no muestran especificidad de huéspedes y en ocasiones pueden producir enfermedad en cualquier animal de sangre caliente.

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* y *S. gallinarum* afectan a las aves, *S. dublin* al ganado, *S. abursetqui* al ganado y *S. choleraesuis* al cerdo (Davis, 1996).

La ubicuidad de *Salmonella* plantea un importante problema de salud pública. La literatura abunda en descripciones de brotes de *Salmonella* transportada en alimentos, como carne en polvo, cremas, productos cárnicos, pescados y por contacto con animales (Carpenter, 1977).

4.3.2 Cuadro clínico.

Las salmonelas viven en los tejidos de los reptiles, aves, mamíferos y seres humanos. Éstas son 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 humanos o animales, 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 continúan excretando los microorganismos 1-4 meses después de su curación, y los casos subclínicos no reconocidos. Los portadores crónicos de *S. typhi* son un peligro para la salud pública y constituyen el principal problema de eliminación de la fiebre tifoidea (Lorraine, 1980).

Las manifestaciones clínicas de salmonelosis se han dividido en: 1) gastroenteritis, 2) bacteriemia o septicemia con o sin lesiones focales, 3) fiebre entérica con su clásico ejemplo, la 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:** cultivos de sangre positiva, síntomas que van desde una diarrea hasta la forma fulminante de iniciación repentina y violenta, esta es la manifestación clínica más común de la infección por *Salmonella*.

2. **Septicemia:** cultivos de sangre positiva, se caracteriza por fiebre alta con erupciones 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 *S. typhi*, se caracteriza por el aumento sostenido de las etapas de la temperatura que llega a los 40 °C, por la aparición de diversos puntos rojos (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 enfermedad puede ir desde una ligera tos hasta abscesos pulmonares. La fiebre empieza a ceder a 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 por años. En los portadores permanentes de *Salmonella* se encuentra que la reproducción generalmente en la vesícula biliar; estos portadores junto con los reservorios animales constituyen un grave problema de salud pública (Sommenwirth, 1984).

4.3.3 Epidemiología.

La fiebre tifoidea y la salmonelosis no tífica son reportados 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, fagotipificación y comparación de plásmidos. La incidencia de salmonelosis ha cambiado desde la mitad del siglo. En el mundo en desarrollo, la fiebre tifoidea es todavía una causa importante de enfermedad, pero en Estados Unidos sólo se declaran unos 500 aislamientos anualmente. Sin embargo, la incidencia de salmonelosis no tífica ha aumentado considerablemente, reflejando una mala manipulación de alimentos, así como su distribución (Davis, 1996).

4.3.4 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 una toxina termolábil de *E. Coli*. Durante la gastroenteritis, producida por *Salmonella* se producen 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 desconocidos.

El lipopolisacárido (LPS) es el determinante de virulencia de *Salmonella* que ha sido mejor caracterizado con más precisión. El lípido A (endotoxina) puede activar los macrófagos, originando fiebre, leucocitosis e hipotensión (shock). El cuadro general de la infección sistémica por *Salmonella* es atribuible fundamentalmente a la porción tóxica del LPS (Davis, 1996).

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 (Davis, 1996).

Adhesión y movilidad: La localización de *Salmonella* en el íleon terminal sugiere que estos organismos se adhieren al epitelio intestinal. *Salmonella* sintetiza fibras normales tipo I serotipo 1 a manosa, pero el papel de estas estructuras virulentas parece ser mínimo. Los flagelos parecen ser los factores de virulencia más importantes (Davis, 1996).

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 pueden sobrevivir normalmente en macrófagos y en las células epiteliales pero no logran sobrevivir (Davis, 1996).

4.3.6 Características coloniales.

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

En agar Mac Conkey los bacilos de tifoidea, paratifoidea y disentería no fer lactosa, estas colonias son incoloras y transparentes. En agar verde brillante las colonias de *Salmonella* son ligeramente rosas a incoloras rodeadas de un color rojo de uno a dos diámetro, *S. typhi* y otras especies de *Salmonella* crecen pobremente en este medio por e brillante, los fermentadores de lactosa producen una coloración verde pálido o bien producir otras coloraciones; a veces hay que reincubar el medio si no se han observado a horas colonias sospechosas de *Salmonella*. En agar *Salmonella-Shigella* (SS) organismos fermentan lactosa forman colonias opacas, transparentes o traslúcidas, incolora generalmente son lisas, algunos tipos de *Proteus* y *Salmonella* pueden producir color centro negro. En agar sulfito de bismuto (SB) después de 24 horas de incubación se ob colonias típicas de color negro con un brillo metálico y en ocasiones pueden presentar u cuando existe un gran número de colonias puede producirse un crecimiento de puntos ne grises verdosos.

Algunas especies de *Salmonella* presentan coloración verde; la coloración negra ta puede ser producida por otros organismos como *Proteus*. Si no se observan colonias típicas horas debe reincubarse por otras 24 horas. Este medio es especialmente efectivo para aislar de *S. typhi*. En agar desoxicolato xylosa-lisina (XLD) las colonias de *Salmonella* pro colonias negras con centro rojo y difieren de las colonias coliformes en que estas pro colonias amarillas. El tiempo óptimo de incubación es de 24 horas (Clesceri, 1989; Davis, Koneman, 1997).

4.3.7 Pruebas bioquímicas diferenciales.

Por definición las salmonelas no fermentan lactosa, sacarosa, rafinosa ni adonit producen indol y no muestran actividad de ureasa en agar urea de Christensen. Adema positivas para rojo de metilo, negativas para Voges-Proskauer. Casi todas son móviles u citrato y crecen en medio de acetato de sodio, descarboxilan lisina, arginina y ornit producen ácido sulfhídrico, no utilizan malonato de sodio, no licúan gelatina ni desa fenilalanina. Las características diferenciales dentro el género *Salmonella* se muestran en la 2. (Sommewirt, 1984):

Tabla 2. Serie bioquímica para la identificación de *Salmonella*.

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	-	-	-

(Koneman, 1997)

4.4 Importancia del tratamiento de aguas en bacteriología ambiental.

El abastecimiento de agua para uso y consumo humano con calidad adecuada es fundamental para prevenir y evitar la transmisión de enfermedades gastrointestinales entre otros, por lo que se requiere establecer límites permisibles en cuanto a sus características bacteriológicas, físicas, organolépticas, químicas y radioactivas. Con el fin de asegurar la preservación de la calidad del agua, los sistemas se deben someter a tratamientos de potabilización antes de 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 jurídica que la distribuya en todo el territorio nacional.

El agua para consumo humano ó potable, 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; el contenido de estos organismos debe ajustarse a los límites establecidos que son: 2 NMP/100 mL o 2 UFC/100mL para coliformes totales y no detectable NMP/100 mL o cero UFC/100 mL para coliformes fecales.

La potabilización del agua proveniente de una fuente en particular, fundamentarse en estudios de calidad y pruebas de tratabilidad a nivel de laboratorio para asegurar su efectividad. Es necesario aplicar tratamientos específicos siguientes o los que se aplican a las pruebas de tratabilidad, cuando los contaminantes biológicos, las características físicas y químicas constituyentes químicos del agua excedan los límites permisibles en la NOM (Norma Mexicana, 1996).

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, sino garantizar la ausencia de gérmenes infecciosos y suprimir el riesgo de contaminación de un sistema de agua o de un sistema de distribución, que haya sufrido los efectos de una contaminación.

De la gama de medios disponibles para realizar esta operación es bastante extensa, desde las técnicas químicas que utilizan reactivos oxidantes (cloro, bromo, ozono), hasta los medios físicos (radiaciones ultravioleta o ionizantes); son los procedimientos químicos, y particularmente el del cloro, los que se utilizan frecuentemente, pues proporcionan una acción satisfactoria debido a su poder residual y además se pueden llevar a la práctica con gran facilidad (Clesceri, 1989; Rodier 1987).

4.5 Métodos convencionales para la identificación de bacterias.

La aplicación de técnicas instrumentales en la microbiología, se ha incrementado considerablemente en los últimos años, sin embargo se siguen utilizando los métodos convencionales de identificación y diferenciación bacteriana.

La diferenciación bacteriana en muestras ambientales, se logra inicialmente mediante la concentración de los microorganismos, utilizando una técnica de muestreo adecuada. Es necesario, además la inoculación de la muestra en caldos de enriquecimiento, para recuperar las bacterias de interés que se hallan en baja cantidad. Posteriormente se debe recurrir a medios de cultivo selectivos que inhiban el crecimiento de bacterias ajenas, dado que se necesitan medios de cultivo especiales para recuperar especies de bacterias patógenas.

En la identificación de género y especie de bacterias se puede recurrir a diferentes procedimientos, prefiriendo aquellos que presentan las mayores ventajas, con respecto a la facilidad de adaptarse a la capacidad fisiológica de la bacteria (como el tipo de metabolismo, utilización de un diferente tipo de sustratos, formación de ciertos productos, etc).

El metabolismo bacteriano puede especificarse y evidenciarse por la utilización de reactivos diferenciales en técnicas de cultivo *in vitro*, en donde el sustrato se incorpora a un sistema de cultivo con indicadores, cuya utilización permite la identificación bacteriana, esto es lo que se conoce comúnmente como pruebas bioquímicas (Koneman, 1997, Giono 1993)

En muchos géneros y especies la identificación no se basa solamente en algunas pruebas bioquímicas sino en patrones establecidos que se reproducen al aplicar toda una batería de pruebas bioquímicas. Los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* representan un ejemplo de esto. Para aliviar

necesidad de inocular gran número de tubos de medio de cultivo se han diseñado multipruebas ya están comercialmente disponibles (Krieg en manual de Bergey, 1984).

Los métodos convencionales de identificación de microorganismos se apoyan en la expresión de ciertas propiedades, como las rutas metabólicas para la utilización de sustratos disponibles y que están directamente relacionadas con la actividad enzimática. La información que se obtiene es unidireccional (positivo) o (negativo) y es la que frecuentemente se utiliza para una identificación numérica (Farmer III, 1985) o bien en el empleo de sistemas automatizados para analizar resultados, que a menudo no llegan a ser muy precisos.

Es conveniente dejar establecido que los esquemas de identificación, no son esquemas de clasificación aunque pueden ser similares superficialmente (Brenner, 1973). Los caracteres utilizados para la identificación no son a menudo los que se utilizaron para la clasificación del grupo. Por ejemplo la clasificación puede estar basada en un estudio de hibridación de ADN, mientras que la identificación podría basarse en un carácter fenotípico que ha sido bien correlacionado con la información genética. En general los caracteres deben ser fácilmente determinables y en bajo número (Breed en manual de Bergey, 1957).

Este esquema ideal de identificación en microbiología, no siempre es aplicable particularmente con géneros o especies que no son susceptibles de ser caracterizados por métodos bioquímicos o fisiológicos tradicionales. En tales casos se puede requerir de procedimientos convencionales para realizar una identificación más precisa; como lo son: electroforesis en gel de poliacrilamida de proteínas celulares, patrones de lípidos celulares, transformación genética, hibridación de ácidos nucleicos o las reacciones serológicas. Estas técnicas que sólo tienen valor para la clasificación, a menudo tienen enorme valor para la identificación (Breed en manual de Bergey, 1957).

Los patrones de identificación son diferentes a los de clasificación, aunque tienen similitud, (Brenner, 1973). Las características que se usan para identificar a ciertos microorganismos difieren a las utilizadas para clasificarlas dentro de un determinado taxón, por ejemplo la clasificación puede estar basada en un estudio de hibridación de ADN, mientras que la identificación se basa en un carácter fenotípico que ha sido bien correlacionado con la información genética. En general los caracteres deben ser fácilmente determinables y en bajo número.

El tiempo y la práctica han demostrado que los métodos convencionales mencionados anteriormente actualmente se utilizan para la identificación bacteriana, no son totalmente satisfactorios. Aunque proveen información un tanto extensa que en muchas ocasiones queda archivada para ser procesada posteriormente, lo cual sucede con frecuencia en los laboratorios clínicos o de servicio, debido a la alta carga de trabajo. Sin embargo, tal deficiencia se redujo en gran medida cuando se comenzaron a utilizar los métodos de taxonomía numérica, que ayudaron a realizar el análisis de datos que anteriormente provenían de los métodos convencionales y que mediante el análisis numérico proporcionaban una interpretación más precisa; también se tomó en cuenta el incremento de la información en cada unidad taxonómica, pues las tablas diagnósticas originales continuamente se enriquecen debido a la alta frecuencia de aparición de cepas en cada taxón. Para el manejo de esta información creciente se han venido utilizando las matrices de Bascomb, 1971 o la de Farmer III *et al*, 1985.

Si bien es cierto que el uso de las matrices (Bascumb, 1981; Farmer *et al.* 1985) evita que los métodos convencionales permitan una diferenciación muy satisfactoria de los diversos tipos de microorganismos, así como de las categorías infraespecíficas, por otra parte esos métodos no sólo representan una ardua labor, sino también consumen mucho tiempo y son poco prácticos, especialmente en la identificación de microorganismos donde no se recomiendan debido al tiempo que transcurre entre la toma de muestra y la obtención de resultados (Davis, 1981).

Aunque en años recientes se ha hecho un esfuerzo para acelerar y simplificar la identificación vía la introducción de micropruebas comerciales, tal como el sistema que utiliza el Índice de Perfiles Analíticos (Analytical Profile Index) API, y que está basado en alrededor de 35 micropruebas bioquímicas que permiten una automatización parcial de los procesos, y la aplicación de métodos por computadora; para la identificación aún resulta muy complicada, pues sigue siendo siempre en el mismo principio: la observación de las propiedades bioquímicas de los microorganismos (Holmes, 1978).

Por esta razón varios autores han tratado de reducir la laboriosidad y desventajas de los procedimientos convencionales y dirigen sus investigaciones en busca de una solución que permita reemplazarlos por métodos simples que provean al menos la misma cantidad de información. Esto lleva a la identificación hacia un nuevo inicio y a buscar características o rasgos particulares de la composición química de los microorganismos, centrandose de esta manera la atención en las sustancias que están presentes o resultan comunes a la mayoría de ellos.

Estos intentos se basan en nuevos métodos químicos avanzados de análisis, y de separación, especialmente por cromatografía líquida y de gas, espectrofotometría de masas, electroforesis y espectrofotometría, principalmente en el intervalo del infrarrojo. Así, el desarrollo de esta instrumentación y automatización de dicho proceso analítico permite una perfecta separación de los posibles componentes de la muestra analizada con una mínima demanda de tiempo y con una expresión cuantitativa segura. La aplicación práctica de estos métodos en el campo de la taxonomía se denomina quimiotaixonomía en la literatura técnica (Drucker, 1973; Drucker, 1974).

Contrariamente a la mayoría de las pruebas bioquímicas, cuyos resultados sólo se expresan con signo positivo o negativo, la quimiotaixonomía no sólo sirve para la determinación de las cualidades, sino también de cantidades; esto significa que el ámbito de información obtenida con un simple análisis es considerablemente mayor. Por ejemplo, si se toma en cuenta que cinco pruebas bioquímicas con respuestas positivas o negativas pueden dar al menos 32 combinaciones, entonces cinco componentes determinados por cromatografía de gases alcanzan sólo 10 diferentes valores, los cuales nos proveen de 100,000 combinaciones. Por esta razón, se dice que los métodos usados en quimiotaixonomía, no sólo son métodos rápidos, sino fundamentalmente exactos, inalterables y cuyos resultados pueden procesarse numéricamente (Cecchini y O'Brien, 1968).

El objeto de interés de los métodos en quimiotaixonomía es en todos los casos no sólo la célula como tal, sino también las diferentes estructuras celulares, endoenzimas, productos metabólicos de las células liberadas al medio de cultivo, o bien productos volátiles y gaseosos que dan una visión característica del organismo en cuestión (Goodfellow y Minnikin, 1985). Se puede obtener información relevante del análisis de la masa celular, tanto de compuestos importantes como aminoácidos, lípidos y azúcares, como de compuestos presentes en menor cantidad, por ejemplo

ácidos nucleicos. Las macromoléculas formadas por estos compuestos pueden resultar típicas de un organismo desde un punto de vista cualitativo y cuantitativo, además de considerar diferentes componentes estructurales y su secuencia (Johnson *et al*, 1989).

El análisis puede también enfocarse directamente a la presencia y composición de sustancias de alto peso molecular (de 400 en adelante como en el caso de proteínas y ácidos nucleicos) en las células o en las de bajo peso molecular (de 40 a 100 como es el caso de aminoácidos y monosacáridos) producidas por hidrólisis del material celular. Las sustancias de bajo peso molecular se determinan comúnmente por medio de cromatografía líquida y electrolítica (comunicación personal de Häusler, 1990).

La utilización de compuestos de alto peso molecular en microbiología toma en cuenta en primer lugar a los polisacáridos y a los lípidos, pues un análisis de la situación actual en lo referente a clasificación, muestra que en especial la determinación de diferentes componentes lipídicos de manera principal los ácidos grasos, contribuyen en la determinación taxonómica de los microorganismos (Gehrke y Goerlitz, 1963).

Con relación a las técnicas de inmunodiagnóstico e hibridación de nucleótidos se sabe que tienen una alta sensibilidad, especificidad, precisión y facilidad de realizarlas; por su parte la quimiotaxonomía también es precisa al utilizar propiedades altamente discriminatorias para seleccionar un compuesto muy estable en los microorganismos como es el caso de los ácidos grasos celulares (Orskov, 1974). En contraste con la detección antigénica y la hibridación, esta técnica requiere de una sonda, pero si, en cambio, requiere de instrumentación apropiada, la cual consiste fundamentalmente de un cromatógrafo y columnas capilares.

4.6 Fundamentos de cromatografía de gases.

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 esta 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 así esto un avance en los aspectos taxonómicos, tomando en cuenta que cada día se requieren estudios más rápidos y precisos (Häusler, 1985; Rasoamanjara, 1986).

La cromatografía es la separación física de dos o más componentes, basada en la diferente distribución de dos fases, una de las cuales es estacionaria y la otra móvil, en el caso de la cromatografía de gases, el fluido es un gas (González, 1987). La cromatografía de gases consiste en la separación de los componentes volátiles de una mezcla, por medio de la elución de estos a través de una fase estacionaria adsorbida sobre un soporte y el paso de una fase móvil que actúa como acarreador (Dabrio, 1973; Tuppie, 1982).

Cuando la fase estacionaria es un líquido se habla de cromatografía gas-líquido; y cuando la fase estacionaria es un sólido como carbón o silica-gel se le llama cromatografía gas-sólido (González, 1987).

Las partes integrantes de un cromatógrafo de gases son: (fig. 1.)

Gas acarreador

1. Inyector
2. Horno
3. Columna
4. Detector
5. Registrador

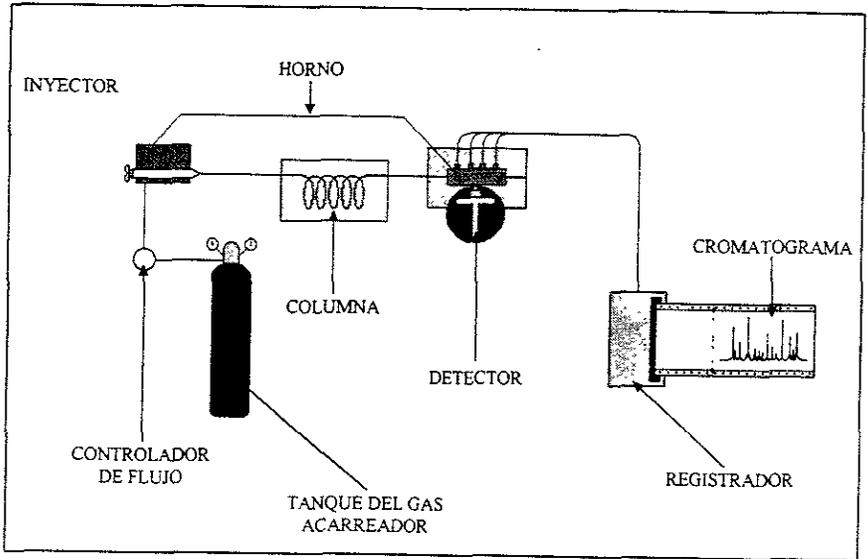


Fig 1. Diagrama de un sistema cromatográfico.

En el cromatógrafo se utiliza un gas acarreador (fase móvil) que bajo presión mueve una muestra de vapor desde el inyector y a través de una columna (donde se encuentra sobre la fase estacionaria; dicha muestra es adsorbida sobre un soporte donde se efectúa la separación). Luego pasa al detector donde se convierte en una señal eléctrica, la cual puede registrarse en un registrador. A la gráfica obtenida se le llama **cromatograma**, y los parámetros registrados son el **tiempo** en las abscisas y **milivolts** en las ordenadas (González, 1987).

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. El puerto 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 silicón que se encuentra en el puerto de inyección.

3. Horno: tiene como función elevar la temperatura de la columna para lo cual se utiliza un material aislante y materiales necesarios para llevar a cabo su calentamiento. El calentamiento es gradual y se programa 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 a cabo 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 y fase estacionaria deben ser totalmente inertes al sistema, se encuentran disponibles en varios tamaños. La más utilizada entre los más usados se encuentran los de malla 80 a 100; 2) **las columnas capilares** están constituidas por un tubo de sílice fundido muy largo (0.01 a 0.1 m) 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 μm) en las paredes interiores de la columna, el gas de arrastre tiene un camino libre sin restricciones requerido a una presión alrededor de 20 psi para un flujo adecuado, por lo que poseen un coeficiente de difusión elevado mejor que el de las empacadas. Se han diseñado columnas que ofrecen todavía una mejor eficiencia y son las denominadas Scott. Los componentes de la muestra eluyen de acuerdo a su peso molecular dentro de la columna.

5. Detector: cuando los componentes salen individualmente a través de la columna, pasan por el detector que emite una señal proporcional a la concentración del componente 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 (TCD), ionización de flama por hidrógeno (FID), ionización de flama alcalina (FAID) 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 gases inorgánicos, se basa en que la conductividad eléctrica de un gas es directamente proporcional a la concentración de las partículas cargadas del mismo, produce una corriente que pasa a través de una resistencia.

6. Registrador: las señales del detector pasan a través de un amplificador y un galvanómetro que está conectado a un aparato automático que grafica la señal. De esta manera que cada producto aparece como un pico a cada determinado tiempo. El gráfico resultante es un cromatograma, que se emplea para determinar la identidad y concentración del componente, siempre y cuando se ocupe un estándar analizado bajo las mismas condiciones (Storch de Gracia, 1975).

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, teniendo 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 por cromatografía (González, 1987).

La identificación se basa en una comparación de los tiempos de retención del compuesto desconocido con los datos obtenidos de un compuesto estándar, analizado bajo las mismas condiciones, (Mitruka, 1973); los datos de los tiempos de retención de las sustancias se obtienen fácilmente en el cromatograma al no verse traslapados los picos obtenidos, permitiendo utilizar 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 (Drucker, 1973).

4.7 Cromatografía de gases en bacteriología.

La bacteriología se ha desarrollado como una disciplina científica, que presta 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 analizar 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 (Häusler, 1989).

El análisis instrumental por cromatografía de gases ha sido hasta la fecha un instrumento auxiliar en muchos campos de la investigación científica. Dentro del campo tan amplio de aplicación que tiene dicha técnica, se han incrementado de un tiempo a la fecha las investigaciones sobre los constituyentes de las células bacterianas específicamente 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 (O'Leary, Häusler, 1985).

