

R. 6508

"IDENTIFICACION DE BACTERIAS GRAM NEGATIVAS
NO FERMENTADORAS POR CROMATOGRAFIA LIQUIDO
GASEOSA"

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA
BIBLIOTECA

Estrella Martin Mazuelos

-Octubre -1.982-



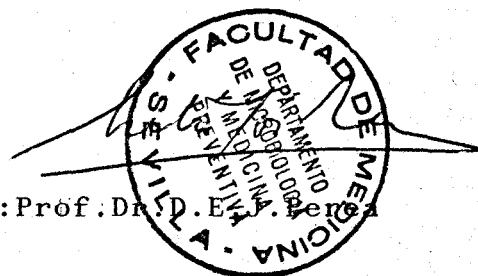
Prof. Evelio J. Perea

Prof. EVELIO PEREA PEREZ, Catedrático de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla.

CERTIFICO: Que la presente Tesis Doctoral titulada "IDENTIFICACION DE BACTERIAS GRAM NEGATIVAS NO FERMENTADORAS, POR CROMATOGRAFIA LIQUIDO GASEOSA", ha sido realizada por Doña ESTRELLA MARTIN MAZUELOS bajo mi dirección y reúne a mi juicio méritos suficientes para optar al grado de Doctor en Farmacia por la Universidad de Sevilla.

Y para que conste, expido el presente certificado en Sevilla a uno de Octubre de Mil Novecientos Ochenta y Dos.

Fdo.: Prof. Dr. E. Perea



A Javier

Javier y Beatriz.

AGRADECIMIENTO :

-Al Profesor Evelio J. Perea Pérez, Director de esta Tesis, cuyos consejos, ayuda e interés hicieron posible la realización de la / misma.

-A la Dra. M^a Victoria Borobio Enciso, Jefe de Servicio de Microbiología del Hospital / Universitario de Sevilla, por su constante aliento y confianza.

-Al Dr. Fernando Fabiani Romero, Adjunto de la sección de Cromatografía del Hospital Universitario de Sevilla, quien me inició en el campo de la Cromatografía.

-A Fatima Pozo por su inestimable ayuda, a todos mis compañeros del Departamento de Microbiología que con su constante estímulo y ánimo han hecho posible que este trabajo llegara a / su fin.

A todos, muchas gracias.

- I N D I C E -

	<u>PAG.</u>
1.-INTRODUCCION.-	1
2.-MATERIAL Y METODOS:	
2.1.1.-Cepas bacterianas	6
2.1.2.-Antibióticos	9
2.1.-MATERIAL: 2.1.3.-Medios de cultivo	10
2.1.4.-Reactivos	17
2.2.-METODOS: 2.2.1.-Aislamiento.....	20
2.2.2.-Identificación	20
bioquímica.	
2.2.3.-Identificación por Cromato- .	38
grafía líquido-gas (CLG)	
2.2.4.-Determinación de las con- ...	42
centraciones Mínimas Inhibi	
torias.	
3.-RESULTADOS:	
3.1.-Resultados de la identificación bioquímica ...	45
3.2.-Resultados de la Cromatografía Líquido Gaseo ..	58
sa (CLG)	
3.3.-Resultados de sensibilidad a antibióticos	106
4.-DISCUSION:	
4.1.-Identificación bioquímica	122
4.2.-Identificación por Cromatografía Líquido Gaseosa	139
4.3.-Determinación de la sensibilidad a antibió- ...	161
ticos.	
5.-CONCLUSIONES.	166
6.-BIBLIOGRAFIA:	172

FE DE ERRATAS

Pag.	Donde dice:	Debe decir:
3	desaxirribonucléico	desoxirribonucleico
3	necleico	nucléico
6	las otras 120 cepas	las otras 102 cepas
19	congelacion y aislamiento	descongelacion y aislamiento
27	Falta la prueba numero 24 que es la investigacion de la produccion de β -galactosidasa.	