La cromatografía se ha utilizado para el análisis de células microbianas y productos metabólicos. Esta técnica proporciona una descripción detallada de la bacteria, puesto que los parámetros analíticos son variables que se miden en una escala continua. En este sentido la cromatografía de gases es superior a los análisis bioquímicos ya que estos últimos proporcionan principalmente datos binarios (Bøe y Gjerde, 1980).

Los primeros intentos para aplicar el análisis de los Ácidos Grasos Celulares (AGC) para la identificación de microorganismos fueron realizados en los años cincuenta (James y Martin, Abel y colaboradores en 1963. fueron los primeros en presentar evidencias que sugerían que el análisis de AGC podría utilizarse con éxito en la identificación de las bacterias. Los estudios anteriores estuvieron dirigidos al análisis de los AGC desde el punto de vista de los factores que influyen en la virulencia bacteriana, y se reconoció que las cepas rugosas de *V. cholerae*, p

cadenas ramificadas de ácidos grasos que estaban presentes en cepas lisas (Brian y Gardner, 1968). También se reportó que una alteración en la composición del lípido A de *Salmonella* correlaciona con un cambio en su virulencia (Mayer, 1984).

Abel y colaboradores (1963), identificaron diferentes patrones de ácidos grasos en miembros de la familia *Enterobacteriaceae* y en algunas bacterias gram positivas, identificaron específicamente los ácidos grasos celulares que caracterizaban a cada género que ellos probaron. Además el análisis requería de numerosos pasos y los aparatos utilizados para la extracción y esterificación eran complicados y no permitían llevar a cabo una estandarización; sin embargo, su trabajo puso de manifiesto la utilidad potencial del análisis de los ácidos grasos celulares y sentó las bases para investigaciones subsiguientes.

Los AGC se definen como los componentes de cualquier lípido celular que tiene una cadena lineal de 9 a 20 átomos de carbono, y esto incluye a la mayoría de los AGC localizados en la membrana celular, como glucolípidos o lipopolisacáridos pero sin incluir las cadenas largas de más de 20 átomos de carbono de otro tipo de compuestos como por ejemplo los ácidos micólicos (Moss y Moss, 1983).

Cecchini y O'Brien, en 1968 contribuyen a la diferenciación de *Escherichia coli* y otras bacterias utilizando sus perfiles lipídicos obtenidos por cromatografía gas-líquido. La diferenciación de *Clostridium sordelli* y *Clostridium bifermentans*, se realizó con el mismo método por Bousfield y colaboradores (1969 y 1971) analizaron los ácidos grasos obtenidos de extractos de especies de *Neisseria*.

La temperatura y el medio de cultivo utilizado son los factores que analiza Kaneda como aquellos que afectan de manera importante la concentración de ácidos grasos en *Bacillus cereus*. En 1973, Amstein y Hartman encontraron diferencias entre cuatro especies de enterobacterias en el ácido graso ciclopropano C 19:0, que fueron lo suficientemente significativas y reproducibles para utilizarse como un criterio taxonómico diferencial.

Dada la importancia y el gran número de especies que agrupa la familia *Enterobacteriaceae*, varios autores como Gehrke y Goerlits en 1963, Brian y Gardner en 1967, Cronan en 1975, Gjerde en 1980, Häusler y Richter en 1983 quien también analizó a la familia *Vibrionaceae* y *et al* en 1989, utilizaron la cromatografía de gases para identificar e intentar esclarecer la taxonomía de diversos géneros pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* y coinciden en que la técnica de cromatografía de gases es un método eficaz para una identificación de rutina rápida y precisa.

Moss y Dees *et al* (1975), llevaron a cabo un estudio para la identificación de microorganismos con el análisis de ácidos grasos celulares por cromatografía de gases, acoplada a espectrofotometría de masas; en 1980 citan el trabajo realizado por cromatografía de gases para analizar los ácidos grasos de *Propionibacterium acnes*. En 1982 Moss y Nuñez-Montiel, reportan un trabajo sobre el análisis de ácidos grasos de cadenas cortas en *Clostridium difficile* utilizando una columna capilar de sílice fundido.

El análisis numérico de los perfiles de ácidos grasos de corineiformes, actinobacterias y bacterias fue utilizado por Bousfield *et al* en 1983, para la identificación de esos microorganismos.

Hausier y Richter utilizan rutinariamente la cromatografía de gases desde 1985. identificación de aislamientos de bacterias de las familias *Enterobacteriaceae* y *Vibr* procedentes de cuerpos de agua y redes de distribución de agua potable. Además el labor microbiología del Instituto de Investigaciones del Agua de Praga presta servicio a la indus la identificación de levaduras vía cromatografía de gases. En 1986 Rasoamanjara y colab caracterizaron especies del género *Flavobacterium* por análisis de ácidos grasos y en 1987 *et al* de *Eubacterium lentum*; en 1988 Monteoliva-Sánchez en *Deleya halophila*, también el efecto que provoca la temperatura y la concentración de sales en su crecimiento. En es año Eerola y Lehtonen (1988), estudiaron el método cromatográfico para su aplicación en l. En 1989 Johnson y colaboradores, desarrollaron un método específico para la identific *Clostridium difficile* por cromatografía gas líquido.

Brondz y colaboradores (1989), evaluaron los ácidos grasos de levaduras por cromatografía de gases, como una alternativa de los métodos quimiotaxonómicos usuales.

Actualmente los estudios relacionados con esta área tienen como objetivo utilizar el método cromatográfico como una alternativa o prueba complementaria en la identificación de microorganismos y su empleo es cada vez más frecuente en la taxonomía (Kazda *et al*, 1992).

En 1990 Ahmad y colaboradores elaboraron un árbol filogenético de un grupo de enterobacterias con base en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos, mientras que Matsuda y colaboradores (1990), estudiaron los niveles de glucolípidos y la producción de ácidos grasos en *Serratia rubideae*; Okuyama y colaboradores (1990) identificaron los ácidos grasos insaturados en bacterias psicrófilas como *Vibrio* spp.

Por último, Hidetoshi y colaboradores (1990), determinaron ácidos grasos transinsaturados en *Vibrio* spp, por cromatografía gas líquido. Del total de metilésteres de ácidos grasos que fueron analizados, demostraron que los ácidos grasos de los glicerolípidos y fosfolípidos son el C 16:1 y C 18:1 y concluyeron que estos ácidos grasos transinsaturados pertenecen a los géneros *Vibrio*, *Pseudomonas* y *Enterobacterium* respectivamente.

Tomando en cuenta el conocimiento de las bases moleculares y el desarrollo de la instrumentación analítica es importante hacer una apreciación del uso potencial y las limitaciones de esta tecnología. Los ácidos grasos celulares han sido estudiados en la mayoría de los microorganismos, pero el éxito de su uso en la identificación no puede considerarse como satisfactorio debido al aún limitado alcance de los estudios y a la utilización de diferentes o no muy representativos modelos de instrumental. Además los cambios en la técnica, por ejemplo, las condiciones de cultivo hacen variar la composición de los AGC, al menos cuantitativamente (Drucker, 1974; Lechner, 1982; Kazda *et al*, 1992).

Los compuestos biogénicos a los que se hace referencia se han estudiado por cromatografía gas líquido, más que cualquier otro tipo de componente bioquímico (Dees y Moss, 1978; Henrichs, 1966; Johnson *et al*, 1989). En la actualidad no existe un método que se haya aceptado como estándar para la extracción de lípidos de la célula bacteriana y como consecuencia el número de procedimientos técnicos es muy grande (Abel *et al*, 1963; Amstein y Hartman, 1973; Canonica y Pisano, 1968; Cecchini y O'Brien, 1968; Drucker, 1973; Eerola y Lehtonen, 1988; Gurr y James, 1980; Johnson, 1984).

En 1983 Lambert publicó un estudio con relación a 29 cepas, 10 del género *Vibrio*, 3 de *Aeromonas*, 3 de *Photobacterium*, *Plesiomonas shigelloides* y *Escherichia coli* inclinado hacia los cambios ocurridos en la nomenclatura de la familia *Vibrionaceae*, la identificación de los miembros de esta familia se complicaba por las pruebas de identificación tradicionales, debido a las características bioquímicas, fenotípicas y genéticas de estos. Sin embargo utilizando la técnica de cromatografía de gases se encontró mucha similitud en la composición de sus ácidos grasos celulares, con las diferencias suficientes como para usarla en la identificación de estas bacterias a nivel de género y especie.

Urdaci en 1990, realizó la caracterización de 22 especies de *Vibrio* y 5 de *Aeromonas* utilizando cromatografía de gas-líquido con fines quimiotaxonómicos y al igual que Lambert, en 1983 encontró diferencias suficientes para agrupar las cepas dentro de una u otra especie del género *Vibrio*. Mencionar que ambos autores reportan los mismos ácidos grasos presentes en la membrana de *V. cholerae*.

Para sustituir los métodos convencionales de identificación y diferenciación, se ha incrementado la aplicación de técnicas instrumentales en microbiología.

Los estudios referentes al medio ambiente siguen utilizando métodos convencionales para la detección de bacterias patógenas de acuerdo a lo reportado por, Alonso, Papapetropoulou, 1996, quienes trabajaron en el aislamiento de *Salmonella* a partir de diferentes tipos de agua utilizando métodos bioquímicos para su caracterización.

Hu, 1995 hace un estudio comparativo de medios de cultivo para el aislamiento y identificación de *Salmonella*, mediante de pruebas bioquímicas. De igual forma Falcão, Madsen, 1994; Gawthorne, 1996; Silva, 1997 y Son, 1998 aislaron *Salmonella* y *V. cholerae* de distintos tipos de agua con la aplicación de técnicas basadas en pruebas bioquímicas.

La revisión bibliográfica de los últimos cinco años indica que la técnica de cromatografía de gases no ha sido utilizada en la identificación de estos microorganismos, excepto un reporte por *typhi* realizado por Cho en el sur de Corea en 1999 quien estudia a este microorganismo como agente etiológico potencial, al cual identifica por cromatografía, sin embargo no refiere el tipo de la bacteria ni la técnica utilizada.

En este contexto nuestro estudio pretende promover la técnica en México como un método rápido y preciso para la identificación de organismos patógenos en diferentes tipos de agua.

4.8 Lípidos en bacterias

Los lípidos en los organismos juegan un papel fundamental en la estructura de las membranas celulares, membranas celulares y como canales de energía. Desde el punto de vista taxonómico los componentes lipídicos más importantes son los ácidos grasos. Estos aparecen en la naturaleza

ácidos lineales saturados, insaturados, con presencia de ramificaciones, hidroxilaciones y ciclopropanos (Barr, 1977).

Las bacterias gram negativas, móviles, anaerobios facultativos, tienen una estructura celular constituida por la membrana citoplasmática, la capa peptidoglicana y la membrana externa (Davis, 1996). La primera se compone de fosfolípidos (principalmente fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol, y cardiolipina) y una gran variedad de proteínas. Los flagelos están anclados en el citoplasma y atraviesan a la membrana citoplasmática. El peptidoglicano confiere rigidez y está formado por cadenas paralelas de polisacáridos constituidos por ácido n-murámico, y N- acetilglucosamina.

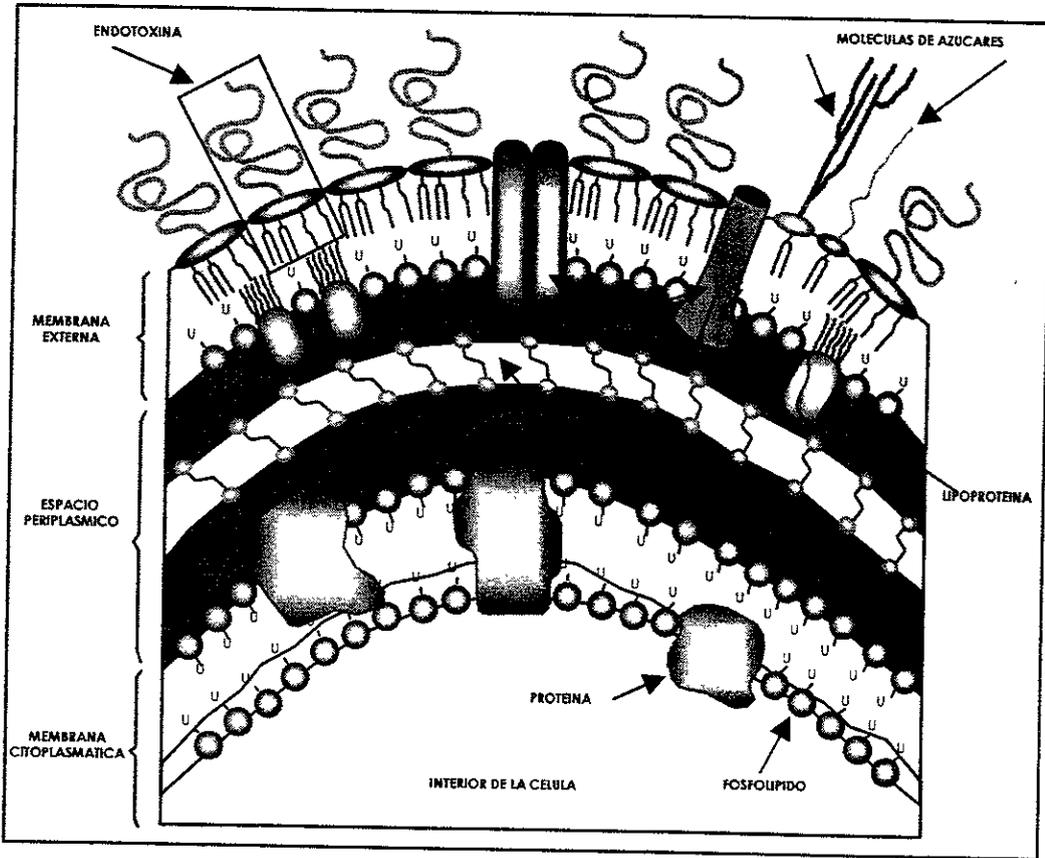


Fig. 2. Diagrama de la membrana celular bacteriana

La membrana externa está formada por proteínas, fosfolípidos y polisacárido (LPS). El último ocupa aproximadamente el 45 % de la superficie (Sommenwirth, 1984). La membrana actúa como barrera impidiendo la entrada de sustancias tóxicas, como antibióticos y detergentos.

contiene los receptores para bacteriófagos 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" (fig. 2).

El LPS establece interacciones con las otras moléculas que forman parte de la membrana externa. Es un complejo macromolecular formado por el antígeno O y la endotoxina de las bacterias gram negativas. Estructuralmente el LPS 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 oligosacáridas de repetición. Entre los monosacáridos que la forman se encuentran los azúcares neutros, azúcares amino 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 a las enterobacterias y es similar para todas las bacterias gram negativas. Se trata de un complejo de polisacáridos.

El lípido A como ya se dijo le confiere su actividad de endotoxina. Está formada por un tetra-
disacárido de glucosamina en unión (1'-6) tiene fosfatos o pirofosfatos en posiciones 1 y 3. El grupo hidroxilo de disacárido de glucosamina en posición 6' está sustituido por el ácido 3-O-
d-manotulónico. Los grupos hidroxilo y amino están sustituidos por ácidos grasos como el ácido hidroximi-
hidroximi mirístico, láurico, mirístico, palmítico y otros ácidos grasos (Jones, 1988).

Hay que considerar que la fuente primaria de ácidos grasos en las células microbianas son los lípidos, además de los fosfolípidos de la membrana o el lípido A, componente de los lipopolisacáridos en las bacterias gram negativas y ácido lipoteicoico en las bacterias gram positivas. El contenido de ácido graso de todos los lípidos está determinado por la vía biosintética de la especie dada y el proceso se inicia por la síntesis de la coenzima A del éster de un ácido graso. Una molécula de acetil coenzima A utilizada como iniciador. La mayoría de las bacterias sintetizan ácidos grasos con cadenas de 9 a 20 átomos de carbono y los más comunes son los de 16 átomos de carbono. El ácido graso saturado hexadecanoico (de 16 átomos de carbono) en particular está muy conservado entre los procariontes.

Las propiedades variables hacen que la composición distintiva de AGC de un organismo incluya diferencias cuantitativas en el contenido de ácidos grasos así como la presencia de otros de los cuales se han identificado más de 100 (Sasser, 1990). Generalmente los perfiles presentan en un ámbito de 5 a 15 AGC en cantidades significativas. Algunos organismos con genomas pequeños, tales como *Rochalimaea* spp, presentan pocos ácidos grasos mientras que las eubacterias, tales como *Xantomonas* spp, tienen más de 20 ácidos grasos.

Las bacterias tienen algunos ácidos grasos que son únicos y que no se encuentran en otros eucariotes, por ejemplo, las cadenas ramificadas y el contenido de ciclopropano de los ácidos grasos que caracteriza a muchas bacterias gram positivas y gram negativas respectivamente, se encuentran en hongos (o en humanos). Contrariamente, los ácidos grasos poliinsaturados que se encuentran en los organismos superiores, no están en las bacterias aeróbicas.

Las bacterias gram negativas generalmente tienen una alta proporción de ácidos saturados y monoinsaturados con un número inalterable en la cadena de carbonos, a diferencia de las bacterias gram positivas. Estas últimas presentan como ejemplo a *Bacillus* spp y a los estafilococos que tienen ácidos grasos celulares con cadenas de átomos de carbono impares, ramificadas y saturadas, a su vez una baja proporción de cadenas lineales saturadas. No así las corineiformes y los estreptococos que tienen cadenas lineales y ácidos grasos insaturados (Bousfield *et al*, Kaneda, 1971).

De primordial importancia es el análisis de los polisacáridos, los aminoácidos y especialmente 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 y 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 (James, 1956).

La composición química de las bacterias es semejante a la de otros microorganismos, aproximadamente 90% de agua y el 10% de peso seco, este último integrado por ADN, ARN, proteínas, polisacáridos, lípidos y fosfolípidos (Carpenter, 1979).

Los lípidos son una clase de constituyentes celulares insolubles en agua y solubles en disolventes no polares, tales como éter, cloroformo y benceno (Blanco, 1988). Se han subdividido en lípidos complejos y se caracterizan porque contienen ácidos grasos como componentes. Comprender a los acilglicéridos, los fosfoglicéridos, los esfingolípidos y las ceras, difiere en estructura de los esqueletos a los que se hallan unidos por covalencia. 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 (Lenninger, 1979).

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 ha sido estudiado por cromatografía de gas-líquido, más que cualquier otro tipo de compuesto bioquímico (Dabrio, 1973; Moss, 1975; Moss, 1988).

4.9 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 (Rasoamnjara, 1986).

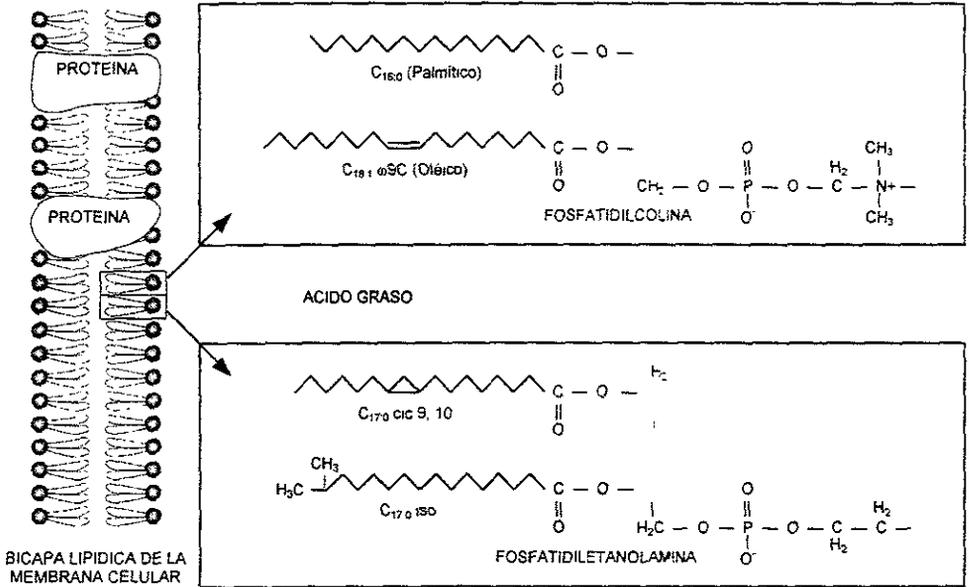


Fig. 3. Diagrama de la composición de los ácidos grasos y su disponibilidad en la membrana celular

Incluyendo todos los lípidos, estos son mucho más abundantes en la pared de las células gram negativas que en la de las gram positivas (Stainer, 1986). Las bacterias no acumulan lípidos como material de reserva, sin embargo contienen cantidades considerables de ellos como constituyentes de sus sistemas membranosos (Gottschalk, 1979).

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 ciclopropano (Starr, 1981); 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 (Acetil CoA) (Gottschalk, 1979).

Los ácidos grasos no saturados iso y anteiso son aún raros en la naturaleza. La determinación de la posición de la doble ligadura en estos ácidos grasos se consideró necesario. En aspectos de biosíntesis, esto incrementa el valor taxonómico (Boon, 1977). 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 (Lenninger, 1979). 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 (Boon, 1977).

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 con respecto a estudios metabólicos.

Por otra parte, en el análisis cromatográfico independientemente de que la naturaleza de la retención sea adsorción, solubilidad, ligaduras químicas, polaridad o filtración molecular, la columna retiene algunos componentes por más tiempo que otros. Cuando en la fase gas los componentes se mueven hacia la salida de la columna son selectivamente retenidos por la fase estacionaria. Como consecuencia, todos los componentes pasan a través de la columna a velocidades variables y emergen en orden inverso a su retención en los materiales de la columna.

Así los ácidos grasos de bajo peso molecular, son menos afines a la fase estacionaria de la columna, por lo que eluyen más rápidamente a través de ella y son los primeros en registrarse. Sucede lo contrario con los de alto peso molecular, que tienen más afinidad por la columna, e eluyen más lentamente y se registran en un tiempo mayor.

Con respecto a lo anterior, se debe tomar en cuenta la información generada en los primeros estudios, que es de gran importancia, pues comparada con la más reciente, es un antecedente que sirve para reforzar nuestro criterio con respecto al análisis de los AGC en la microbiología.

Actualmente diversos trabajos, discuten la variación en los valores de los ácidos grasos como producto de los cambios que ocurren en los parámetros experimentales (Lorraine, 1980) que los perfiles cromatográficos pueden variar con cambios asociados a: La dilución usada en los cultivos y substrato utilizado (Cronan, 1975), vitaminas y pH (Holmes, 1978), temperatura de incubación (Tuppie, 1982), aireación y concentración de micronutrientes (Moss, 1987) y edad del cultivo (Okuyama, 1990).

4.9.1 Nomenclatura de los ácidos grasos.

Los ácidos grasos son propiamente llamados de acuerdo al número de átomos de carbono, el tipo de grupo funcional y la localización de dobles ligaduras. El nombre sistemático puede simplificarse escribiendo C seguido del número de átomos de carbono a la izquierda de los puntos y el número de dobles bandas a la derecha.

Se encuentran diferentes costumbres para localizar la posición de las dobles ligaduras en los isómeros *cis* o *trans*. ω , En algunos casos la letra omega del alfabeto griego, indica la posición de la doble ligadura del hidrocarburo al final de la cadena y *c* y *t* indican la configuración *cis* y *trans* de los átomos de hidrógeno.

Es importante hacer notar que, así como otras costumbres, la numeración de las cadenas ramificadas, contenido de ciclopropano y ácidos grasos hidroxilados proceden del grupo carboxilo.

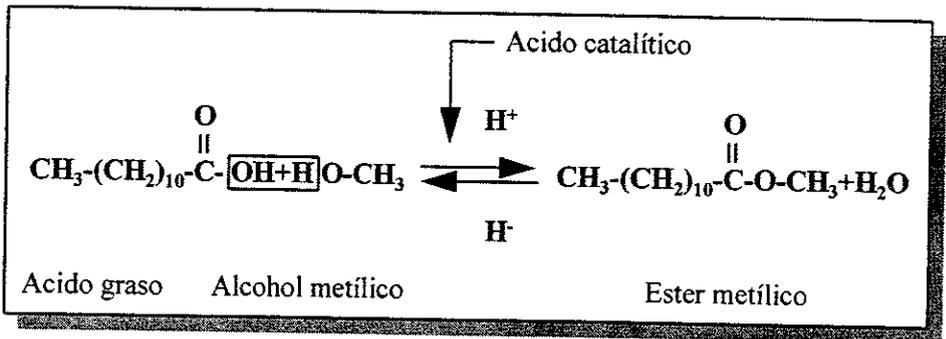
final de la molécula. Algunos ácidos grasos tienen nombre común que refleja la fuente de donde fueron originalmente identificados, p. ej. ácido "lactobacílico" de *Lactobacillus* spp y otros, pero que no todos los ácidos grasos tienen nombres comunes. el uso de esta terminología puede confundir, y generalmente se prefiere una nomenclatura sistemática o simplificada. (Gehrke, 1991).

Los ácidos grasos no se pueden analizar cromatográficamente como tales, por lo que es necesario extraerlos por medio de la esterificación.

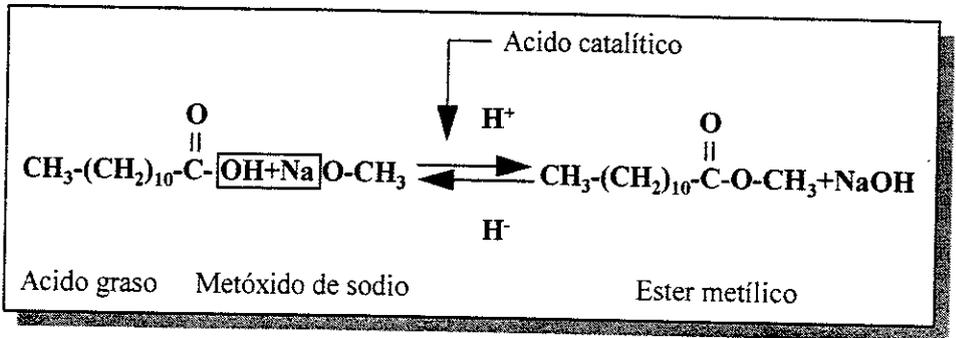
4.9.2 Esterificación de ácidos grasos

La reacción para efectuar la esterificación es un ejemplo importante de una reacción nucleofílica, en donde los ácidos grasos reaccionan con el alcohol metílico (CH_3OH) o con una molécula semejante a éste y que realice la misma función, como es el caso del metóxido de sodio (CH_3ONa), ya que el alcohol metílico o el metóxido de sodio son necesarios para la metilación del ácido graso o ácidos grasos (Gehrke, 1963)

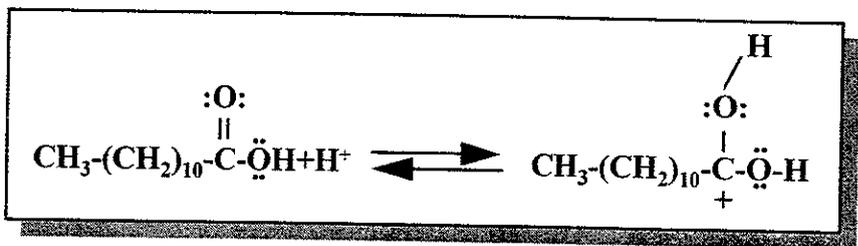
Esterificación con alcohol metílico



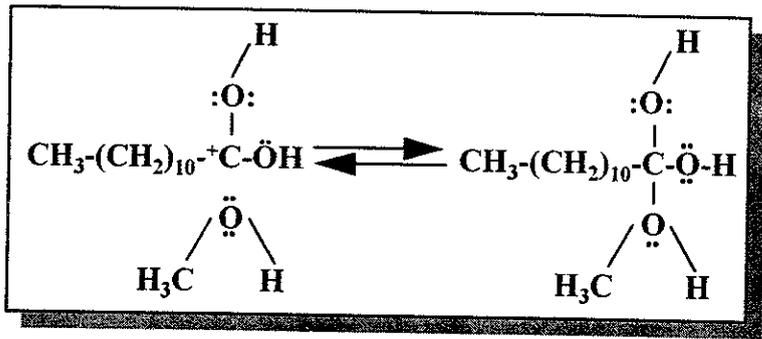
Esterificación con metóxido de sodio



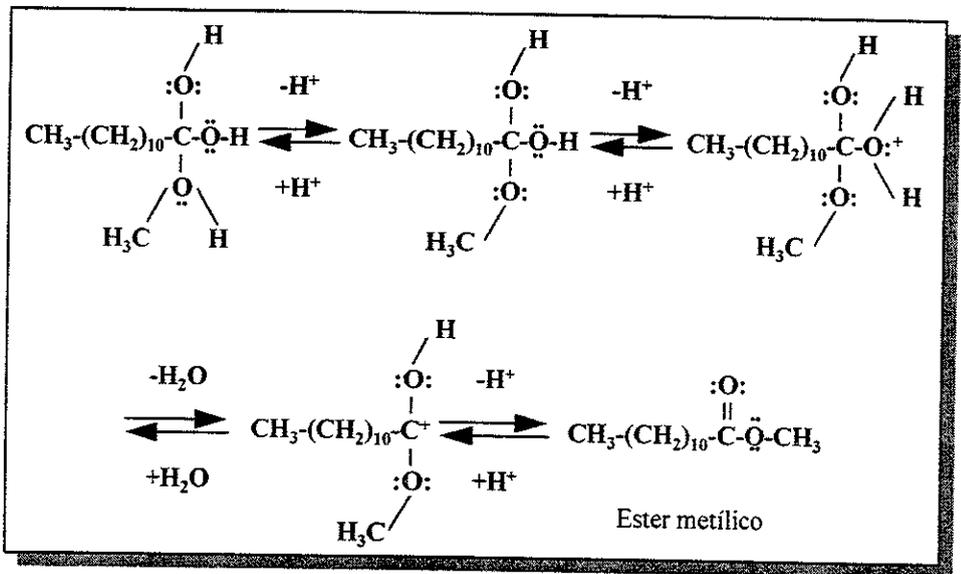
La reacción de esterificación requiere de la presencia de un ácido catalizador. El primer paso de la reacción es la protonación del grupo carboxilo hacia el doble enlace de oxígeno del ácido graso.



El grupo carboxilo protonado es rápidamente atacado nucleofílicamente.



El producto formado por este ataque bajo una transferencia del ion hidronio eliminación, dan el producto final (Glass, 1971; Monteoliva-Sánchez, 1988).



Capítulo 5. OBJETIVOS.

General.

- 5.1 Implementar la técnica de cromatografía gas-líquido en el análisis de los ácidos celulares, para la identificación de bacterias patógenas aisladas de agua residual.

Particulares.

- 5.2.1 Aislar e identificar *Salmonella typhi* y *Vibrio cholerae* en agua residual proveniente de canal de la Ciudad de México.
- 5.2.2 Obtener el perfil lipídico de cepas tipificadas de *Salmonella typhi* y *Vibrio cholerae*, mediante el análisis de sus ácidos grasos celulares, utilizando la técnica de cromatografía de gases.
- 5.2.3 Obtener el perfil lipídico de cepas de *Salmonella typhi* y *Vibrio cholerae* aisladas de agua residual, previamente identificadas por el sistema miniaturizado API 20 E.
- 5.2.4 Caracterizar cepas de bacterias patógenas aisladas de agua residual, por el análisis de los ésteres metílicos de sus ácidos grasos celulares.

Alcances.

- 5.3.1 Utilizar la técnica como análisis de rutina, en el laboratorio de microbiología del Instituto de Ingeniería de la Universidad Nacional Autónoma de México.
- 5.3.2 Difundir la técnica implementada como un método preciso para la identificación de bacterias patógenas en el ambiente.

Capítulo 6. JUSTIFICACION.

Los estudios de contaminación en microbiología del agua, se enfocan principalmente en la determinación de organismos coliformes (enterobacterias). Estos microorganismos, son indicadores de contaminación fecal y en consecuencia representan un peligro potencial a la salud, ya que las enfermedades infecciosas más comunes provocadas por la ingestión de agua contaminada incluyen, campilobacteriosis, cólera, gastroenteritis por *E. coli* enterotoxigénica, salmonelosis, fiebre tifoidea y shigelosis.

Debido a los inconvenientes que implica el uso de técnicas convencionales de identificación para microorganismos; es necesario implementar nuevas técnicas.

La identificación de bacterias por cromatografía de gases, es una excelente alternativa. Esta técnica, tiene superioridad respecto a las técnicas convencionales, ya que disminuye el costo humano y reduce el tiempo del proceso total en la identificación.

Por otra parte, apoya la información con respecto a las pruebas bioquímicas, y en consecuencia de esto, se intensifica la posibilidad de desarrollar investigaciones bacteriológicas en diversas áreas de interés, como es el caso de: el área clínica, la industria alimentaria, el desarrollo agrícola, la prosperidad ecológica y en general las investigaciones ambientales.

El análisis por cromatografía gas líquido, es una técnica que ha sido utilizada para la identificación y clasificación de una gran variedad de microorganismos, incluyendo miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, en países desarrollados como: Francia (Urdaci, 1990); República Checa (Häusler, 1989); Estados Unidos (Lambert, 1983 y Johnson, 1989) y España (Monte Sánchez, 1988) entre otros.

La relevancia de la investigación se adquiere, en gran medida, por que se ha comprobado la persistencia de bacterias patógenas en aguas de desecho y en redes de distribución, además del limitado desarrollo que existe en investigaciones de tipo ambiental, en los países latinoamericanos. Por esta razón, es necesario apresurar el progreso en los sistemas de identificación de microorganismos que afectan directamente al hombre y su ambiente.

En este contexto, es de suma importancia tomar en consideración, que el desarrollo de este trabajo en el laboratorio, debe ser estandarizado para obtener resultados confiables en la identificación y clasificación de las bacterias de interés. De tal forma, que a pesar de que la cromatografía gas líquido para determinar ácidos grasos celulares en bacterias, ha sido utilizada en países desarrollados, aún no se ha adoptado como prueba rutinaria en los laboratorios microbiológicos en México.

Capítulo 7. METODOLOGIA.

La presente investigación, forma parte de la línea de trabajo sobre desinfección bacteriológica ambiental que se desarrolla en la Coordinación de Ingeniería Ambiental del Instituto de Ingeniería de la U. N. A. M.

7.1 Siembra de hisopos en agua residual.

Entre los meses de junio y agosto de 1998 se realizaron 6 muestreos en una planta de bombeo del gran canal de la ciudad de México.

Para aislar las bacterias de interés a partir de agua residual, se colocaron 2 hisopos de algodón por muestreo en la corriente de agua durante 18-24 h, para el aislamiento de *V. cholerae*, el hisopo se transportó en medio Cary Blair y para aislar *S. typhi*, el hisopo se transportó en caldo tetratión.

7.2 Aislamiento de *Vibrio cholerae*.

Una vez en el laboratorio se sembraron 10 mL del medio de transporte en un medio de enriquecimiento, Agua Peptonada Alcalina, doble concentración (APA [2]) para la proliferación de la bacteria, la cual se incubó a 37°C por 6 h, se continuó con la incubación hasta 24 h.

Transcurridas las 6 horas se sembró en agar selectivo TCBS (tiosulfato citrato bilis saccharose) por estría cruzada para obtener colonias perfectamente aisladas y facilitar la distinción de colonias con las características propias de *V. cholerae*, amarillas, lisas, pegajosas, opacas y con olor a H₂S, repitiendo el proceso después de 24 h de incubación.

Una vez seleccionadas las colonias características, se sembró en agar Kligler tubo para la confirmación por picadura y estría para tener mayor selectividad y se eligieron aquellas que presentaron una reacción K/A (alcalina/ácida), sin formación de gas ni de H₂S.

Los cultivos seleccionados se sembraron en placas de agar BHI (Brain Heart Infusion) y se incubó por 24 h a 37°C para purificar el cultivo y proceder a la identificación de las bacterias.

7.2.1 Prueba de oxidasa.

A partir de los cultivos en agar BHI se tomó una colonia perfectamente aislada en un aplicador de madera estéril y se colocó en papel filtro impregnado con el reactivo 4 N, tetrafenilendiamina, seleccionando los cultivos que dieron una reacción positiva (la colonia se tornó de color violeta intenso) al oxidar el reactivo.

7.2.2 Identificación por API (Analytical Profile Index) 20E.

Las bacterias aisladas de las muestras de agua residual cruda se identificaron por el sistema miniaturizado comercial de identificación API 20 E bioMérieux, como se describe en la técnica, Biomérieux, 1997. Los aislamientos fueron identificados usando como testigo la cepa *V. cholerae* ATCC 14035.

7.2.3 Serología de *Vibrio cholerae*

Una vez identificadas las cepas de *V. cholerae*, se realizó la prueba serológica para determinar si estas poseen el antígeno O del grupo 1. Esta prueba consistió en colocar una gota de antisero polivalente y posteriormente una asada del cultivo en cuestión, se mezcló perfectamente y se observó la aglutinación con el suero.

Al determinar esto, las cepas se catalogaron como *V. cholerae* O1 (aglutinaron) y *V. cholerae* No-O1 (no aglutinaron).

7.2.4 Determinación de la toxina colérica.

La toxina colérica se determinó por la prueba de aglutinación en látex con el kit comercial VET-RPLA (ficha técnica, kits detection toxin, Oxoid). El cual tiene el propósito de detectar la toxina LT (termolábil) y la toxina colérica (CT) en cultivos fluidos.

7.3 Aislamiento de *Salmonella typhi*

El hisopo colectado en el medio de transporte se incubó a 44.5°C; después de 6 h se suspendió en 10 mL de caldo tetracionato y se continuó con la incubación a 44.5° C; simultáneamente

sembró en agar selectivo de sulfito bismuto y en agar S-S (*Salmonella* y *Shigella*) por estria en estas placas se incubaron a 37°C por 24 h; el medio de enriquecimiento original se dejó incubado a 44.5°C y se siguió resembrando en los medios selectivos ya mencionados cada 24 h.

A partir de los medios selectivos se seleccionaron las colonias características de *Salmonella* opacas, transparentes, traslúcidas y generalmente lisas en agar S-S y colonias negras con brillo metálico y un halo traslúcido en agar sulfito bismuto.

Una vez seleccionadas las colonias características, se sembró en agar Kligler por picadura y se incubó a 37°C por 24 h; para una mayor selectividad se eligieron aquellas que presentaron una reacción K/A (alcalina/ácida), con ó sin formación de gas y presencia de H₂S.

Para purificar el cultivo, sembré en placas de agar BHI que se incubaron por 24 h para proceder a la identificación de las bacterias.

7.2.1 Prueba de oxidasa.

A partir de los cultivos en agar BHI se tomó una colonia perfectamente aislada con un aplicador de madera estéril y se colocó en papel filtro impregnado con el reactivo 4 N, tetrametilfenilendiamina, seleccionando los cultivos que dieron una reacción negativa (no se produce cambio de color en las colonias).

7.2.2 Identificación por API (Analytical Profile Index) 20E.

Las bacterias aisladas de las muestras de agua residual cruda se identificaron por el sistema miniaturizado comercial de identificación API 20 E bioMérieux, como se describe en la técnica, Biomérieux, 1997. Los aislamientos fueron identificados usando como testigo la cepa tipo *S. typhi* ATCC 0779.

7.3 Conservación de cepas.

Una vez aisladas e identificadas las bacterias de interés, se conservaron en agar base sangre tubo inclinado, posteriormente se identificaron por la técnica implementada.

Los cultivos de la cepa tipificada y los aislamientos de *V. cholerae* se mantuvieron en agar base sangre tubo inclinado con 2.5% de NaCl a temperatura ambiente, mientras que la cepa tipo *S. typhi* y los aislamientos se mantuvieron en agar base sangre tubo inclinado a 4°C.

7.4 Cepas de referencia.

Los perfiles lipídicos que sirvieron como patrones de comparación, provienen de cepas puros de una cepa tipificada, para este fin se utilizaron cepas ATCC (American Type Culture Collection) con lo que se garantiza identidad fidedigna y estabilidad genética de las células, en este estudio se utilizaron cepas de *V. cholerae* ATCC 14035 y *S. typhi* ATCC 0779.

7.5 Extracción de los metil ésteres de los ácidos grasos celulares.

La implementación de la técnica se inició con el ensayo y error, para lo cual, se utilizaron cepas tipo de cada especie, además de acondicionar el equipo y probar su funcionamiento inyectando diferentes solventes y el estándar.

Para implementar la técnica se hicieron una serie de pruebas, en donde se tomaron diferentes cantidades de biomasa, no se selló con cinta teflón los tubos al momento de la metilación. principalmente se inyectaron diferentes volúmenes de muestra sin evaporar, ya que la bibliografía no especificaba que había que evaporar. Finalmente estas variables se homogeneizaron y siguió el siguiente procedimiento para la extracción.

A partir de las cepas en conservación, la bacteria se sembró en forma masiva en placa con 25 mL de agar soya tripticasa BBL lote 1000D0DHSM, se incubó a 28°C por 24 h. Posteriormente la masa bacteriana (aproximadamente 40 mg) se depositó en el fondo de un tubo de cultivo (13 X 100 mm) limpio y previamente lavado con hexáno.

Saponificación: al tubo con la masa bacteriana se le adicionó 1.0 mL del reactivo de saponificación que contiene 45g de hidróxido de sodio, 150 mL de metanol y 150 mL de agua destilada. El tubo se selló perfectamente con cinta de teflón y se agitó en vórtex por 5 a 10 segundos, posteriormente se incubó en baño de agua a 100 °C por 5 minutos, se agitó nuevamente en vórtex por 5 a 10 segundos y se continuó con la incubación a 100 °C por 25 minutos.

Se enfrió perfectamente y se adicionaron 2.0 mL del reactivo de **metilación**, el cual se compone de 325 mL de ácido clorhídrico 6.0 N y 275 mL de metyl alcohol, sellando los tubos perfectamente con cinta teflón, se agitó en vórtex por 5 a 10 segundos y se incubó a $80 \pm 1^\circ\text{C}$ por ± 1 minuto en baño de agua y se enfrió rápidamente. Este paso es de primordial importancia, ya que no debe variar ni el tiempo ni la temperatura de incubación.

Los ésteres metílicos de los ácidos grasos fueron **extraídos** adicionando 1.25 mL de una mezcla 1:1 de hexáno-methyl terbutyl ether y se selló perfectamente. Se agitó en un agitador vasculante durante 10 minutos para después remover la fase acuosa del fondo y desecharla; la fase superior donde se encuentran los ésteres metílicos (capa superior) se conservó en el tubo.

Lavado: se adicionaron 3.0 mL de hidróxido de sodio y se agitó lentamente durante minutos en el agitador vasculante, finalmente se recuperó la fase superficial (aproximadamente partes) que se observa en el tubo y se transfirió a un frasco vial de 2 mL, la muestra se evaporó aproximadamente 10 μ L con nitrógeno gas, de esta muestra, se tomaron 3 μ L para inyectar al cromatógrafo.

7.6 Análisis cromatográfico.

Las muestras de los metil ésteres de los ácidos grasos celulares se analizaron en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard modelo 6890. Los ácidos grasos de las bacterias se separaron en una columna capilar modelo HP No. 19091B-102 Ultra 2, 5% de phenyl methylsilicona (25.0 m de largo X 200 μ m de diámetro interno X 0.3 μ m de espesor).

Para el análisis de las muestras se construyó un programa de temperaturas para la columna: temperatura inicial de 170°C con una rampa de 5°C por minuto hasta alcanzar 300°C, después del análisis la temperatura se incrementó hasta 300°C durante 5 minutos para limpiar la columna.

El instrumento está equipado con un detector de ionización de flama (FID) el cual estuvo operando a 270°C. La temperatura del inyector fue de 250°C. Se utilizó como gas portador el nitrógeno con una velocidad de flujo total de aproximadamente 22.3 mL/min. El tamaño de muestra inyectado fue de 3 μ L.

Los picos de los metil ésteres para el caso de *S. typhi*, fueron identificados comparando el tiempo de retención con un estándar conocido de 26 auténticos ésteres metílicos para la identificación de bacterias SUPELCO 4-7080, diluidos en metil caproato, que se inyecta diariamente y analizaron bajo las mismas condiciones que las muestras.

Sin embargo esta mezcla de ácidos grasos es utilizada sólo para la familia *Enterobacteriaceae*, por lo que para el caso de *V. cholerae* se adicionaron 5 ésteres metílicos debido a que esta especie pertenece a la familia *Vibrionaceae*.

El equipo cuenta con una estación de trabajo y un software Chemstation que calcula automáticamente el porcentaje de las áreas para cada pico.

Se realizaron 55 determinaciones para la cepa tipo de *V. cholerae* ATCC 14035 y 55 para *S. typhi*, ATCC 0779. El punto de interés son los ácidos grasos con el número de átomos de carbono en el intervalo de 9 a 20. Los ácidos con una cadena más corta aparecen como productos intermedios y no se tomaron en consideración.

Se determinaron 10 repeticiones para cada aislamiento en ambas especies.

Los picos de importancia se identificaron al comparar los tiempos de retención con el cromatograma estándar y se analizó la información.

Se calculó la media aritmética para los tiempos de retención de cada cepa tipificada como para cada cepa aislada. En el caso de las áreas se calcularon los porcentajes para cada pico tomando en cuenta el total de las áreas presentadas en cada cromatograma y se obtuvo la suma de los porcentajes.

De igual manera se calculó desviación estándar, como medida de variación para cada elemento metílico de los ácidos grasos celulares tanto respecto a las áreas de los picos, como a los tiempos de retención.

Así mismos se calculó el intervalos de confianza para los tiempos de retención.

Aislamiento de bacterias patógenas en agua residual

Vibrio cholerae

Concentración de la muestra: Se coló un hisopo de Moore durante 24 h en el lugar de muestreo

Transporte de la muestra: El hisopo se transportó en medio Cary Blair al laboratorio.

Proliferación: Se sembraron 10 mL del medio de transporte en 10 mL de caldo de enriquecimiento (Agua Peptonada Alcalina). Se incubó a 37°C por 18-24 h.

Selectividad: A partir del medio de enriquecimiento se sembró en agar selectivo TCBS y se incubó a 37°C por 18-24 h.

Salmonella typhi

Concentración de la muestra: Se colocó un hisopo de Moore durante 24 h en el lugar de muestreo

Transporte de la muestra: El hisopo se transportó en caldo tetrionato al laboratorio.

Proliferación: Se sembraron 10 mL del medio de transporte en caldo de enriquecimiento (caldo tetrionato). Se incubó a 44.5°C por 6 h, ambos medios se reincubaron por 24 h.

Selectividad: A partir del medio de enriquecimiento se sembró en agar selectivo (S-S y Sulfito Bismuto), se incubó a 37°C 24 h.