INTRODUCCION

El incremento en la frecuencia de aislamiento de Bacterias Gram Negativas No Fermentadoras (BGNNF), en muestras clínicas, ha suscitado en los últimos años, una mayor atención por parte de los microbiólogos clínicos hacia un estudio exhaustivo de este grupo bacteriano.

Estos microorganismos se caracterizan por ser Gram negativos, aerobios estrictos, lo que implica un metabolismo oxidativo, nunca fermentativo, con una morfología que puede ser / variable, así como su capacidad de actuar sobre la glucosa (11, 85 -). Son seres de vida libre, por tener como habitat natural el agua, suelo, vegetales y el aire (11). Desde el punto de vista de la microbiología clínica se les ha considerado como / saprófitos, aunque en la actualidad debido al aumento de su aislamiento en muestras clínicas, han pasado a tener una entidad propia como agentes causales de infecciones, en especial de / tipo nosocomial (3,15,34,74,90).

Con el fin de conseguir una identificación y clasificación de este grupo heterogéneo de bacterias, se han realizado estudios atendiendo fundamentalmente a características morfológicas y bioquímicas (3,12,37,52,74,75,81,91,97,106), que en la mayoría de los casos no han sido satisfactorias para conseguir un esquema definitivo y unificado de identificación, debido a la gran diversidad de pruebas bioquímicas empleadas y a la falta de reactividad bioquímica que dicho grupo presenta / (85).

En adición a estas pruebas, otros autores aplicaron al estudio de las Bacterias Gram Negativas No Fermentadoras, técnicas más sofisticadas como: el estudio de las secuencias del / ácido desaxirribonucléico (58), el estudio de la homología de / los ácidos necléicos (77,78) y la utilización de sustratos definidos como única fuente de carbono (4,5,83,96). Todas estas / técnicas, junto con las anteriores, aportan criterios taxonómicos para este grupo bacteriano, si bien llevan consigo un alto consumo de tiempo y material, factores que determinan que no / puedan utilizarse como técnicas de rutina en un laboratorio de microbiología clínica (43).

Por todo esto surge la necesidad de buscar otros métodos, más rápidos y sensibles para la identificación bacteriana. En los últimos años, una de las técnicas más utilizadas a este fin es la Cromatografía Líquido Gaseosa (CLG) por presentar sobre / los métodos convencionales anteriormente expuestos las siguientes ventajas: Mayor rapidez, sensibilidad, especificidad y reproductibilidad (15,16,61,62).

En 1.963 ABEL y cols. y OYAMA (1,75), introducen la CLG en la microbiología. Es a partir de entonces cuando se

aplica esta técnica con fines de identificación bacteriana, siguiendo dos vertientes: el análisis de los componentes estructurales de la célula bacteriana (12,17,23,39,50,66,96,100,104) y / el de los productos del metabolismo bacteriano a partir de substratos conocidos (15,43,54,56,62,65,67).

Ha habido algunos intentos de identificación mediante el estudio de la composición estructural de ácidos grasos de géneros y especies aisladas de BGNNF (10,20,21,23).

Por todos los problemas que conlleva la identificación de los BGNNF, en la presente memoria hacemos un estudio de un amplio grupo de BGNNF, a los que aplicamos una conjunción de técnicas bioquímicas convencionales y cromatográficas, basadas estas últimas en la determinación por CLG de la composición química estructural en ácidos grasos, que nos permitan establecer / patrones cromatográficos que nos sirvan como taxones. También se ha hecho un estudio de sensibilidad frente a diferentes drogas / antimicrobianas para intentar establecer patrones de sensibilidad que aportaran más datos taxonómicos.

Por último, hemos hecho un estudio comparativo de estos 3 métodos, con el fin de poder establecer una correlación / entre ellos.

El objeto pues del presente trabajo es intentar establecer unos criterios taxonómicos de identificación unificados para un grupo de BGNNF, así como conseguir una optimización de estos métodos de identificación, que lleven consigo una rapidez y precisión aplicables a un laboratorio de microbiología / clínica.