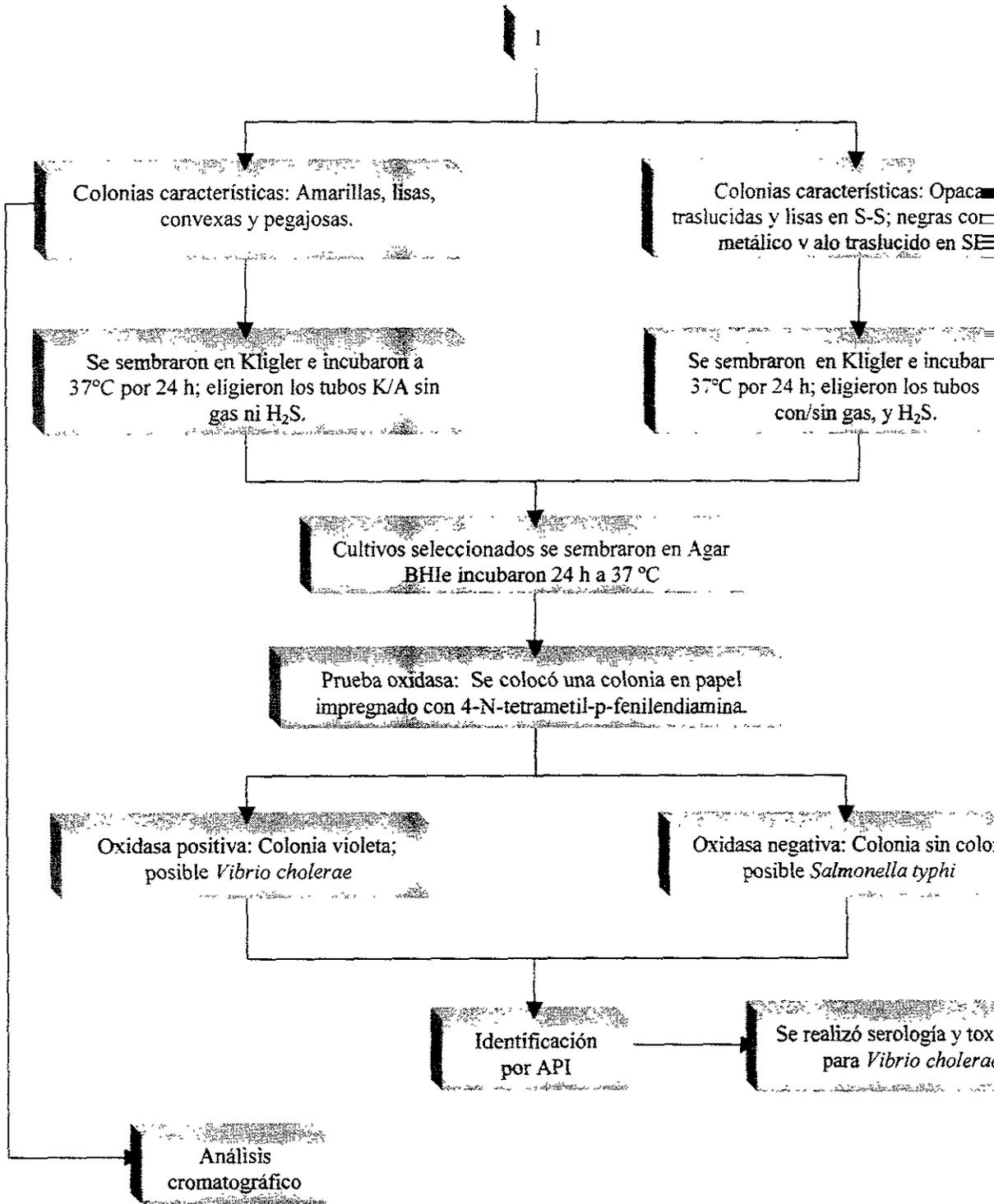


Fig 4. Procedimiento general para el aislamiento e identificación de *Vibrio cholerae* y *Salmonella typhi* a partir de agua residual.

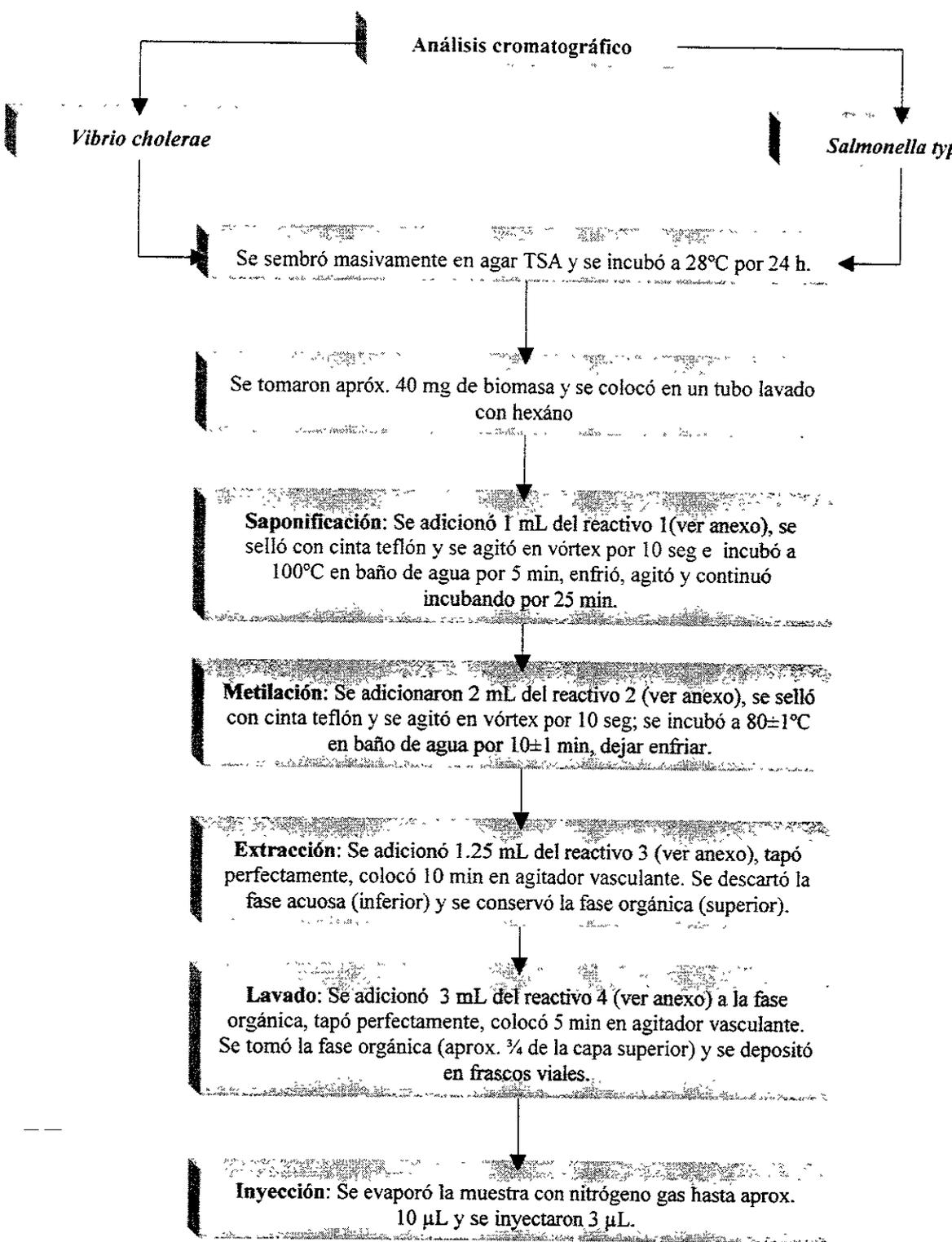


Fig. 5. Procedimiento general para la identificación de *Vibrio cholerae* y *Salmonella typhi* aisladas de agua residual, utilizando la técnica de cromatografía de gases.

Capítulo 8. RESULTADOS.

8.1. Aislamiento de *Vibrio cholerae*

De los seis muestreo que se realizaron en agua residual del gran canal de la Ciudad de México se aislaron 25 cepas de *V. cholerae*.

El aislamiento se obtuvo a partir de la selección de colonias características en medio selectivo de TCBS: colonias pequeñas (1-2 mm de diámetro), amarillas planas, ligeramente convexas, “pegajosas”, con centro opaco y periferia traslúcida.

Otra de las pruebas selectivas para colonias presuntivas de *V. cholerae* es la siembra en agar Kligler, en donde se observó una reacción alcalina/ácida (K/A), sin producción de gas H_2S ; dicha reacción permitió la diferenciación presuntiva temprana de los cultivos.

8.1.1 Prueba de oxidasa.

Seleccioné las cepas que tuvieron una reacción positiva, (colonia color violeta), dicha reacción permitió la diferenciación preliminar de las cepas seleccionadas.

8.1.2 Identificación por API (Analytical Profile Index) 20E.

Fue posible aislar 5 cepas en promedio por muestreo en el agua residual, por lo que se obtuvieron un total de 25 cepas de *V. cholerae* identificadas por el sistema miniaturizado API 20E (fig. 6). De las cuales se seleccionaron 15 para ser identificadas por la técnica implementada.

REF: C980624-12
 Fecha: 02107198
 Origen: Agua residual; Planta de bombeo "Lago"

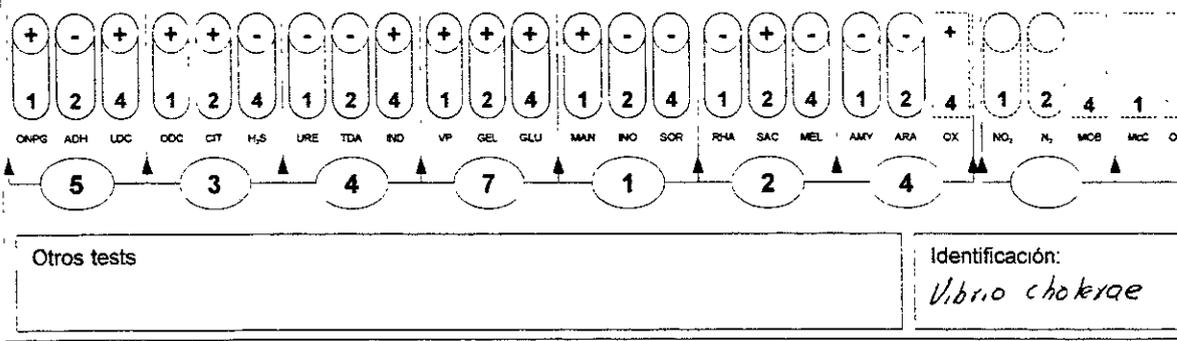


Fig 6. Hoja de resultados para la identificación de *Vibrio cholerae* mediante la técnica comercial API 20E.

8.1.3 Serología de *Vibrio cholerae*

Realicé la prueba serológica a los cultivos de *V. cholerae*, para detectar la presencia del antígeno O somático termoestable, y se determinó que 24 cultivos no aglutinaron con el antígeno O1. En una de las muestras se aisló una cepa de *V. cholerae* que aglutinó con el antisuero polivalente, la cual presentó características de rugosidad.

De forma tal que estamos hablando de *V. cholerae* O1 causante del cólera epidémico, este resultado adquiere relevancia, debido a la práctica común del reuso de agua residual no tratada en nuestro país.

8.1.4 Determinación de la toxina colérica.

Se llevó a cabo la determinación de la toxina colérica, con un sistema comercial RPLA de Oxoid a todas las cepas aisladas. Ninguna cepa produce la toxina colérica, incluida la de *V. cholerae* O1. Sin embargo, las cepas se enviaron a corroborar al Instituto Nacional de Referencia Epidemiológicos con los mismos resultados.

8.2 Aislamiento de *Salmonella typhi*

Del agua residual del gran canal de la Ciudad de México que analicé, en los seis muestras detecté la presencia de *S. typhi*. La identificación de esta bacteria se realizó como se describe en la metodología con los siguientes resultados:

Se reconocieron colonias típicas en agar Sulfito Bismuto (negras con brillo metálico) y en agar S-S (opacas, transparentes, traslúcidas y generalmente lisas). De cada medio seleccioné 9 colonias típicas.

Dichas colonias se sembraron en agar kligler y observé una característica muy interesante es que los cultivos no produjeron H_2S , aunque si hubo gas y la reacción a la utilización de azúcares fue A/A.

En un inicio se optó por desechar estos cultivos, sin embargo al observar la recurrencia de esta característica, la alternativa fue identificar estas cepas aisladas.

8.2.1 Prueba de oxidasa.

La diferenciación preliminar de la prueba de oxidasa, dio como resultado que los cultivos presuntivos mostraron una reacción negativa, es decir que las colonias no cambiaron de color.

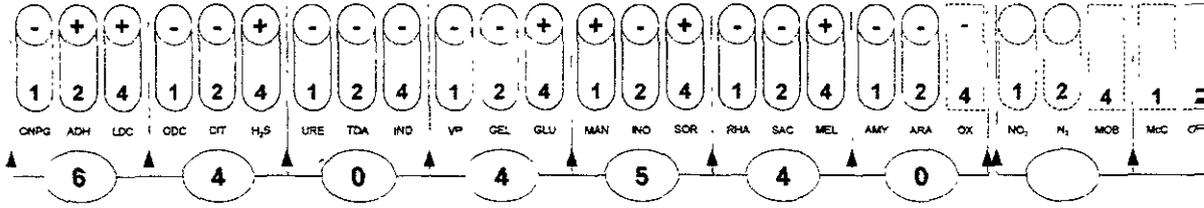
8.2.2 Identificación por API (Analytical Profile Index) 20E.

Determiné que las cepas aisladas fueron identificadas por el sistema API 20E. Para *Salmonella* spp (fig 7), obtuve un total de 34 cepas. Para fines prácticos, seleccioné 9 cepas que identifiqué por cromatografía con resultados muy importantes para la aplicación de mi tesis, los cuales se mencionarán más adelante.

REF: C980624-J-6

Fecha: 28/06/98

Origen: Agua residual; Planta de bombeo "Lago"



Otros tests:

Identificación:

Salmonella spp.

Fig 7. Hoja de resultados para la identificación de *Salmonella* spp mediante la técnica comercial API 20E.

8.3 Conservación de cepas.

Los cultivos de la cepa tipificada y los aislamientos de *V. cholerae* se mantuvieron en base sangre tubo inclinado con 2.5% de NaCl a temperatura ambiente, mientras que la cepa tipificada de *S. typhi* y los aislamientos se mantuvieron en agar base sangre tubo inclinado a 4°C.

De estos cultivos se seleccionaron las cepas a identificar por cromatografía de gases.

8.4 Identificación de las bacterias mediante sus ésteres metílicos.

La implementación de la técnica se inició con el ensayo y error, para lo cual, se utilizaron cepas tipo de cada especie, además de acondicionar el equipo y probar su funcionamiento inyectando diferentes solventes y el estándar.

Para implementar la técnica se hicieron una serie de pruebas, que después de hacer varios ensayos se fueron complementando.

Inicialmente se tomaron diferentes cantidades de biomasa, se dividió la caja en cuadrantes y se tomó la masa bacteriana del primer cuadrante, sin embargo al momento de hacer la metilación, algunos tubos se llenaron de agua y otros se evaporaron, se optó por sellar los tubos con cinta teflón.

El volumen de muestra que se inyectó inicialmente fue de 1 μL . sin embargo observaron picos poco definidos y muy pequeños, posteriormente se inyectaron 2, 3 y 5 μL de muestra inmediatamente después de haber extraído los ésteres, sin embargo se presentó el problema. Al observar esto, y revisar diferentes técnicas en la bibliografía, se optó por analizar la muestra con nitrógeno gas a diferentes volúmenes, 50, 25 y 10 μL . Observé que un volumen de 10 μL se presentó mejor definición en los picos al inyectar 1 μL de muestra sin embargo cuando inyecté 2 y 3 μL , los cromatogramas emitidos tuvieron mejor calidad.

Finalmente estas variables se homogeneizaron y obtuve un procedimiento definido para construir los perfiles cromatográficos con las cepas tipo.

La construcción de los perfiles lipídicos para cada especie se hizo totalmente con un tipo de cada una de las especies al tiempo en que se realizaban los aislamientos del agua residual, los cuales fueron identificados por el sistema comercial API 20 E y conservados como se mencionó en la metodología.

Para definir el perfil de cada especie fue necesario identificar individualmente los picos que componen el cromatograma y que corresponden a un éster metílico. La designación de cada ácido graso, se hizo comparando el tiempo de retención de cada pico, con el presentado en el estándar comercial de ésteres metílicos de ácidos grasos para enterobacterias SUPELCO (Bacterial Acid Methyl Esters) Cat. 4-7080 Lote No. LA-697131 (tabla 3, fig. 8), el cual se analizó diariamente bajo las mismas condiciones de operación del equipo.

Dicho estándar se complementó con 5 ésteres metílicos para identificar *V. cholerae* los cuales se identificaron fundamentalmente con el apoyo bibliográfico, tomando en cuenta los perfiles publicados para esta bacteria por Lambert, 1983 y Urdaci, 1990.

Es necesario aclarar que esta decisión se tomó por la recurrencia de estos picos en los perfiles obtenidos y que además coincidían con los reportados en la bibliografía.

En lo subsiguiente me referiré de igual manera cuando hable de ésteres metílicos y ácidos grasos, sin embargo recordemos que los metil ésteres son una modificación de los ácidos grasos celulares, ya que los ácidos grasos no se pueden analizar cromatográficamente como tales y fueron extraídos por medio de una esterificación con alcohol metílico obteniéndose entonces un éster metílico.

Así la terminación *ato* corresponde a los ésteres metílicos, mientras que la terminación *oico* corresponde a los ácidos grasos.

Tabla. 3 Bacterial Acid Methyl Esters CP™ Mix. Catalog No. 1114
 Esta mezcla contiene un total de 10mg/ml del metil esterres en
 methyl caproato

<i>Salmonella typhi</i>		<i>Vibrio cholerae</i>	
Nombre	Nomenclatura	Nombre	Nomenclatura
Me. undecanoato	11:0	Me. undecanoato	11:0
Me. 2-hydroxydecanoato	2-OH 10:0	Me. 2-hydroxydecanoato	2-OH 10:0
Me. dodecanoato	12:0	Me. dodecanoato	12:0
		Me. iso decenoato	i 13:1 *
Me. tridecanoato	13:0	Me. tridecanoato	13:0
Me. 2-hydroxydodecanoato	2-OH 12:0	Me. 2-hydroxydodecanoato	2-OH 12:0
Me. 3-hydroxydodecanoato	3-OH 12:0	Me. 3-hydroxydodecanoato	3-OH 12:0
		Me. iso tetradecanoato	i 14:0 *
		Me. tetradecenoato	14 :1 *
Me. tetradecanoato	14:0	Me. tetradecanoato	14:0
Me. 13-methyltetradecanoato	i-15:0	Me. 13-methyltetradecanoato	i-15:0
Me. 12-methyltetradecanoato	a-15:0	Me. 12-methyltetradecanoato	a-15:0
Me. pentadecanoato	15:0	Me. pentadecanoato	15:0
Me. 2-hydroxytetradecanoato	2-OH 14:0	Me. 2-hydroxytetradecanoato	2-OH 14:0
Me. 3-hydroxytetradecanoato	3-OH 14:0	Me. 3-hydroxytetradecanoato	3-OH 14:0
Me. 14-methylpentadecanoato	i-16:0	Me. 14-methylpentadecanoato	i-16:0
Me. cis-9-hexadecenoato	16:1 ⁹	Me. cis-9-hexadecenoato	16:1 ⁹
		Me. heptadecenoato	16:1 ¹¹ *
Me. hexadecanoato	16:0	Me. hexadecanoato	16:0
		Me. heptadecenoato	17:1 *
Me. 15-methylhexadecanoato	i-17:0	Me. 15-methylhexadecanoato	i-17:0
Me. cis-9,10 methylenhexadecanoato	17:0 ^{9,10}	Me. cis-9,10-methylenhexadecanoato	17:0 ^{9,10}
Me. heptadecanoato	17:0	Me. heptadecanoato	17:0
Me. 2-hydroxyhexadecanoato	2-OH 16:0	Me. 2-hydroxyhexadecanoato	2-OH 16:0
Me. cis- 9,12 octadecadienoato	18:2 ^{9,12}	Me. cis- 9,12 octadecadienoato	18:2 ^{9,12}
Me. cis- 9 octadecenoato	18:1 ⁹	Me. cis- 9 octadecenoato	18:1 ⁹
Me. trans- 9 octadecenoato & cis-11 octadecenoato	18:1 ⁹ 18:1 ¹¹	Me. trans- 9 octadecenoato & cis-11 octadecenoato	18:1 ⁹ 18:1 ¹¹
Me. octadecanoato	18:0	Me. cis-12 octadecenoato	18:1 ¹² **
Me. octadecanoato	18:0	Me. octadecanoato	18:0
Me. cis-9,10 methylenoctadecanoato	19:0 ^{9,10}	Me. cis-9,10 methylenoctadecanoato	19:0 ^{9,10}
Me. nonadecanoato	19:0	Me. nonadecanoato	19:0
Me. eicosanoato	20:0	Me. eicosanoato	20:0

Me. metil éster

número a la izquierda de los dos puntos indica el número de átomos de carbono en la cadena

0, 1 y 2 a la derecha de los dos puntos indica el número de dobles ligaduras en la cadena

^{9, 10, 11 y 12} superíndice indica la posición de la doble ligadura

i a la izquierda del número da carbonos indica una cadena ramificada con el grupo metil en posición iso

* se anexaron a la identificación de manera bibliográfica

** se anexó físicamente a la mezcla (SIGMA 09881)

No.	Nombre	Nomenclatura
1.	Me. undecanoato	11:0
2.	Me. 2-hydroxydecanoato	2-OH 10:0
3.	Me. dodecanoato	12:0
4.	Me. tridecanoato	13:0
5.	Me. 2-hydroxydodecanoato	2-OH 12:0
6.	Me. 3-hydroxydodecanoato	3-OH 12:0
7.	Me. tetradecanoato	14:0
8.	Me. 13-methyltetradecanoato	i-15:0
9.	Me. 12-methyltetradecanoato	a-15:0
10.	Me. pentadecanoato	15:0
11.	Me. 2-hydroxypentadecanoato	2-OH 14:0
12.	Me. 3-hydroxypentadecanoato	3-OH 14:0
13.	Me. 14-methylpentadecanoato	i-16:0
14.	Me. cis-9-hexadecanoato	16:1 ^P
15.	Me. hexadecanoato	16:0
16.	Me. 15-methylhexadecanoato	i-17:0
17.	Me. cis-9,10 methylenhexadecanoato	17:0 ^{9,10}
18.	Me. heptadecanoato	17:0
19.	Me. 2-hydroxyheptadecanoato	2-OH 16:0
20.	Me. cis-9,12 octadecadienoato	18:2 ^{9,12}
21.	Me. cis-9 octadecanoato	18:1 ^P
22.	Me. trans-9 octadecanoato & cis-11 octadecanoato	18:1 ^P 18:1 ¹¹
23.	Me. octadecanoato	18:0
24.	Me. cis-9,10 methylenoctadecanoato	19:0 ^{9,10}
25.	Me. nonadecanoato	19:0
26.	Me. eicosanoato	20:0

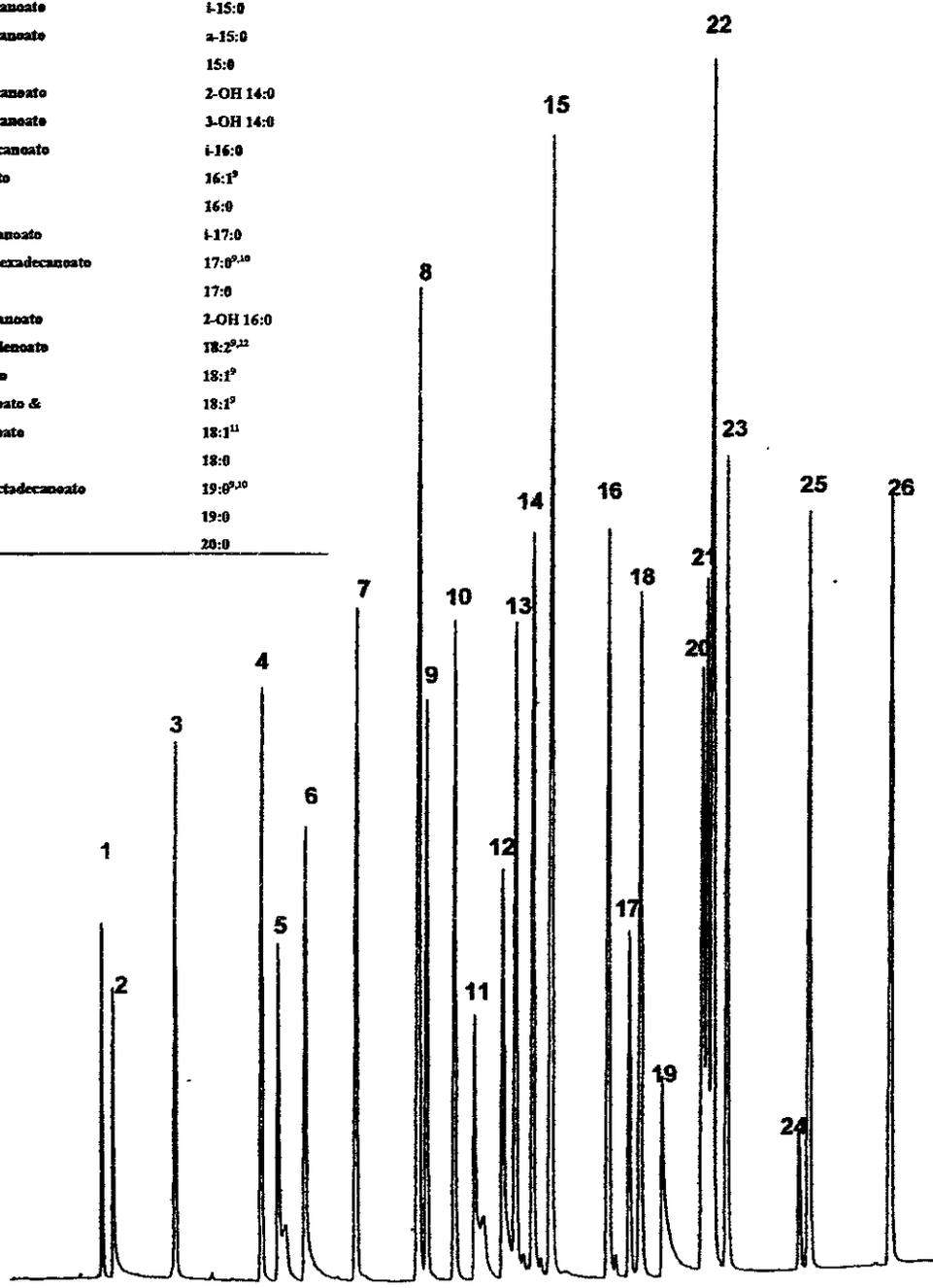


Fig 8. Cromatograma de los metil ésteres de ácidos grasos, para identificar enterobacterias: **Bacterial Acid Methyl Esters CP™ Mix**. Catalog No. 1114. Esta mezcla contiene un total de 10mg/ml del metil ésteres en methyl caproato analizados en una columna capilar de metil fenil silicona.

El perfil cromatográfico de *V. cholerae* ATCC 14035 se compone de 15 ésteres metílicos perfectamente definidos, que se presenta en el cromatograma de la fig. 9; de acuerdo al orden de elución, dichos componentes se listan en la tabla 6.

La comparación de los cromatogramas obtenidos, con el estándar comercial, para conocer la identidad de 10 ésteres metílicos que forman parte del perfil de *V. cholerae* ATCC 14035, sin embargo, al apreciar la constancia de otros cinco picos, recurrí a la bibliografía y comprobé que los reportes hechos por Urdaci en 1990 y Lambert en 1983 coincidían con los que obtuve y de esta manera se identificaron los cinco ácidos grasos que componen el perfil (13:0, i-14:0, 14:1, 16:1¹¹, 17:1).

Es importante mencionar, que no se pudo identificar estos ácidos grasos con el estándar comercial Supelco 4-7080 Lote LA69713, debido a que se refiere que dicho estándar es comercial para identificar únicamente miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, y no existe un estándar comercial para la familia *Vibrionaceae* a la cual pertenece esta especie.

Tabla. 6 Constitución de los ésteres metílicos de *Vibrio cholerae* ATCC 14035.

Fórmula	Ester metílico	Acido graso correspondiente
C i 13:1	Me. iso tridecanoato	iso tridecanoico
C 3-OH 12:0	Me. 3-hydroxydodecanoato	3-hydroxydodecanoico
C i 14:0	Me. iso tetradecanoato	iso tetradecanoico
C 14 :1	Me. tetradecanoato	Tetradecanoico
C 14:0	Me. tetradecanoato	Tetradecanoico
C 15:0	Me. pentadecanoato	Pentadecanoico
C 3-OH 14:0	Me. 3-hydroxytetradecanoato	3-hydroxytetradecanoico
C i-16:0	Me. 14-methylpentadecanoato	14-methylpentadecanoico
C 16:1 ⁹	Me. cis-9-hexadecenoato	cis-9-hexadecenoico
C 16:1 ¹¹	Me. cis-11-hexadecenoato	cis-11-hexadecenoico
C 16:0	Me. hexadecanoato	Hexadecanoico
C 17:1	Me. heptadecenoato	Heptadecenoico
C 17:0	Me. heptadecanoato	Heptadecanoico
C 18:1	Me. trans-12 octadecenoato & cis-11 octadecenoato	trans- 9,12 octadecenoico & cis-11 octadecenoico
C 18:0	Me. octadecanoato	Octadecanoico

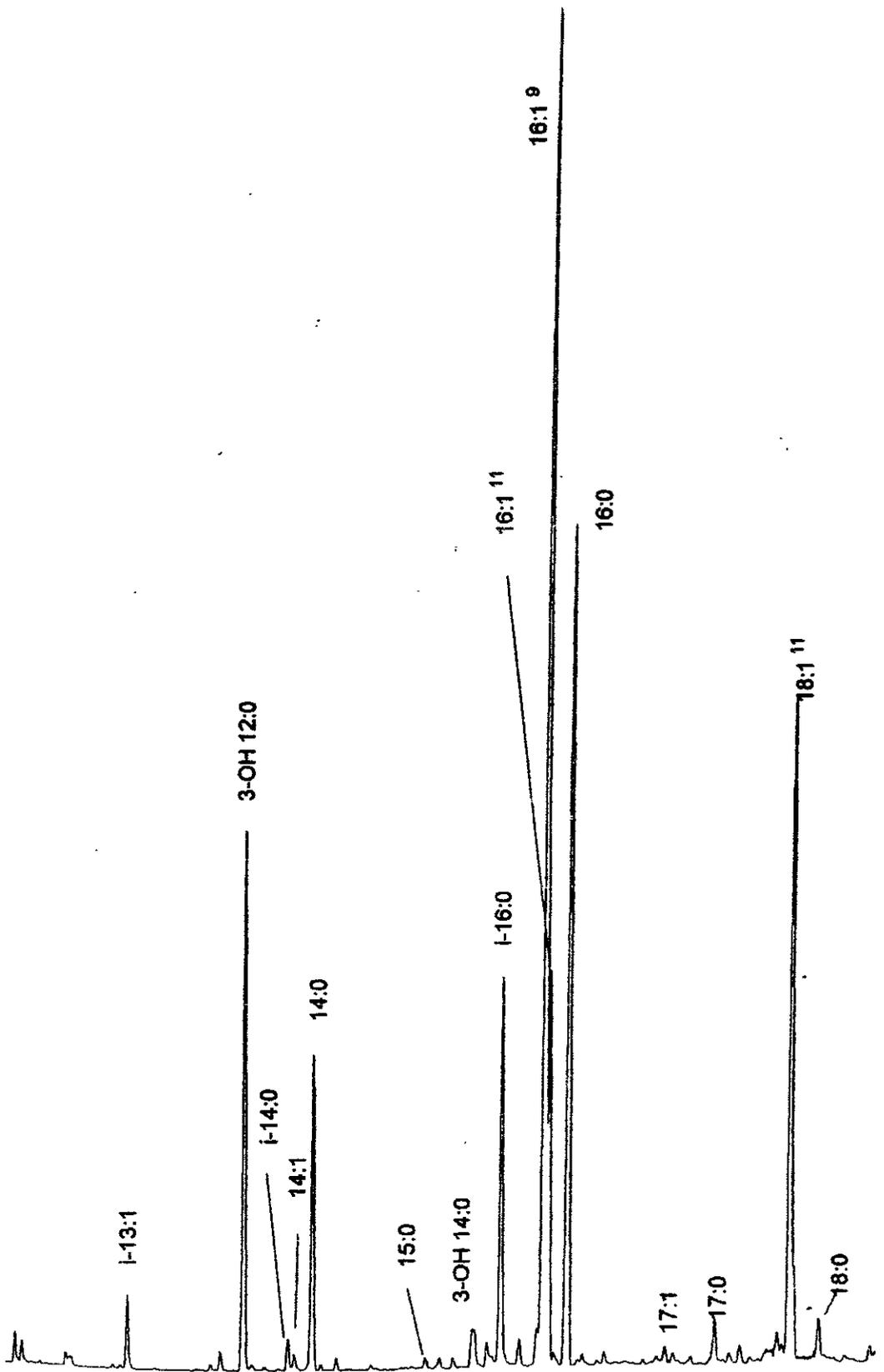


Fig 9. Cromatograma representativo de los metil ésteres de los ácidos grasos celulares de *Vibrio cholerae* ATCC 14035, separados en una columna capilar de metil fenil silicona.

Después de haber definido el perfil, se identificaron 5 cepas de *Vibrio cholerae* que fueron aisladas del agua residual e identificadas previamente por el sistema comercial API.

El perfil lipídico de estos aislamientos corresponde al obtenido para la cepa tipo e se observaron exactamente los mismos 15 metil ésteres (fig. 10), lo cual permite identificar estos aislamientos como *V. cholerae* y se corrobora el resultado con la técnica comercial de referencia utilizada.

Para cerciorarme de la eficiencia de la técnica, seleccioné directamente de agar soya TCBS colonias típicas de *V. cholerae*, las cuales sembré en agar de soya tripticasa para los ésteres metílicos. Las dos cepas mostraron exactamente el mismo perfil que la cepa tipo e las cepas aisladas previamente identificadas por API 20 E.

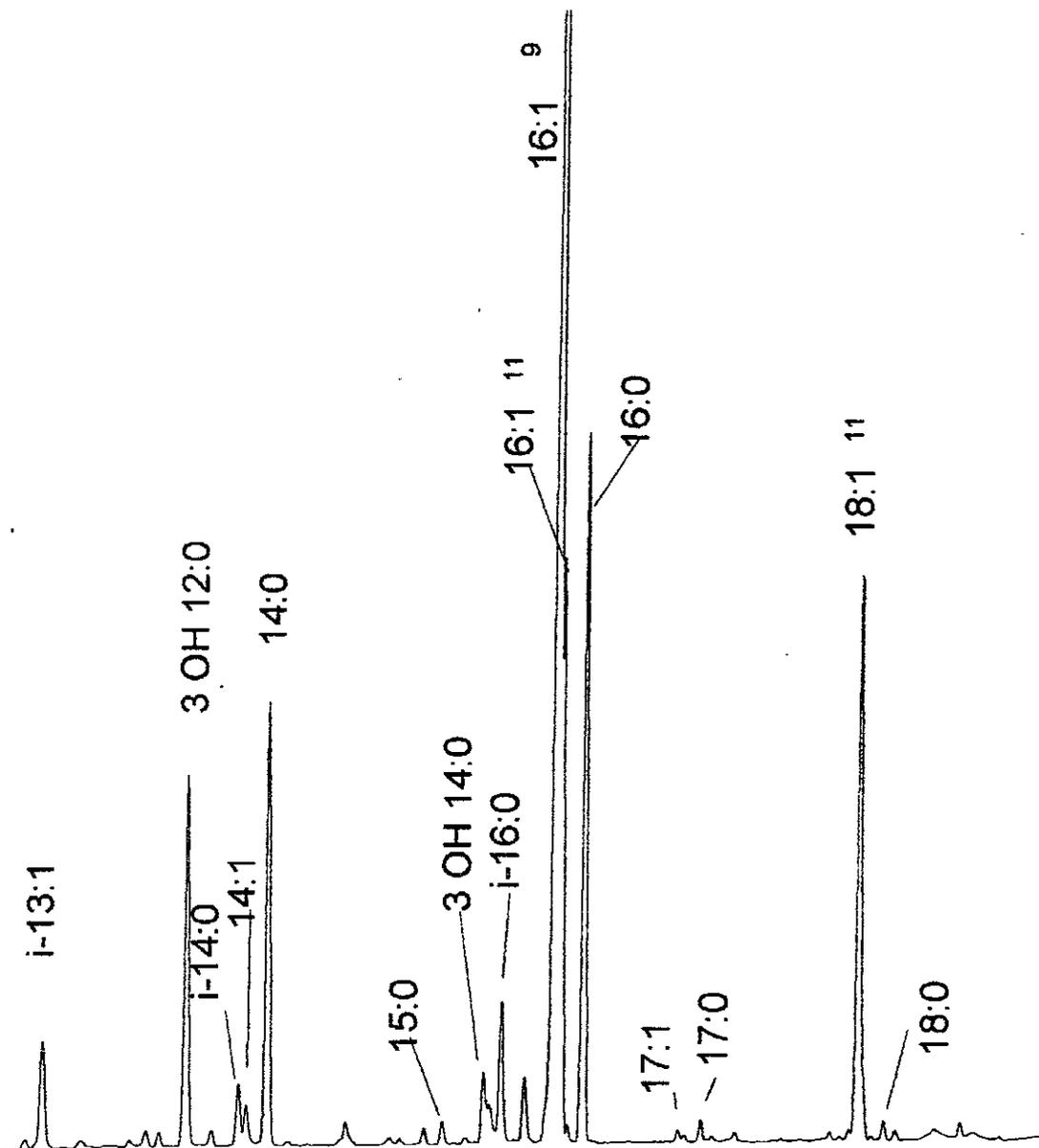


Fig 10. Cromatograma representativo de los metil ésteres de los ácidos grasos celulares de *Vibrio cholerae* aislado del gran canal de la Ciudad de México separados en una columna capilar de metil fenil silicico

Las dos cepas identificadas directamente por cromatografía no se incluyen en la por que sólo se tiene un dato para cada ácido graso.

Los tiempos de retención promedio (y su desviación estándar) de la cepa tipo 14035 y de los aislamientos en agua residual, se muestran en la tabla 7.

Tabla. 7. Promedio y desviación estándar de los tiempos de retención de los esteres metilicos de los acidos grasos celulares de *Vibrio cholerae* ATCC 14035 y *Vibrio cholerae* aislado del gran canal de la Cd. de México

Cepa tipo	<i>Vibrio cholerae</i>							
	STD	14035	STD	0015	0016	0017	0018	0021
	aislamientos							
X (d. e)	X (d. e)	X (d. e)	X (d. e)	X (d. e)	X (d. e)	X (d. e)	X (d. e)	X (d. e)
i-13:1	----	6.90 (0.03)	----	6.88 (0.03)	6.91 (0.02)	6.92 (0.02)	6.91 (0.03)	6.21 (0.03)
3-OH 12:0	8.76 (0.008)	8.74 (0.09)	8.74 (0.02)	8.73 (0.05)	8.71 (0.17)	8.77 (0.03)	8.75 (0.03)	8.75 (0.03)
i-14:0	----	9.45 (0.42)	----	9.40 (0.12)	9.48 (0.02)	9.52 (0.12)	9.47 (0.02)	9.47 (0.01)
14:1	----	9.57 (0.04)	----	9.54 (0.03)	9.58 (0.02)	9.60 (0.01)	9.58 (0.02)	9.59 (0.007)
14:0	9.87 (0.018)	9.85 (0.02)	9.85 (0.03)	9.83 (0.03)	9.86 (0.01)	9.87 (0.02)	9.85 (0.03)	9.84 (0.02)
15:0	11.95 (0.119)	11.85 (0.13)	11.84 (0.08)	11.79 (0.12)	11.84 (0.11)	11.83 (0.11)	11.90 (0.02)	11.87 (0.007)
3-OH 14:0	12.59 (0.113)	12.33 (0.09)	12.61 (0.11)	12.56 (0.10)	12.61 (0.10)	12.64 (0.08)	12.66 (0.02)	12.61 (0.09)
i-16:0	13.01 (0.153)	12.93 (0.18)	12.92 (0.17)	12.89 (0.15)	12.94 (0.18)	12.82 (0.08)	12.98 (0.23)	13.02 (0.18)
16:1 ⁹	13.58 (0.025)	13.56 (0.06)	13.50 (0.16)	13.53 (0.12)	13.59 (0.02)	13.58 (0.02)	13.56 (0.03)	13.55 (0.05)
16:1 ¹¹	----	13.65 (0.05)	----	13.64 (0.03)	13.65 (0.01)	13.65 (0.01)	13.66 (0.10)	13.64 (0.04)
16:0	13.91 (0.080)	13.91 (0.06)	13.68 (0.19)	13.92 (0.05)	13.82 (0.11)	13.94 (0.01)	13.93 (0.03)	13.92 (0.02)
17:0	15.39 (0.116)	15.40 (0.10)	15.28 (0.12)	15.39 (0.07)	15.40 (0.12)	15.39 (0.12)	15.40 (0.14)	15.44 (0.007)
17:1	----	16.58 (0.29)	----	15.88 (0.31)	15.90 (0.28)	15.87 (0.53)	16.12 (0.17)	16.22 (0.01)
18:1	17.43 (0.040)	17.41 (0.06)	17.38 (0.11)	17.38 (0.10)	17.39 (0.09)	17.44 (0.01)	17.42 (0.002)	17.41 (0.02)
18:0	17.90 (0.033)	17.90 (0.03)	17.90 (0.30)	17.89 (0.03)	17.92 (0.03)	17.94 (0.01)	17.87 (0.05)	17.90 (0.007)

ATCC (American Type Culture Collection).

STD (Estándar)

G. C. (Gran Canal)

X (promedio)

d. e. (desviación estándar)

---- Picos identificados bibliografía

En general se observa que los tiempos de retención se mantuvieron estables tanto estándar como en los aislamientos, esto permitió la identificación de los picos sin dificultades. Las desviaciones estándar obtenidas en el análisis cualitativo, son en general bajas con valores de 0.007 a 0.1; lo que demuestra que la identificación cualitativa de los ácidos grasos con base en sus tiempos de retención es una característica estable y reproducible (tabla 7).

En la tabla 8 se muestran los intervalos de confianza del 95% de μ , en donde observamos que los tiempos de retención permanecen homogéneos. Los datos obtenidos permanecen dentro de los intervalos de confianza calculados.

Tabla. 8. Intervalos de confianza del 95% para los tiempos de retención de los esteres metilicos de los acidos grasos celulares de *Vibrio cholerae* ATCC 14035 y *Vibrio cholerae* aislado del gran canal de la Cd. de México

<i>Vibrio cholerae</i>								
	STD	14035	STD	0015	0016	0017	0018	
	Cepa tipo		Aislamientos					
i-13:1	-----	6.84 - 6.95	-----	6.82 - 6.93	6.87 - 6.94	6.88 - 6.95	6.85 - 6.96	6.86
3-OH 12:0	8.74 - 8.77	8.56 - 8.91	8.69 - 8.78	8.67 - 8.78	8.67 - 9.04	8.71 - 8.82	8.69 - 8.80	8.66
i-14:0	-----	8.62 - 10.27	-----	9.16 - 9.63	9.44 - 9.51	9.28 - 9.75	9.43 - 9.50	9.44
14:1	-----	9.49 - 9.64	-----	9.48 - 9.59	9.54 - 9.61	9.58 - 9.61	9.54 - 9.61	9.55
14:0	9.82 - 9.90	9.81 - 9.88	9.78 - 9.91	9.77 - 9.88	9.84 - 9.87	9.83 - 9.90	9.79 - 9.90	9.80
15:0	11.71 - 12.18	11.59 - 12.10	11.67 - 12.00	11.55 - 12.02	11.62 - 12.05	11.61 - 12.04	11.86 - 11.93	11.77
3-OH 14:0	12.36 - 12.81	12.15 - 12.50	12.38 - 12.83	12.36 - 12.75	12.41 - 12.80	12.48 - 12.79	12.62 - 12.69	12.44
i-16:0	12.71 - 13.30	12.57 - 13.28	12.57 - 13.26	12.59 - 12.85	12.58 - 13.29	12.66 - 12.97	12.52 - 13.03	12.66
16:1 ⁹	15.53 - 13.62	13.44 - 13.67	13.17 - 13.82	13.29 - 13.76	13.55 - 13.62	13.56 - 13.59	13.50 - 13.61	13.44
16:1 ¹¹	-----	13.55 - 13.74	-----	13.58 - 13.69	13.63 - 13.66	13.63 - 13.66	13.46 - 13.85	13.55
16:0	13.75 - 14.06	13.79 - 14.02	13.29 - 14.06	13.86 - 13.97	13.60 - 14.03	13.92 - 13.95	13.87 - 13.98	13.86
17:0	15.16 - 15.61	15.20 - 15.59	15.03 - 15.52	15.25 - 15.62	15.16 - 15.63	15.15 - 15.62	15.12 - 15.67	15.44
17:1	-----	16.01 - 17.14	-----	15.27 - 16.48	15.35 - 16.44	14.83 - 16.90	15.78 - 16.45	16.22
18:1	17.35 - 17.42	17.29 - 17.51	17.14 - 17.61	17.18 - 17.57	17.21 - 17.56	17.42 - 17.45	17.38 - 17.45	17.33
18:0	17.83 - 17.96	17.84 - 17.95	17.84 - 17.95	17.83 - 17.94	17.86 - 17.97	17.92 - 17.95	17.74 - 17.93	17.80

14035 = Cepa tipo

0015, 0016, 0017, 0018, 0021 = Aislamientos de agua residual

X (promedio)

d. e. (desviación estándar)

----- Picos identificados bibliografía

Se sabe que el área producida por cada pico es proporcional a la concentración de cada componente, donde el área va a ser específica para cada componente; y su valor dependerá de las propiedades físicas, químicas y del principio de detección. Esto puede usarse para determinar la concentración exacta de cada uno de los componentes. La exactitud obtenida por cromatografía de gases va a depender de la técnica usada de inyección, detector, método de integración y de la concentración de la muestra. En todas cepas, tanto cepa tipo como aislamientos se observó un comportamiento muy similar respecto a la abundancia del total de ácidos grasos encontrados (tabla 9).

Tabla. 9. Concentración en porcentaje (%) equivalente a las áreas bajo la curva de los esteres metílicos de los ácidos grasos celulares de *Vibrio cholerae* ATCC 14035 y *Vibrio cholerae* aislado del gran canal de la Cd. de México

	<i>Vibrio cholerae</i>						
	STD	14035	0015	0016	0017	0018	0021
Cepa tipo							
i-13:1	----	2.60 (1.09)	1.94 (0.64)	2.30 (0.46)	2.65 (1.30)	0.16 (0.11)	3.23 (1.32)
3-OH 12:0	7.53 (7.04)	5.31 (4.22)	4.22 (2.03)	3.16 (1.33)	5.67 (2.65)	11.59 (1.96)	7.71 (5.25)
i-14:0	----	0.64 (0.44)	0.84 (0.44)	0.66 (0.12)	1.07 (0.33)	0.25 (0.41)	0.47 (0.30)
14:1	----	0.32 (0.46)	0.52 (0.19)	0.35 (0.05)	0.91 (0.77)	0.15 (0.00)	0.10 (0.00)
14:0	8.77 (2.47)	7.82 (1.58)	8.01 (2.07)	6.99 (0.86)	9.97 (1.52)	9.14 (1.69)	7.79 (1.16)
15:0	0.67 (0.41)	0.19 (0.29)	0.44 (0.24)	0.41 (0.27)	0.13 (0.04)	0.37 (0.05)	0.13 (0.75)
3-OH 14:0	3.47 (4.08)	1.25 (1.26)	1.41 (0.58)	1.39 (0.51)	1.53 (0.66)	0.06 (0.00)	0.88 (0.58)
i-16:0	2.90 (3.57)	2.73 (1.89)	2.11 (0.87)	3.08 (0.89)	2.11 (1.12)	8.34 (0.99)	3.53 (1.81)
16:1⁹	37.40 (7.54)	40.01 (3.83)	39.32 (2.92)	37.68 (3.49)	40.19 (1.99)	32.74 (4.15)	38.80 (2.81)
16:1¹¹	----	6.78 (1.42)	7.78 (0.95)	5.60 (1.32)	7.42 (1.73)	4.50 (0.35)	6.71 (1.34)
16:0	14.95 (4.44)	14.64 (2.48)	14.30 (2.45)	16.35 (2.79)	14.70 (2.78)	22.73 (1.04)	14.27 (1.96)
17:0	1.94 (2.44)	0.63 (1.17)	1.15 (1.25)	1.27 (1.97)	0.04 (0.00)	0.15 (0.05)	0.24 (1.41)
17:1	----	0.24 (0.21)	0.39 (0.14)	0.41 (0.08)	0.21 (0.00)	0.34 (0.00)	0.05 (0.00)
18:1	13.18 (4.48)	14.95 (2.97)	13.88 (2.82)	16.92 (2.35)	11.87 (2.90)	7.61 (0.56)	14.84 (1.48)
18:0	0.55 (0.81)	0.42 (0.74)	0.70 (0.63)	0.67 (1.04)	0.22 (0.53)	0.53 (0.11)	0.34 (1.52)

14035 = Cepa tipo

0015, 0016, 0017, 0018, 0021 = Aislamientos de agua residual

Los porcentajes de las áreas calculados se muestran homogéneos, la desviación es mayor con respecto a los tiempos de retención, sin embargo las fluctuaciones se deben a la naturaleza propia de los ácidos grasos.

De las 55 determinaciones realizadas para la cepa tipo se construyó un perfil representativo, sin embargo, para homogeneizar pequeñas fluctuaciones en la concentración (tabla 9), se construyó un perfil cromatográfico representativo para *V. cholerae* utilizando los promedios de los tiempos de retención y de las áreas.

En la fig. 11; las barras representan el valor promedio dado en porcentaje del área de cada ácido graso cuantificado para la cepa tipo 14035.

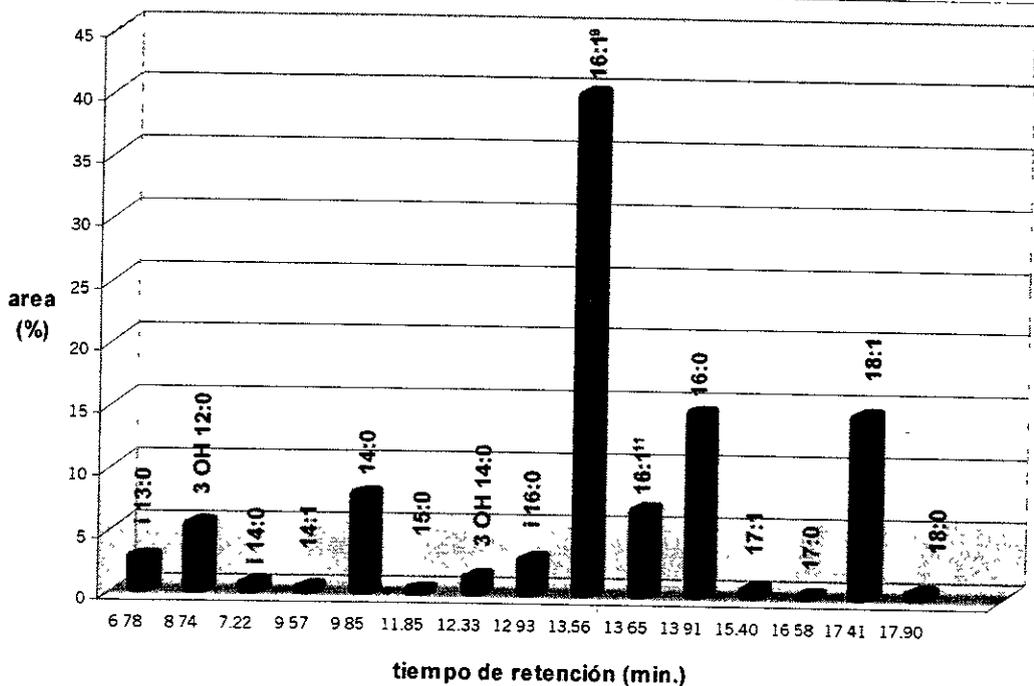


Fig 11. Perfil cromatográfico obtenido de los promedios tanto en tiempo como en área de los 55 cromatograma de los metil ésteres de los ácidos grasos celulares de *Vibrio cholerae* ATCC 14035.

Los ácidos grasos celulares (AGC) con mayor proporción fueron, hexadecenoico y hexadecanoico (16:0) y octadecenoico (18:1), estos AGC son representativos de las bacterias gram negativas.

En la evaluación, se observó que el ácido graso más abundante para *V. cholerae* ATCC 14035, es el correspondiente al cis 9 hexadecenoico, el cual mantiene su abundancia en las corridas cromatográficas sin variación considerable; esto es característico de la familia *Vibrionaceae* según Urdaci 1990.

Por otra parte observamos que hay 3 AGC con una abundancia moderada: tetradecanoico (14:0), el cis 11 hexadecenoico (16:1¹¹) y el 3 hydroxydodecanoico (12:0). La proporción se encuentra en los intervalos de 8 y 5% aproximadamente. Mientras que los restantes 9 ácidos grasos identificados se presentan con un porcentaje en abundancia muy bajo con un promedio de 3%.

Las desviaciones estándar calculadas para la concentración de todos los ácidos grasos celulares de *Vibrio cholerae* indican excelente estabilidad del análisis, ya que la desviación más alta

calculó en 5.23 y corresponde al 3-OH12:0 cuyos motivos de variación se explican en la discusión.

El perfil cromatográfico definido para *S. typhi*, se determinó por el análisis de cromatogramas representativos obtenidos a partir de la cepa tipificada para esta especie 0779. (fig. 12).

Con el uso de una columna capilar constituida por metil fenil silicona como estacionaria, se logró la separación de los ésteres metílicos de *S. typhi*.

La composición del perfil se determinó por el procedimiento de diferencia cromatográfica con el estándar comercial antes mencionado que nos permitió identificar 11 (tabla 11).

Tabla. 11. Constitución de los ésteres metílicos de *Salmonella typhi* ATCC 0779.

Fórmula	Ester metílico	Acido graso correspondiente
C 11:0	Me. undecanoato.	undecanoico.
C 12:0	Me. dodecanoato	dodecanoico
C 14:0	Me. tetradecanoato	tetradecanoico
C i 15:0	Me 13 metiltetradecanoato	13 metiltetradecanoico
C 15:0	Me. pentadecanoato	pentadecanoico
C 2-OH 14:0	Me. 2-hidroxitetradecanoato	2-hidroxitetradecanoico
C 3-OH 14:0	Me. 3-hidroxitetradecanoato	3-hidroxitetradecanoico
C 16:1 ⁹	Me. cis-9-hexadecenoato	cis-9-hexadecenoico
C 16:0	Me. hexadecanoato	hexadecanoico
C 17:0	Me. cis-9,10-metilenhexadecenoato	cis-9,10-metilenhexadecenoico
C 18:1 ⁹	Me. cis-9-octadecenoato	cis-9-octadecenoico

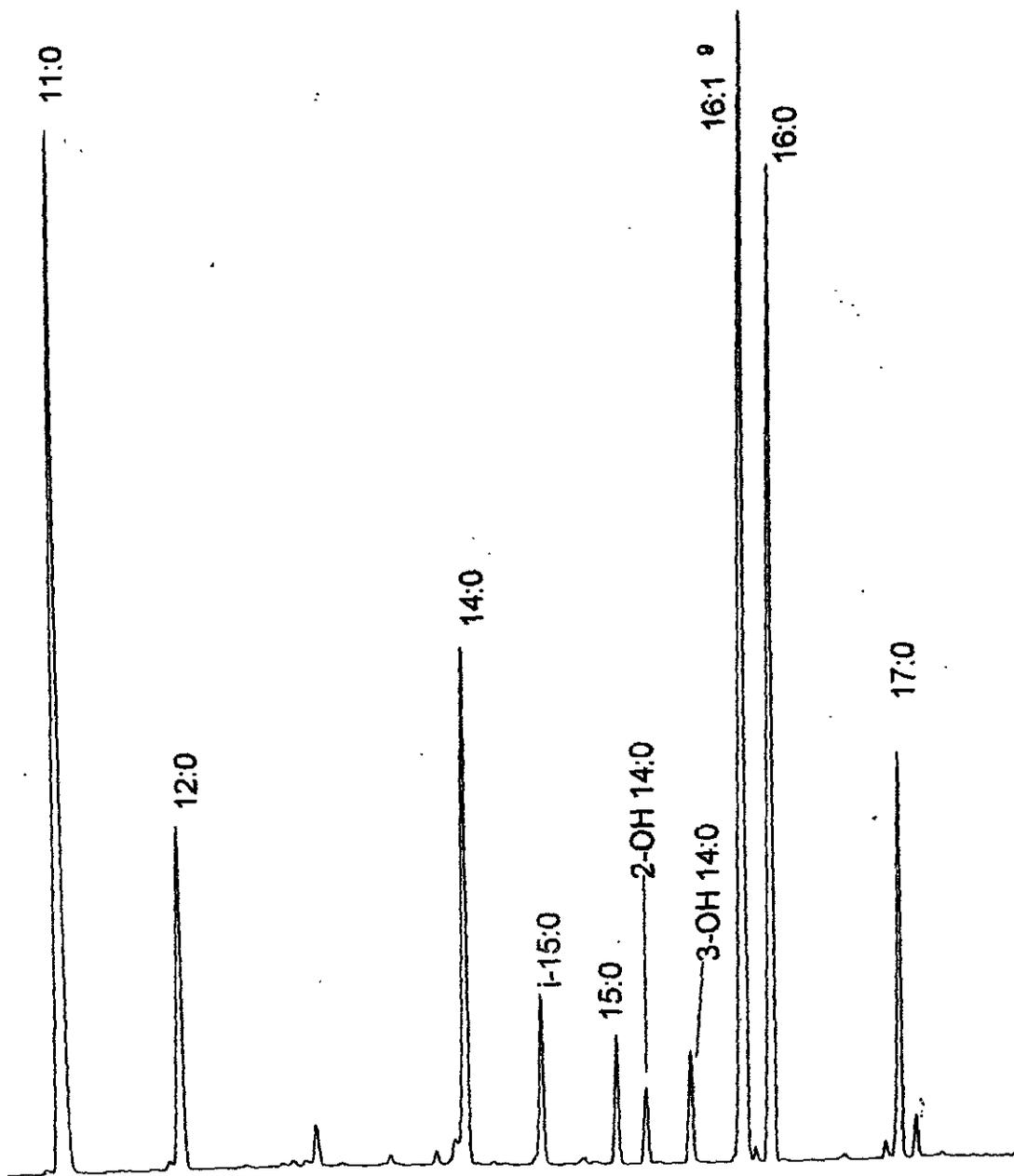


Fig 12. Cromatograma representativo de los metil ester de los acidos grasos celulares de *Salmonella typhi* ATCC 0779 separados en una columna capilar de metil fenil silicona.

Una vez definido el perfil cromatográfico para *Salmonella typhi* ATCC 0779, se identificaron 9 cepas aisladas de agua residual e identificadas como *Salmonella* spp por el comercial miniaturizado API 20E.

El perfil lipídico de *S. typhi* ATCC 0779, fue exactamente el mismo que el observado en las cepas aisladas del ambiente, compuesto por 11 ésteres metílicos. Esto permite incluir estas bacterias dentro de esta especie.

En los medios diferenciales, las colonias presuntivas de *S. typhi* mostraron una morfología típica para esta especie y sin embargo al identificar estos cultivos con el API 20E las cepas se identificaron como *Salmonella* spp, ya que no se observó la producción de H₂S, sin embargo al identificarlas por cromatografía, se observó exactamente el mismo perfil que en la cepa tipo.

Al observar esta característica, seleccioné directamente dos colonias típicas de *Salmonella typhi*, en agar selectivo sulfito bismuto y las transferí a placas de agar soya tripticasa para analizar los ésteres metílicos. Obtuve perfiles iguales a la cepa tipo con algunas diferencias en la abundancia pero los mismos picos. Este resultado me permitió identificar estas colonias como *Salmonella typhi*.

El promedio de los tiempos de retención (y su desviación estándar) de la cepa tipo 0779 y de los aislamientos en agua residual, se muestran en las tablas 12a y 12 b.

Tabla 12a. Promedio y desviación estándar de los tiempos de retención de los esteres metilicos de los acidos grasos celulares de *Salmonella typhi* ATCC 0779 y *Salmonella typhi* aislado del gran canal de la Cd. de México.

<i>Salmonella typhi</i>						
	STD	0779	STD	0049	0050	0051
	cepa tipo		Aislamientos			
	X (d. e.)					
11:0	4.50 (0.18)	4.45 (0.10)	4.36 (0.09)	4.36 (0.03)	4.38 (0.02)	4.40 (0.02)
12:0	6.07 (0.14)	6.07 (0.09)	5.99 (0.10)	6.05 (0.33)	6.04 (0.01)	6.02 (0.02)
14:0	9.92 (0.11)	9.91 (0.05)	9.85 (0.11)	9.97 (0.03)	9.90 (0.01)	9.88 (0.02)
i 15:0	10.97 (0.09)	10.94 (0.04)	10.88 (0.11)	10.12 (0.03)	10.91 (0.01)	10.92 (0.01)
15:0	11.92 (0.07)	11.89 (0.18)	11.87 (0.11)	11.90 (0.03)	11.92 (0.01)	11.92 (0.01)
2-OH 14:0	12.26 (0.14)	12.31 (0.08)	12.34 (0.23)	12.29 (0.03)	12.32 (0.01)	12.31 (0.01)
3-OH 14:0	12.94 (0.10)	12.95 (0.04)	12.90 (0.14)	12.85 (0.07)	12.93 (0.02)	12.90 (0.03)
16:1 ^o	12.63 (0.10)	13.61 (0.04)	13.57 (0.09)	13.56 (0.03)	13.62 (0.02)	13.59 (0.04)
16:0	13.99 (0.11)	13.98 (0.04)	13.97 (0.10)	13.94 (0.03)	14.00 (0.02)	13.96 (0.04)
17:0	15.73 (0.06)	15.69 (0.03)	15.64 (0.14)	15.64 (0.03)	15.69 (0.01)	15.67 (0.02)
18:1 ^o	17.47 (0.09)	17.41 (0.04)	17.45 (0.09)	17.43 (0.03)	17.48 (0.02)	17.45 (0.03)

0779 = Cepa tipo

0049, 0050, 0051 = Aislamientos de agua residual

X (promedio)

d. e. (desviación estándar)

El promedio de los tiempos de retención de los estándares es muy parecido al aislamientos, esta característica me permitió identificar a cada uno de los picos, el cálculo de las desviaciones estándar demuestran que los datos son homogéneos ya que como se observan en las tablas 12a y 12b, estas son muy bajas.

Tabla 12b. Promedio y desviación estándar de los tiempos de retención de los esteres metilicos de los acidos grasos celulares de *Salmonella typhi* ATCC 0779 y *Salmonella typhi* aislado del gran canal de la Cd. de México.

<i>Salmonella typhi</i>						
	0052	0053	0054	0057	0058	0059
	X (d. e.)					
11:0	4.29 _(0.12)	4.39 _(0.01)	4.37 _(0.03)	4.38 _(0.08)	4.40 _(0.01)	4.35 _(0.02)
12:0	5.91 _(0.15)	6.04 _(0.01)	6.01 _(0.04)	6.02 _(0.08)	6.04 _(0.01)	6.01 _(0.02)
14:0	9.76 _(0.17)	9.89 _(0.01)	9.86 _(0.03)	9.88 _(0.03)	9.90 _(0.02)	9.88 _(0.02)
i 15:0	10.76 _(0.16)	10.93 _(0.01)	10.90 _(0.03)	10.92 _(0.03)	10.94 _(0.03)	10.93 _(0.02)
15:0	11.77 _(0.16)	11.93 _(0.01)	11.91 _(0.04)	11.93 _(0.02)	11.93 _(0.00)	11.94 _(0.03)
2-OH 14:0	12.15 _(0.16)	12.35 _(0.07)	12.40 _(0.23)	12.31 _(0.02)	12.32 _(0.00)	12.32 _(0.00)
3-OH 14:0	12.79 _(0.16)	12.92 _(0.01)	12.91 _(0.42)	12.91 _(0.02)	12.95 _(0.06)	12.96 _(0.02)
16:1^o	13.53 _(0.17)	13.62 _(0.04)	13.61 _(0.11)	13.59 _(0.03)	13.60 _(0.04)	13.60 _(0.02)
16:0	13.88 _(0.16)	13.99 _(0.04)	13.95 _(0.02)	13.97 _(0.02)	13.98 _(0.03)	13.98 _(0.02)
17:0	15.50 _(0.16)	15.68 _(0.01)	15.65 _(0.02)	15.68 _(0.02)	15.70 _(0.04)	15.70 _(0.02)
18:1^o	17.32 _(0.16)	17.48 _(0.04)	17.44 _(0.02)	17.46 _(0.02)	17.48 _(0.04)	17.49 _(0.02)

0052, 0053, 0054, 0057, 0058, 0059 = Aislamientos de agua residual

X (promedio)

d. e. (desviación estándar)

En las tablas 13a y 13b se presentan los intervalos de confianza del 95%, calculados los tiempos de retención, en donde observamos que todos los datos obtenidos caen dentro del intervalo y por lo tanto existe una alta reproducibilidad.

Tabla 13a. Intervalos de confianza del 95% para los tiempos de retención de los esteres metilicos de los acidos grasos celulares de *Salmonella typhi* ATCC 0779 y *Salmonella typhi* aislada del gran canal de la Cd. de México

<i>Salmonella typhi</i>						
	STD	0779	STD	0049	0050	0051
	Cepa tipo		Aislamientos			
11:0	4.32 - 4.85	4.25 - 4.64	4.15 - 4.56	4.29 - 4.42	4.33 - 4.42	4.35 - 4.44
12:0	5.84 - 6.38	5.86 - 6.27	5.76 - 6.21	5.30 - 6.79	6.01 - 6.06	5.97 - 6.06
14:0	9.67 - 10.16	9.79 - 10.02	9.60 - 10.09	9.90 - 10.03	9.87 - 9.92	9.82 - 9.92
15:0	10.76 - 11.17	10.84 - 11.03	10.63 - 11.12	10.05 - 10.18	10.88 - 10.93	10.89 - 10.9
15:0	11.76 - 12.07	11.48 - 12.29	11.62 - 12.11	11.83 - 11.96	11.89 - 11.94	11.89 - 11.9
2-OH 14:0	11.94 - 12.57	12.12 - 12.49	11.81 - 12.86	12.22 - 12.35	12.29 - 12.34	12.28 - 12.3
3-OH 14:0	12.71 - 13.16	12.85 - 13.04	12.58 - 13.21	12.69 - 13.00	12.88 - 12.97	12.83 - 12.9
16:1 ^p	12.40 - 12.85	13.51 - 13.70	13.36 - 13.77	13.49 - 13.62	13.57 - 13.66	13.49 - 13.6
16:0	13.74 - 14.23	13.88 - 14.07	13.74 - 14.19	13.87 - 14.00	13.95 - 14.04	13.86 - 14.0
17:0	15.59 - 15.86	15.62 - 15.75	15.32 - 15.95	15.57 - 15.70	15.66 - 15.71	15.62 - 15.7
18:1 ^p	17.26 - 17.67	17.31 - 17.50	17.24 - 17.65	17.36 - 17.49	17.43 - 17.52	17.38 - 17.5

0779 = Cepa tipo

0049, 0050, 0051 = Aislamientos de agua residual

Tabla 13b. Intervalos de confianza del 95% para los tiempos de retención de los esteres metilicos de los acidos grasos celulares de *Salmonella typhi* ATCC 0779 y *Salmonella typhi* aislada del gran canal de la Cd. de México

<i>Salmonella typhi</i>						
	0052	0053	0054	0057	0058	0059
11:0	4.01-4.56	4.36-4.41	4.30-4.43	4.19-4.56	4.37-4.42	4.30-4.43
12:0	5.57-7.06	6.01-6.06	5.91-6.10	5.38-6.20	6.01-6.06	5.96-6.06
14:0	9.37-10.14	9.86-9.91	9.79-9.92	9.81-9.94	9.87-9.94	9.83-9.94
15:0	10.39-11.21	10.90-10.95	10.83-10.96	10.85-10.98	10.87-11.00	10.88-11.00
15:0	11.40-12.13	11.90-12.15	11.81-12.00	11.88-11.97	11.91-11.96	11.89-12.00
2-OH 14:0	11.78-12.51	12.19-12.50	11.87-12.92	12.26-12.35	12.30-12.33	12.31-12.33
3-OH 14:0	12.42-13.15	12.89-12.94	11.95-13.86	12.86-12.95	12.81-13.08	12.91-13.08
16:1 ^o	13.14-13.91	13.52-13.71	13.36-13.85	13.52-13.65	13.50-13.69	13.55-13.69
16:0	13.51-14.24	13.89-14.08	13.90-13.99	13.92-14.01	13.91-14.04	13.93-14.04
17:0	15.13-15.86	15.65-15.70	15.60-15.69	15.63-15.72	15.60-15.79	15.65-15.79
18:1 ^o	16.95-17.68	17.38-17.57	17.39-17.48	17.41-17.50	17.38-17.57	17.44-17.57

0052, 0053, 0054, 0057, 0058, 0059 = Aislamientos de agua residual

El análisis cuantitativo se basó en la obtención de los valores medios de las determinaciones para esta cepa tipo.

En la tabla 14 se presentan los valores promedio en porcentaje (%) de las analizadas, en donde podemos observar que *S. typhi* ATCC 0779, y los aislamientos identificados por cromatografía de gases como *S. typhi* mostraron un comportamiento muy similar en cuanto a la concentración.

Tabla. 14. Concentración en porcentaje (%) de los esteres metílicos de los ácidos grasos celulares de *Salmonella typhi* ATCC 0779 y *Salmonella typhi* aislado del gran canal de la Cd. de México

<i>Salmonella typhi</i>									
	0779	0049	0050	0051	0052	0053	0054	0057	0058
11:0	8.67	18.80	25.05	17.48	16.62	18.84	17.03	26.60	16.06
12:0	5.65	3.34	6.93	8.57	10.35	6.60	3.96	9.91	8.30
14:0	8.46	6.37	8.51	8.66	9.14	7.77	7.77	9.47	7.86
i 15:0	1.24	2.36	2.15	1.63	1.60	1.65	1.45	1.74	0.67
15:0	0.28	1.83	1.82	2.64	1.62	1.79	0.23	0.48	0.06
2-OH 14:0	0.28	0.85	1.23	1.99	0.91	0.77	0.42	0.79	0.20
3-OH 14:0	10.68	1.73	1.98	4.45	5.54	1.61	0.79	3.16	18.16
16:1 ^p	18.06	20.02	20.43	17.92	27.34	23.30	23.23	16.78	19.06
16:0	21.35	20.14	14.20	16.47	15.11	17.40	19.54	14.19	13.83
17:0	8.64	4.71	5.06	7.65	4.20	4.37	5.76	6.13	4.15
18:1 ^p	16.49	19.66	12.03	12.38	7.14	15.82	17.68	10.64	11.58

0779 = Cepa tipo

0049, 0050, 0051, 0052, 0053, 0054, 0057, 0058, 0059 = Aislamientos de agua residual

En la figura 13, se representan los valores promedio de los tiempos de retención por éster metílico, las barras representan el valor promedio dado en porcentaje del área bajo la curva que corresponden a cada éster cuantificado para la cepa tipo ATCC 0779 de acuerdo a los resultados obtenidos de 50 determinaciones.

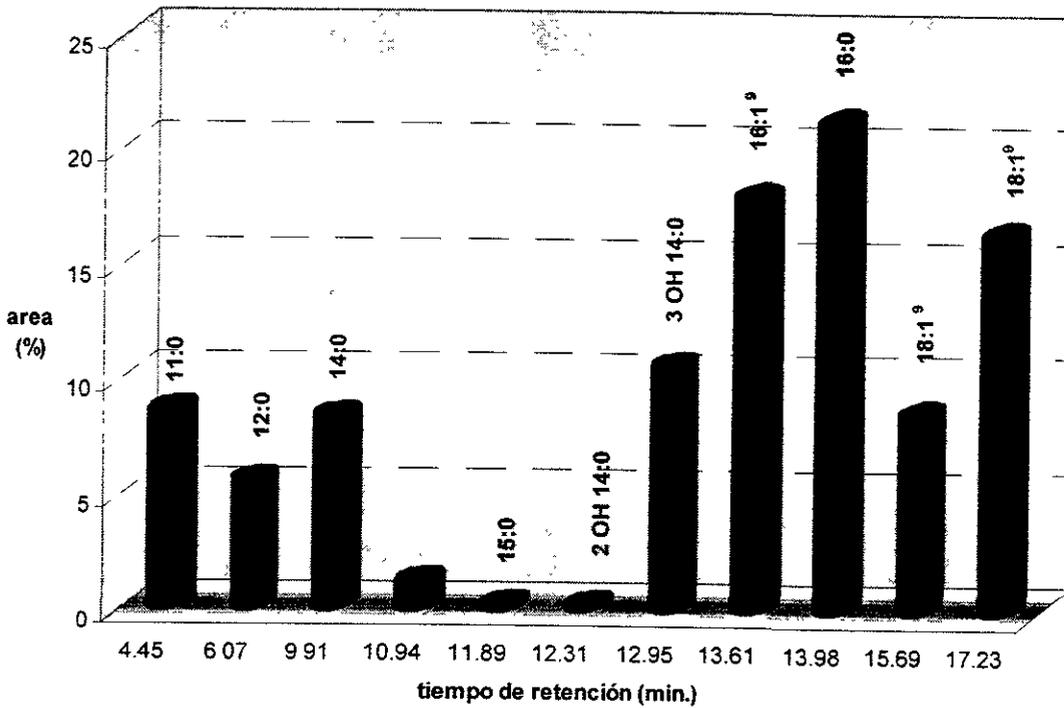


Fig 13. Perfil cromatográfico obtenido de los promedios tanto en tiempo como en área de los 50 cromatogramas de los metil ésteres de los ácidos grasos celulares de *Salmonella typhi* ATCC 0779.

Los AGC que presentaron mayor abundancia fueron los ácidos grasos hexadecenoico (16:0), hexadecenoico (16:1) y octadecenoico (18:1), los cuales son representativos de bacterias gram negativas.

Los ácidos grasos que presentan una proporción media fueron los ácidos 11:0, 12:0, 14:0, 17:0 y un hidroxiaácido el 3 OH 14:0, por otra parte, la proporcionalidad más baja la presentaron los ácidos grasos 15:0 y 2 OH 14:0.

Capítulo 9. DISCUSION.

Se aisló *V. cholerae* O1 en el agua cruda residual monitoreada, esta bacteria es el agente causal de epidemias de cólera en nuestro país, a partir de la introducción del cólera en el país. También se aisló *V. cholerae* No O1, este último ocasiona enfermedades que aunque no presentan problemas de tipo epidémico, si adquieren trascendencia, ya que tiene una propiedad de serotipo además de su enterotoxigenicidad ocasionando algún tipo de cólera (no típico), apendicitis, otitis media, neumonía, meningitis, meningocelalitis, celulitis y septicemia.

V. cholerae No O1 puede producir una enterotoxina lábil al calor idéntica a la producida por *V. cholerae* O1 en estudios experimentales. Sin embargo, en aislamientos ambientales no se ha observado la producción de la toxina o se produce en cantidades bajas. Aunque se mencionan que algunas cepas No O1 son potencialmente patógenas, porque originan una enfermedad similar a la del serovar O1 y algunas otras producen otros tipos de toxinas como las citotoxinas, una similar a ST de *Escherichia coli*.

Con este fundamento se realizó la prueba de la producción de la toxina a todas las cepas aisladas, y se determinó que ninguna cepa aislada produce la toxina colérica.

De acuerdo a lo que reporta Sanyal en la recopilación hecha por Barua, 1992; en sus estudios, la mayoría de los aislamientos clínicos y ambientales no producen la toxina, aunque la diferencia en la enterotoxigenicidad se puede explicar por la posibilidad de que existe un mecanismo de represión y depresión del gene que codifica para la producción de la toxina y se ha encontrado que las cepas no toxigénicas pueden convertirse en toxigénicas después de unos cuantos días consecutivos en el intestino de conejos susceptibles.

Lo cual no descarta la posibilidad de que en algún momento la bacteria pueda producir la toxina colérica en el ambiente y permitir con esto la recurrencia del cólera al ingerir agua no potable. Este serovar se encuentra muy difundido en aguas dulces y salobres según lo reportado por Barua, 1992. No obstante, en los resultados del presente estudio observamos que también en el agua residual se presenta con regularidad, pese las condiciones adversas existentes en el ambiente. Este serovar no causa el verdadero cólera epidémico, aunque puede originar enfermedades gastrointestinales menos graves que las causadas por *V. cholerae* O1.

No obstante, la escasez del agua cada vez es mayor y existe por tanto, la necesidad de practicar el rehuso del agua tratada, sin embargo la deficiencia de sistemas de tratamiento como consecuencia que se lleve a cabo la práctica común de irrigación de hortalizas como las coque negras no tratadas trascendiendo la importante presencia de *V. cholerae* y *S. typhi* en el agua cruda residual analizada, especialmente en términos de salud pública, ya que las enfermedades infecciosas continúan siendo la mayor causa de muerte en el ámbito mundial especialmente en la población infantil de los países en desarrollo.

Aislamos también *S. typhi* responsable de diferentes enfermedades infecciosas, la tifoidea es la más importante.

En los medios diferenciales de Sulfito Bismuto y S-S, las colonias presuntivas de *Salmonella* mostraron una morfología típica para esta especie, no obstante la producción de H₂S en el medio de Kligler no fue observada, esta característica es primordial para seleccionar una cepa presuntiva, sin embargo al presentarse esta situación de manera controlada se optó por identificar estas cepas con el API 20E. El resultado arrojado por el análisis de identificación de estas cepas como *Salmonella* spp.

Con el análisis de los resultados obtenidos, las cepas ambientales, probablemente presenten alguna condición en cuanto a la modificación de sus propiedades bioquímicas, según Lannigan, 1993 algunas cepas de *Salmonella typhimurium* pueden perder su habilidad para producir H₂S al ser retadas con cloro.

Posiblemente las cepas ambientales aisladas al igual que las reportadas por Lannigan, 1993, necesitan modificar sus características metabólicas, para sobrevivir a las condiciones adversas en que se encuentran y es presumible que las cepas que aislamos del agua presentaron algún tipo de modificación metabólica, ya que existen agentes químicos, entre ellos el cloro, que podría ser la causa de que esta bacteria pierda la habilidad para producir H₂S.

Los resultados obtenidos indican que las propiedades bioquímicas de las bacterias, las cuales se basa la identificación por las técnicas tradicionales, pueden ser alteradas y hacer difícil la identificación de las mismas, sobre todo en estudios ambientales en donde la cantidad de bacterias es baja.

Para esto se puede requerir de procedimientos no convencionales para realizar una identificación más precisa; como lo son: electroforesis en geles de poliacrilamida de proteínas celulares, patrones de lípidos celulares, transformación genética, o hibridación de ácidos nucleicos, las reacciones serológicas. Estas técnicas que sólo tienen valor para la clasificación, a menudo tienen un enorme valor para la identificación.

Es por tanto, mi interés al tratar de implementar un procedimiento de identificación de bacterias en el ambiente, sobre todo contando con los avances tecnológicos en cuanto a técnicas instrumentales.

Al consultar los datos publicados por Sasser, 1990 y buscando una técnica que proporcionara una alternativa convincente, me incliné por probar la técnica de cromatografía de gases, tomando en cuenta que en estudios ambientales, muchos parámetros a determinar se pueden analizar en este instrumental y casi cualquier laboratorio de investigaciones ambientales cuenta con un cromatógrafo de gases.

En este contexto, el utilizar la técnica de cromatografía de gases y aplicarla al campo de la microbiología, con el análisis de los lípidos celulares de las bacterias, ofrece una alternativa que puede auxiliar y más aún, sustituir las pruebas bioquímicas convencionales.

Así dirigí mi estudio a implementar esta técnica, en el laboratorio de microbiología de la Coordinación de Ingeniería Ambiental del Instituto de Ingeniería.

Después de hacer una serie de pruebas ensayo y error con cepas tipo de cada especie para acondicionar el equipo y probar su funcionamiento, se evaluaron diferentes variables para implementar la técnica. Dichas variables contempladas fueron: extraer de diferentes cantidades de biomasa, sellar los tubos con cinta teflón, evaporar la muestra a inyectar y finalmente inyectar diferentes volúmenes de muestra para obtener perfiles definidos.

En el desarrollo del estudio, una observación importante fue la de recurrir a la evaporación de la muestra a inyectar, ya que de acuerdo a la técnica consultada y descrita por Sasser, 1990 la muestra se inyecta directamente sin evaporar, sin embargo observé que al evaporar la muestra se obtenían cromatogramas más definidos.

Con el ajuste de dichas variables me fue posible elaborar un procedimiento, con el cual se llevó a cabo la extracción de los ésteres metílicos que permitieron construir el perfil lipídico de las especies estudiadas.

V. cholerae ATCC 14035 presentó un perfil de 15 ésteres metílicos perfectamente definidos, gracias al uso de una columna capilar de sílice fundido, que permitió una buena resolución de los componentes y exacta cuantificación de los mismos, debido a que, tiene la capacidad de resolver isómeros iso y anteiso de los ácidos grasos con la misma longitud de carbonos, así como derivados hidroxilados y metilados presentes en bacterias gram negativas logrando con ello la exacta diferenciación de cada uno de los picos.

El perfil obtenido en este estudio concuerda con lo reportado anteriormente por Larrea et al., 1983 y Urdaci, 1990; sin embargo hay que recalcar que cada laboratorio tiene sus propias condiciones de desarrollo, por lo cual, había que comprobar que bajo las condiciones analíticas se obtenían los mismos resultados.

La cromatografía de gases tiene la característica de rapidez en el análisis, ya que la elución total de los componentes, se obtuvo en un tiempo aproximado de 30 min. Esta característica, se debe primordialmente a la baja densidad del gas acarreador que permite la difusión rápida del componente vaporizado en la columna, así como el equilibrio casi instantáneo logrado entre las fases.

Este tiempo de elución característico le da a la cromatografía de gases un gran valor en la identificación de bacterias, reduciendo considerablemente el tiempo en el proceso, ya que disminuye el tiempo de análisis aproximadamente 24 hrs, en relación con las técnicas tradicionales.

Con la determinación del perfil cromatográfico de *V. cholerae* ATCC 14035, fue posible identificar las cepas ambientales. Los aislamientos de *V. cholerae* identificados previamente con la técnica comercial API 20 E, mostraron exactamente el mismo patrón de ésteres metílicos que se observó en la cepa tipo, con 15 picos perfectamente definidos; lo que permite establecer la constitución de sus ácidos grasos le confiere la identidad de *V. cholerae* a las cepas aisladas del ambiente.

Así mismo la eficiencia de la técnica implementada se comprobó con la caracterización de cepas aisladas del ambiente e identificadas directamente por cromatografía, en donde

posible constatar que se pueden identificar colonias seleccionadas directamente del diferencial, pero es importante aclarar que debe elegirse una colonia perfectamente aislada que, los perfiles cromatográficos de las colonias características de *V. cholerae* en TCBS iguales que el obtenido para la cepa tipo y más aún igual al de las cepas identificadas previamente con la técnica de referencia.

Tanto las cepas de *V. cholerae* O1 como las cepas de *V. cholerae* No O1, exhiben el mismo perfil cromatográfico, esto es sustentable por lo reportado en la literatura por Lam 1983, quien afirma que la composición de los ésteres metílicos se puede utilizar para identificar organismos a nivel de especie, los serotipos O1 y No O1 deben entonces ser determinados por serología, para determinar la presencia o ausencia del antígeno O del grupo 1.

El tiempo de retención es una característica primordial en el análisis cromatográfico que a través de este, se pudo identificar cada uno de los componentes extraídos de la muestra a nivel cualitativo, así que se observó que el tiempo de retención es característico y único para cada ácido graso de *V. cholerae* y éste se incrementa de manera directa con el aumento de carbonos en la cadena.

A través del análisis de los porcentajes de los tiempos de retención se pudo establecer la presencia de los ácidos grasos que conforman el perfil de *Vibrio cholerae* en el que no se observó traslape de picos, ya que estos fueron diferenciados perfectamente, y presentó un tiempo de retención característico para cada ácido graso, el cual mantuvo su constancia sin variaciones significativas de un análisis a otro tanto en la cepa tipo como en los aislamientos.

La uniformidad de nuestros resultados, se demuestra con el cálculo de las desviaciones estándar, las cuales indican una alta reproducibilidad de los datos. A este respecto, la metodología implementada resulta adecuada para extraer los ésteres metílicos de células bacterianas y utilizarlos para la identificación de bacterias en general.

Todos los datos de tiempos de retención obtenidos, se encuentran dentro de los intervalos de confianza del 95% calculados, esta característica nos da la pauta para considerar, que se puede construir un perfil cromatográfico con menos repeticiones que las realizadas en este estudio, mismo es posible identificar una especie aislada del ambiente con una sola determinación cromatográfica.

La identificación de los microorganismos se basa primordialmente en el análisis cualitativo, lo cual no es de todo suficiente para definir el perfil de una especie dada, por lo que fue necesario realizar un análisis cuantitativo de las áreas de los picos, presentados como porcentaje del total de las áreas, para de esta manera determinar la abundancia relativa.

En este contexto el aspecto cuantitativo es también importante. Y en el análisis de los resultados cuantitativos se hizo comparando las áreas de la cepa tipo y de los aislamientos, observé que los patrones de abundancia fueron muy similares y no hubo diferencias significativas.

Al observar los resultados obtenidos a través del análisis de las áreas, se establece que los ácidos grasos más abundantes para *V. cholerae*, fueron el hexadecenoico (16:1), hexadecanoico

(16:0) y octadecenoico (18:1), la presencia de estos tres ácidos grasos ubica a esta especie de la familia *Vibrionaceae*.

Como se puede apreciar, la naturaleza de los ésteres metílicos encontrados en el p esta especie es un tanto variable ya que hay ésteres metílicos saturados (14:0, 15:0, 16:0, 18:0) con cadenas de 14 a 18 carbonos simples sin ninguna complicación en su cade embargo observamos que existe también ácidos grasos insaturados con una doble lig 16:1, 17:1 y 18 :1) que mostraron una estabilidad alta.

Encontramos ácidos grasos más complejos, con isomerías geométricas cis en posic 11, así como trans en posición 12.

Además de la presencia de dos ácidos hidroxilados con cadenas de 12 y 14 ca característicos de las bacterias gram negativas por formar parte del lípido A.

Los ácidos grasos que constituyen al lípido A son cualitativa y cuantitativ reflejados en este análisis con respecto a la proporción relativa del 3-hidroxitetradecano que este ácido graso es indicativo del tipo de lípido A presente en la membrana celular.

Es posible entonces contemplar, que tanto la cepa tipo como las cepas aisladas d residual siguen un mismo patrón de abundancia, con ciertas variaciones en los ácidos hidroxilados, pero que se deben a la naturaleza propia de este tipo de ácidos grasos.

Aunque algunos autores como Goran, 1984 indican que los ácidos grasos componentes básicos de los lípidos de todos los microorganismos y que el área depend cantidad inyectada, la variación del área de los ácidos grasos hidroxilados, no se adjudica factor, debido a que se mantuvo controlado una vez implementada la técnica, además de q variación no se presentó en todos los picos ni en todos los cromatogramas.

Por tanto, esta variación se atribuye principalmente a la heterogeneidad en la abun de los ácidos grasos celulares de la bacteria, y también se puede deber a que son lípidos va a nivel de ruta metabólica, como respuesta a la regulación genética en la construcción lípidos celulares en microorganismos según lo describe Moss, 1980.

S. typhi ATCC 0779 mostró un perfil compuesto por 11 ésteres metílicos, la identif de estos, se hizo comparando el cromatograma obtenido después de inyectar los ácidos extraídos, con los tiempos de retención del estándar comercial, que se inyectó diariamen las mismas condiciones de operación. Para construir el perfil, tuve especial cuidado en o que la frecuencia de aparición de los picos no variara.

Es muy importante mencionar que el perfil de ácidos grasos de *S. typhi* obtenido estudio no ha sido reportado con anterioridad en la literatura. Lo cual, además implementación de la tecnología, es una aportación relevante gracias a los resultados ob en esta investigación.

La frecuencia de aparición de los picos se mantuvo constante, esto quiere decir c condiciones de operación del equipo persistieron iguales durante el análisis, permitie

migración diferencial de los componentes. Dicha migración depende, en gran medida, de diferentes afinidades de los componentes por la fase estacionaria, ya que los componentes afines, 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 del número de átomos de carbono de la cadena, también se debe tener presente que al llevar a cabo la metilación de 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 construcción del perfil de ácidos grasos para *S. typhi* ATCC 0779, permitió identificar a las cepas aisladas de agua residual previamente identificadas por el sistema miniaturizado API 20E como *Salmonella* spp. Dichos aislamientos mostraron un perfil de ácidos grasos al que presentó la cepa de referencia. Un sólo ácido graso presente, ausente o diferente permite distinguir una especie bacteriana de otra de acuerdo a lo que afirma Welch, 1990, como criterio es posible afirmar que las cepas recuperadas de las muestras de agua residual se identificaron como *S. typhi*.

De igual forma, las cepas seleccionadas directamente de agar Sulfito Bismuto, y a las cuales se hizo la extracción de los ácidos grasos, presentaron exactamente el mismo perfil de ácidos grasos que la cepa tipificada, comprobando con esto que la técnica implementada, la identificación de bacterias se realiza en menos tiempo, en relación con las pruebas tradicionales de identificación.

El tipo de ácidos grasos celulares presentes en *S. typhi* son cadenas lineales saturadas e insaturadas, uno de estos ácidos grasos saturados son de cadena ramificada, en tanto que los ácidos grasos hidroxilados. De los picos presentes, los correspondientes a los ácidos dodecanoico, tetradecanoico, hexadecanoico y octadecanoico, se han establecido como característicos de la familia *Enterobacteriaceae*, esto permite incluir a *S. typhi* dentro de esta familia.

Las cadenas insaturadas del perfil de ácidos grasos obtenido, sólo presentan una doble ligadura, esto es característico de las bacterias gram negativas según Boon 1977; el cual es un rasgo 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.

Respecto a los valores promedio de los tiempos de retención, se puede hablar de la estabilidad de los ésteres metílicos que conforman el perfil de *S. typhi*. Cada uno de los ácidos grasos presentes en el perfil de tiempos de retención absolutamente estable, y observé que tanto la cepa tipo, como las cepas aisladas de agua residual, presentan tiempos de retención completamente similares.

La desviación estándar calculada para cada componente comprueba la estabilidad de los tiempos de retención y por tanto de las condiciones de experimentación, permitiendo explicar la migración diferencial entre los componentes, que depende según Martin 1986, de la afinidad de los componentes por la fase estacionaria.

Al igual que en *V. cholerae*, todos los datos de tiempos de retención obtenidos encuentran dentro de los intervalos de confianza del 95% calculados, por lo que consideramos posible definir el perfil de una cepa tipo con menos repeticiones que las realizadas en el estudio, así mismo es posible identificar una especie aislada del ambiente con una determinación cromatográfica.

No obstante la sola caracterización cualitativa no es del todo suficiente para establecer el perfil lipídico de la especie analizada, por lo que debe complementarse con el análisis cuantitativo.

En el análisis de los promedios de las áreas de cada uno de los ácidos grasos, me permito observar que hubo algunas diferencias en términos cuantitativos en el ácido graso 3-OH-hidroxitetradecanoico). Esto no se adjudica al procedimiento, ya que existe la posibilidad de que sean lípidos variables a nivel de ruta metabólica como ya lo han señalado Cookson, 1989 y Cookson, 1988. Así mismo Moss, en 1980 señala que existen ácidos grasos en los diferentes grupos de bacterias que tienden a presentar alteraciones en su abundancia, lo cual concuerda con los resultados que obtuve para las dos especies determinadas, dicha alteración se da como resultado de la regulación genética en la construcción de lípidos celulares en el microorganismo, la variación temporal en la abundancia de los lípidos celulares es aún un campo poco conocido y requiere mayor investigación.

Las especies bacterianas que pertenecen a la familia Enterobacteriaceae como es el caso de *S. typhi*, tienen como característica distintiva, que el ácido graso hexadecanoico sea el más abundante, y como segundo lugar en abundancia está el hexadecenoico.

La cepa tipo de *S. typhi* y los aislamientos obtenidos de agua residual, presentan una alta abundancia en el ácido graso hexadecanoico (16:0), hexadecenoico (16:1), y el octadecenoico (18:1); como se dijo anteriormente, estos ácidos grasos celulares son representativos de las bacterias gram negativas y corresponde a lo dicho por Boe en 1980.

Esta característica se observó también para *V. cholerae*, con la única diferencia que en este caso, respecto, es que en *V. cholerae* el ácido graso más abundante es el hexadecenoico y después el hexadecanoico, es decir a la inversa que *S. typhi*, lo cual se debe a que, no obstante que las especies sean bacterias gram negativas pertenecen a diferentes familias, esta es una característica de este análisis, ya que permite hacer este tipo de distinciones a nivel familiar, y en otros casos taxonómicos a nivel género.

La concentración de los ácidos grasos en *S. typhi* se mostró altamente estable, por lo que consideramos una gran confiabilidad en la constitución del perfil de los ácidos grasos. Y esto tanto en la identidad del microorganismo estudiado.

S. typhi aislada del ambiente define un patrón de abundancia muy similar al de la cepa tipo, con lo que comprobamos que se trata de la misma especie.

Con los resultados obtenidos y de acuerdo a lo consultado en la literatura, es necesario reiterar que el análisis por cromatografía gas líquido, es una técnica valiosa, útil para caracterizar muchas especies de bacterias, incluyendo miembros de las familias Enterobacteriaceae, Vibrionaceae y otros microorganismos.

Su sensibilidad extrema, que permite separar mezclas de cantidades muy pequeñas, el uso repetido de las columnas le da ventaja respecto a las pruebas tradicionales de identificación, además de proponer mayor exactitud en menos tiempo; ya que en la práctica se ha demostrado que los métodos convencionales implican mayor trabajo en el laboratorio.

Por otra parte, se pudo constatar en esta investigación, que la técnica cromatográfica tiene gran utilidad en la identificación de bacterias, que sufren ciertas modificaciones metabólicas provocadas por el ambiente.

La revisión bibliográfica, sugiere que la técnica cromatográfica para la identificación de estos microorganismos ha sido utilizada en contados estudios, de tal forma que para *S. typhi* se encontró un reporte realizado por Cho en el sur de Corea en 1999, este autor aisla *S. typhi* partir de agua subterránea y agua de estanque. Aparentemente utiliza la misma técnica que nosotros, el Sistema de Identificación Microbiana, que se basa en la identificación de bacterias por cromatografía de gases. No obstante, el reporte no incluye el perfil de la bacteria.

En el presente estudio describo la técnica y presento el perfil definido para *Salmonella typhi*, lo cual contribuye al conocimiento de esta especie.

La mayoría de estudios ambientales, siguen utilizando métodos convencionales para la detección de bacterias patógenas con diferentes técnicas de identificación basadas en métodos bioquímicos convencionales.

La tecnología del análisis de los ácidos grasos celulares usando cromatografía de gases, ha adquirido aplicabilidad, ofreciendo un poder considerable como herramienta en la identificación microbiana, ya que se han definido patrones característicos de ácidos grasos celulares para diferentes microorganismos a nivel de especie con la obtención de resultados en forma rápida.

Por tal motivo, con la presente investigación pretendo contribuir al desarrollo de la aplicación de técnicas instrumentales, para mejorar el estudio de bacterias y en particular de bacterias patógenas presentes en el ambiente.

Tomando en cuenta que por lo general, los laboratorios dedicados a estudios ambientales apoyan diversos análisis de rutina en la cromatografía de gases, es factible que las determinaciones de la calidad bacteriológica se lleven a cabo con la aplicación de esta técnica, puesto que es una técnica precisa para la identificación de bacterias, incluyendo aquellas que presentan modificaciones metabólicas provocadas por el medio en el que se encuentran.

La utilización de esta técnica sería muy útil en investigaciones epidemiológicas, y se aprecia su uso para trabajar con numerosos aislamientos como sucede en estudios ambientales.

Capítulo 10. CONCLUSIONES.

- I. Se corrobora la hipótesis planteada de que la técnica de análisis de los ácidos celulares de *V. cholerae* y *S. typhi* mediante cromatografía gas-líquido, considerarse como uno de los métodos más rápidos y precisos, altamente reproducibles, cuyos resultados proveen información valiosa para la identificación y clasificación de cada microorganismo que posee un perfil lipídico propio que le permite diferenciarlos de otros.
- II. Los perfiles de las cepas tipificadas pueden utilizarse para la identificación de la especie de *V. cholerae* y *S. typhi* aislados de agua cruda residual que se destina a beber en las grandes ciudades, y puede adaptarse como técnica de rutina para una identificación rápida y confiable. Además de ofrecer una alternativa a las pruebas bioquímicas, las cuales requieren más tiempo y son menos precisas.
- III. 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 *S. typhi*, contribuyendo así al conocimiento de la célula bacteriana a nivel bioquímico.
- IV. El análisis de ácidos grasos resulta de gran utilidad en investigaciones microbiológicas en general, y en un futuro muy probablemente en estudios ambientales, debido a la dificultad que representa trabajar con este tipo de aislamientos. Ya que en el ambiente los microorganismos alteran sus propiedades bioquímicas según las condiciones en las que se encuentren, así también estas condiciones cambian después de varias resiembras y durante el proceso de conservación a corto plazo. Por tales motivos resulta conveniente recurrir a métodos de identificación que no solamente se basen en la actividad metabólica de los microorganismos.
- V. Los resultados obtenidos, permitieron cumplir de manera satisfactoria con el objetivo principal y los particulares planteados en la investigación.

Capítulo 12. BIBLIOGRAFIA.

1. Abel, K., De Scchmertzing, H. & Peterson, J. I. 1963. Classification of microorganism analysis or chemical composition feasibility of utilizing gas chromatography. *J. Bacteriol.* **85**: 1039-1044.
2. Alonso, J. L., Botella, M. S., Amoros, I. & Alain, R. 1992. Salmonella detection in waters using a short standard method. *Wat. Res.* **26**:973-978.
3. API 20 E. Ficha técnica. (1997). Sistema de identificación para *Enterobacteriaceae* bacilos gram negativos. bioMerierux sa. pag. 17-21
4. Barr, J.G. 1977, *Klebsiella*: Taxonomy, nomenclature and communication. *J. Clin. Pathol.* **30**: 943-944.
5. Bascom, S., Lapage, S. P., Willcox, W. R. and Curtis, M. A. 1971. Numerical classification of the tribe *Klebsiellae*. *J. Gen. Microbiol.* **66**:279-295.
6. Bascom, S. 1981. Application of automation to the general and specific detection of bacteria. *Lab. Pract.* **30**:5-20.
7. Basile, F. Voorhees, K. J. & Hafield, T. 1995 Microorganism gram-type differentiation based on pyrolysis-mass spectrometry of bacterial fatty acid methyl ester extracts. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1534-1539.
8. Bailey; Scott. 1989. Diagnóstico Microbiológico. 7ª Ed. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires.
9. Blanco, A. 1988. Química Biológica. Ed. El Ateneo. Argentina.
10. Boe, B. & Gjerde, J. 1980. Fatty acid patterns in the classification of some representative members of the families *Enterobacteriaceae* and *Vibrionaceae*. *J. Gen. Microbiol.* **116**: 41-49.
11. Barua, D. & Greenough, W. B. (1992). Cholera. Chapter 3. Epidemiology and pathogenesis of non-O1 *Vibrio* species and related organisms. Chapter 6. The ecology of *Vibrio cholerae*. Chapter 7. The epidemiology of *Vibrio cholerae*. pp. 61, 62, 111, 140-150. John Wiley & Sons Publishing Corporation. New York. U. S. A.
12. Boon, J., Leew, J. W., Hoek, G. J. & Vasjan, J. H. 1977. Significance and taxonomic utility of Iso and Anteiso monoenoic fatty acids and branched α -hydroxy acids in *Desulfohalobium desulfuricans*. *J. Bacteriol.* **129**: 1183-1191.

13. Bousfield, I. J., Smith, G. L., Dando, T. R. & Hobbs, G. 1983. Numerical analysis of fatty acid profiles in the identification of coryneform, nocardioform and some other bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **129**: 375-394.
14. Brenner, D.J., Steigerwalt, A. G. and Fanning, G. R. 1973. Differentiation of *Enterobacter aerogenes* from *Klebsiella* by deoxyribonucleic acid reassociation. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **19**: 193-200.
15. 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.
16. Britton, G. Waste Water Microbiology. Edit. Wiley-Liss. USA.
17. 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.
18. Carpenter, P., 1979. Microbiología. 4a Ed. Interamericana. México.
19. Canonica, F., & Pisano, M. 1989. GL-C Analysis of fatty acids methyl esters of *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sebestiae* and *Aeromonas caviae*. *J. Clin. Microbiol.* **4**: 681-685.
20. Cecchini, G. L. & O'brien, R. T. 1968. Detection of *Escherichia coli* by gas chromatography. *J. Bacteriol.* **95**: 1205-1206.
21. Cho, Jang-Cheon & Kim Sang-Jong. (1999). Viable, but non-culturable, state of *Salmonella typhi* in ground water. *FEMS Microbiol Letters.* **170**: 257-264
22. Clark, A. J., Burger, A. C. & Sabatinos, E. L. 1982. Characterization of indicator bacteria in municipal raw water, drinking water and new main samples. *Can. J. Microbiol.* **28**: 1013.
23. Clesceri, L., Greenberg, E., & Trussell, R. 1989. Standard Methods for the examination of water and wastewater. 17th Ed. American Public Health Association. USA.
24. Cookson, B., Talsania, S., & Philips, I. 1989. A qualitative and quantitative study of the fatty acids of *Streptococcus milleri* with capillary Gas Chromatography. *J. Gen. Microbiol.* **135**: 831-838.
25. Cronan, J. E., 1975. Thermal regulation of membrane lipid composition of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **250**: 7074-7077.
26. Davis, L. Dulbecco, L. 1996. Tratado de microbiología. 4ta. Ed. Masson. Barcelona.
27. Dabrio, M. V. 1973. Cromatografía de gases II. Ed. Alhambra. Madrid.

28. De Simón Serra, M., Ferrer, E. D., Dericos, B. E. & Fernández, P. F. 1986. Study of the microbiological contamination of cacao derived products. *Ann. Bromatology*. **3**: 349.
29. Drucker, D. B., Griffith, C. J. & Melville, T. H. 1973. Fatty acids fingerprints of *Streptococcus mutans* grown in chemostat. *Microbios*. **7**: 17-23.
30. Drucker, D. B. and Owen, I. 1973. Chemotaxonomic fatty acid fingerprints of bacteria with and without aeration. *Can. J. Microbiol* **19**: 247-250.
31. Drucker, D. B. 1974. Chemotaxonomic fatty acid fingerprints. *Can. J. Microbiol.* **20**: 1728.
32. Edwards, P. R. & Ewing, W. H. 1962. Identification of *Enterobacteriaceae*. 2nd ed. Burgess Publishing Co. Minneapolis Minn.
33. Eerola, E. & Lehtonen, O. 1988. Optimal data processing procedure for automatic bacterial identification by gas-liquid chromatography of cellular fatty acids. *J. Clin. Microbiol.* **26**: 1745-1753.
34. Falcão, D. P., Valentini, S. R. & Leite, C. Q. 1993. Pathogenic or potentially pathogenic bacteria as contaminants of fresh water from different sources in Araraquara, Brazil. *Water Sci. Tech.* **27**: 1737-1741.
35. Farmer III, J.J., Davis, B. R., Hickman, F. W., McWhorter, A., Elias, C., Fanning, S., Steingewalt, A. G., O'Hara, C. M., Smith, G. K. and Brenner, D. J. 1985. Biocatalytic identification of new species and biogroups of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* **21**: 46-76.
36. Gawthorne, T. Gibbs R. A., Methew, K. & Ho, G. E. 1996. H₂S papers as presumptive tests for *Salmonella* contamination in tropical drinking water. *Wat. Sci. Tech.* **31**: 187-190.
37. Gehrke, C. W. & Goerlitz, D. F. 1963. Quantitative preparation of methyl esters of fatty acids for gas chromatography. *Analyt. Chem.* **35**: 76-80.
38. Giono, C. S., Gutiérrez, E., & Valdespino, G. 1993. Diagnóstico de laboratorio de infecciones gastrointestinales. S.S.A. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. México.
39. Glass, R. L. 1971. Alkohlisis, Saponification and preparation of fatty Acids Methyl Esters. *Lipids*. **6**: 919.
40. 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.
41. Goran, O., Lennart, L. Y Aders, M. 1984. Gas Chromatography, Mass spectrometry and their applications in microbiology. Plenum Press. New York p. 57-103.

42. Gottschalk, G. 1979. Bacterial metabolism. Springer Verlag Ed. New York.
43. Goodfellow, M. and Minnikin, D. E. 1985. Introduction to chemosystematics. In: *Methods in Bacterial Systematics*, p. 1-15. Edited by M. Goodfellow & D. E. Minnikin. London & New York: Academic Press.
44. Gurr, M. I. & James, A. T. 1980. Fatty acids, In *Lipid Biochemistry: and introduction*, p. 18-88. Chapman & Hall, New York.
45. Häusler, J. & Richter, V. 1983. A process of identification microorganism by gas chromatography. UK patent application GB 2 121-434 A.
46. Häusler, J. & Richter, V. 1985. Identification of bacteria of family *Enterobacteriaceae* by gas chromatography. Separatum, Publishing House of the Hungarian Academy of Sciences, Budapest.
47. Häusler, J. & Richter, V. 1989. Identification of *Pseudomonas* isolated from wastewater by gas chromatography. V Curso Simposium Internacional sobre Biología de la contaminación ambiental. UNAM, ENEP-IZTACALA, SEDUE, IPN. México.
48. Holmes, B., Willcox, W. R. & Lapage, S. P. 1978. Identification of *Enterobacteriaceae* by gas chromatography: the API 20E System. *J. Clin. Pathol.* **31**: 22-30.
49. Hu, C. J. & Gibbs R. A. 1995 A comparison of culture methods for detection of *Salmonella* in wastewater sludge. *Wat. Sci. Tech.* **31**: 303-306.
50. Informe técnico de proyecto 1997: Identificación de bacterias por cromatografía de gases. Laboratorio de bacteriología. Proyecto de Conservación y Mejoramiento del Ambiente. ENEP- Iztacala. UNAM.
51. James, A. T. & Martin, J. P. 1956. Gas-liquid chromatography: The gas-density method. A new apparatus for the detection of vapors in flowing gas streams. *J. Biochem.* **63**: 133-137.
52. 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 and octadecanoic acid. *J. Biochem.* **63**: 144-152.
53. 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 and mass spectrometry applications in microbiology*. Plenum Publishing Corp. New York.
54. Jantzen, E., Bryn, K., & Bovre, K. 1974. Gas chromatography of bacterial whole cell methanolsates. *Acta Pathol Microbiol. Scand. Sect. B.* **82**: 753-766.
55. Johnson, L. L., McFarland, L., Dearing, P., Raisys, V. & Shoenknecht, F. D. 1984. Identification of *Clostridium difficile* in stool specimens by culture-enhanced gas chromatography. *J. Clin. Microbiol.* **27**: 2218-2221.

56. Jones, D. 1988. Composition and properties aft the Family *Enterobacteriaceae*. *Bacter. Symp. Supp.* 1S-19S.
57. Kaneda, T., 1962. Biosynthesis of branched chain fatty acids: Insolation and Identifi of fatty acids from *Bacillus subtilis* ATCC 7059. *J. Biol. Chem.* **238**: 1222-1228.
58. Kaneda, T., 1967. Fatty acids in the genus *Bacillus*: Iso and anteiso fatty a characteristic constituents of lipids in 10 species. *J. Bacteriol.* **93**: 894-903.
59. Kaneda, T., 1971. Factors affecting the relative ratio of fatty acids in *Bacillus cereu*. *J. Microbiol.* **17**: 269-275.
60. Kazda, J., Müller, H.-J., Stackebrandt, E., Daffe, M., Müller, K. and Pitulle, C. *Mycobacterium madagascariense* spp nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**: 524-528.
61. Koneman, M. 1997. Diagnóstico microbiológico. 3era. Ed. Panamericana. México.
62. Lambert, M., Brenner, J., Farmer, J. , & Moss, W. 1983. Differentiation of *Vibrio* Species by Their Cellular Fatty Acid Composition. *Int. J. System. Bac.* **33**: 777-792.
63. Lannigan, R & Hussain, Z. (1993). Wound Isolate of *Salmonella typhimurium* that is chlorate resistant after exposure to Dakin's solution: concomitant loss of hydrogen production, gas production, and nitrate reduction. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 2497-2498
64. Lechevalier, M.P. 1982. Lipids in bacterial taxonomy, P.460-509. In: CRC Handbook of microbiology. I. Laskin and H. A. Lechevalier (ed)., 2nd ed., Vol. 4. CRC Press, Inc. Boca Raton, Fla. USA.
65. Lehninger, A. L. 1979. Bioquímica. 2a Ed. ENUSA. Barcelona.
66. Lennette, E., *et al* 1982. Microbiología clínica. 3a Ed. Panamericana. Buenos Aires.
67. López, A. R., Rendon, E. F., Montaña. R. R., 1993 Manual de laboratorio de microbiología sanitaria. Departamento de microbiología. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional. 2ª. edición.
68. Lorraine, S. A., 1980. Fundamentos de microbiología. ENUSA. Barcelona.
69. Madsen, M. 1994 Enumeration of Salmonellae in crocodile pond water by direct counts and by the MPN technique. Rapid communication. *Wat. Res.* **28**: 2035-2037.
70. Martin, W. D., Mayes, A. P., Rodwell, W. V. y Granner, K. D. 1986. Bioquímica de los alimentos. 10a Ed. El manual moderno. México.
71. Machtiger, N. A., & W. M. O'leary. 1973. Fatty acid composition of paracolons: *Aerobacter Citrobacter* y *Providencia*. *J. Bacteriol.* **114**: 80-85

72. Mayer, H. 1984. Significance of lipopolysaccharide structure for questions of taxonomic and phylogenetical relatedness of gram negative bacteria. p. 71-83. In: The cell membrane. Harber (ed). Plenum Publishing Corp., New York.
73. McNabb, A., Shuttleworth, R. Behme, R. & Colby, W. D. 1997. Fatty acid characterization of rapidly growing pathogenic aerobic actinomycetes as a means of identification. *Microbiol.* **35**: 1361-1368.
74. Mc Nair, H. M. & Bonelli, E. J. 1968. Basic gas chromatography. Varian Co. Contract Report, Printers, Berkeley, California 123-125.
75. Mitruka, B. M., Jonas, A. M. & Kundaragi, R. S. 1973. Rapid differentiation of bacterial mixed populations by gas-liquid chromatography. *Yale. J. Biol. and Med.* **78**: 104-112.
76. Monteoliva-Sánchez, M., Ferrer, M. R., Ramos, C. A., Quesada, E. & Monteoliva, M. 1997. Cellular fatty acid composition of *Deleya halophila*: effect of growth temperature and NaCl concentration. *J. Gen. Microbiol.* **134**: 199-203.
77. Moss, C. W. & Dees, S. B. 1975. Identification of microorganisms by gas chromatography-mass spectrometric analysis of cellular fatty acids. *J. Chromatogr.* **112**: 595-604.
78. 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.
79. Moss, C. 1988 Cultural and chemical characterization of CDC groups EO-2, M-5 and N-10 *Moraxella* species, *Oligella urethralis*, *Acinetobacter* species, and *Psychrobacter* in clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* **26**: 484-492.
80. Moss, C. W., Samuels, S. B., Liddle, J. & McKinney, R. M. 1988. Occurrence of branched chain hydroxy fatty acids in *Pseudomonas maltophilia*. *J. Bacteriol.* **114**: 1018-1022.
81. Moss, C., & Shinoda, T. 1982. Determination of cellular fatty acid compositions of yeasts by gas-liquid chromatography. *J. Clin. Microbiol.* **16**: 1073-1079.
82. Müller, K. D., Schmid, E. N. & Kroppenstedt, R. M. 1998. Improved identification of mycobacteria by using the microbial identification system in combination with adenosine trimethylsulfonium hydroxide pyrolysis. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 2477-2480.
83. Norma Oficial mexicana NOM-127-SSA1-1994, "Salud ambiental, agua para consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización" Diario Oficial de la Federación CVIII 13, 18, ene 1996,
84. Okuyama, H., Sasaki, S., Higashi, S. & Murata, N. 1990. A transunsaturated fatty acid in a psychrophilic bacterium. *Vibrio* spp strain ABE-1. *J. Bacteriol.* **172**: 3515-3518.

85. Orskov, I. 1974. *Klebsiella* pp.321-324. In: Bergey's manual of determinative bacteriology. Buchanan, R. E., Gibbons, N. E (eds.). 8th ed. Baltimore: Williams & Wilkins.
86. O'Leary, W. W. 1962. The fatty acids of bacteria. *J. Bacteriol.* **26**: 421-447.
87. Papapetropoulou, M. & Moschopoulos, H. (1996). Detection of *Salmonella* spp. in estuarine waters by using both the conventional culture and probe technique. *Wat. Air. and Soil Pollut.* **89**: 159-165.
88. Rasoamanjara, D., Peladan, F., Turlot, C. J., Monteil, H. & Richard, C. 1997. Characterization of *Flavobacterium* species by analysis of volatile fatty acids produced. *Gen. Microbiol.* **132**: 2723-2732.
89. Rodier, J. 1987. Análisis de las aguas. Ed. Omega. España.
90. Sánchez, Petra. 1991. Manual de métodos de aislamiento e identificación de *Vibrio cholerae* en aguas. Divisão de Microbiologia. CETESB. São Paulo, Brasil.
91. Sakazaki, Riichi. 1992. Bacteriology of *Vibrio* and related organism. Pag. 37-55. En: D. & Greenough, W. B. 1992. Cholera. Plenum Publishing Corporation. New York. A.
92. Sasser, M. 1990. Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. 1-7. MIDI technical note #101. MIDI, Inc., Newark, Del.
93. Sasser, M. 1990. Identification of bacteria through fatty acid analysis, p. 199-204. In: Methods in phytobacteriology. Z. Klement, K. Rudolph and D. Sands (ed.) Akademiai Kiado, Budapest.
94. Schleifer, K. H., *et al* 1983. Molecular systematics of prokaryotes. *Ann. Rev. Microbiol.* **37**: 143-171.
95. Silva De, E. M., Mantilla J. R. & Agudelo C. A. 1997 *Vibrio cholerae* Non-O1 in Colombia. Research note. *Wat. Res.* **31**: 3175-3177.
96. Sommenwirth A.1984. Métodos y Diagnóstico del Laboratorio Clínico. Tomo 1. Ed. Medica -Panamericana. México.
97. Son, R., Rusul, G., Samuel, L., Yuherman, Senthil, S., Rasip, A., Nasreldin, E., Nishibuchi, M. Characterization of *Vibrio cholerae* 0139 Bengal isolated water from Bangladesh. Note. *J. Appl. Microbiol.* **85**: 1073-1077.
98. Stainer, R., *et al.* 1986. Microbiología. 4ª edición. Editorial REPLA. Barcelona.
99. Starr, 1981 Starr, M. P., Stolp, H., Tripper, H. G., Balows, A., & Shlegel, G. H. 1981. Prokaryotes; A handbook on habitats, isolation and identification of bacteria. Springer-Verlag. New York.

100. Storch de Gracia, J. M. 1975. Fundamentos de cromatografía de gases. 2a Ed. Alhambra, Madrid.
101. Torres, V. 1995. Análisis de los ésteres metílicos de seis enterobacterias. Tesis de Doctorado en Biología. Facultad de Ciencias. UNAM. México.
102. Tuppie, 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.
103. Urdaci, M., Marchand, M. & Grimont, R. 1990. Characterization of 22 *Vibrio* Species by Gas Chromatography Analysis of their Cellular Fatty Acids. *Res. Microbiol.* **141**: 437-442.
104. VET-RPLA. Ficha técnica. (1997). A kit for detection of *Vibrio cholerae* enterotoxin and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin in cultures filtrates by reversed passive agglutination. OXOID. pag. 1-3
105. 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 clinic specimens. *J. Clin. Microbiol.* **7**: 1538-1542.
106. Welch, D. F. 1991. Applications of cellular Fatty Acid Analysis. *Clin. Micro. Rev.* **4**: 477-483
107. Yáñez, 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.

Reactivos utilizados en la extracción de los ésteres metílicos

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.