MATERIAL Y METODOS

2.1.- MATERIAL:

2.1.1.- CEPAS BACTERIANAS:

Hemos estudiado un total de 120 cepas de bacterias Gram negativas no fermentadoras (BGNNF) en el presente trabajo, 18 de las cuales son especies bacterianas pertenecientes a las colecciones internacionales:

- American Type Culture Collection (ATCC)
- National Collection Type Culture (NCTC)
- National Culture Industrial Bacteria (NCIB) y que se expresan en la TABLA nº I

Las otras 120 cepas, objeto de este estudio, fueron aisladas de muestras clínicas, procedentes de enfermos ingresados en el Hospital Universitario de Sevilla, y todas ellas tenían en común la característica de no metabolizar la glucosa / por vía fermentativa.

TABLA I
=====

-Cepas de Colección-

CEPAS BACTERIANAS	REFERENCIA
<u>Ps.aeruginosa</u>	ATCC 25619
<u>Ps.fluorescens</u>	ATCC 13525 -NCTC 10038
<u>Ps.putida</u>	ATCC 12633
<u>Ps.stutzeri</u>	ATCC 11607
<u>Ps.alcalígenes</u>	ATCC 14909 -NCTC 10367
<u>Ps.pseudoalcalígenes</u>	ATCC 17440
<u>Ps.cepacia</u>	ATCC 17759
<u>Ps.maltophilia</u>	ATCC 13637 -NCTC 10257
<u>Ps.putrefaciens</u>	-NCTC 10735
<u>Ps.testosteroni</u>	ATCC 11996 -NCTC 10698
<u>Ps.vesicularis</u>	-NCTC 1945
<u>Ps.acidovorans</u>	ATCC 15568
<u>Ps.diminuta</u>	ATCC 11568
<u>Acinetobacter calcoaceticus</u> (Mima)	NCIB 9019
<u>Alc.faecalis</u>	ATCC 21400
<u>Alc.faecalis (odorans)</u>	ATCC 15173 -NCTC 8582
<u>Alc.faecalis (denitrificans)</u>	ATCC 15554
<u>Flavobacterium meningosepticum</u>	ATCC 13253

TABLA II
=====

-Cepas control utilizadas en la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI).

-CEPAS BASTERIANAS-	-REFERENCIA-
<u>Staphylococcus aureus</u>	ATCC 25923
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	ATCC 27853
<u>Escherichia coli</u>	ATCC 25922

2.1.2.- ANTIBIOTICOS:

Se han utilizado polvo valorado de los antibio
ticos siguientes:

- AMPICILINA
- CEFUROXIMA
- CEFAZOLINA
- MOXALACTAM
- CEFOPERAZONA
- CEFOTAXIME
- CEFMETAZOL
- AZLOCILINA
- SISOMICINA
- AMICACINA
- GENTAMICINA
- TOBRAMICINA
- COLISTINA
- TRIMETOPRIM-SULFAMETOXAZOL

2.1.3.-MEDIOS DE CULTIVO:

2.1.4.-REACTIVOS:

-BRUCELLA AGAR SANGRE (BBL)

Polipeptona	20	gr.
Glucosa	1	gr.
Extracto Levadura	2	gr.
Cloruro Sódico	5	gr.
Bisulfito Sódico	0'1	gr.
Bacto Agar	15	gr.
Agua destilada	1.000	gr.

Este medio se suplementa con 5% de sangre de carnero.

-TRIPTICASA SOJA AGAR (DIFCO) con 0'2% de glucosa.

Bacto triptona	15	gr.
Peptona de Soja	5	gr.
Cloruro Sódico	5	gr.
Bacto-Agar	15	gr.
Agua destilada	1.000	cc.

Este medio se suplementa con 0'2% gr. de glucosa.

-AGAR CON TRIPLE AZUCAR E HIERRO (DIFCO)

Extracto de carne	3	gr.
Extracto de levadura	3	gr.
Peptona	15	gr.
Proteosa Peptona	5	gr.

Lactosa	10	gr.
Sacarosa	10	gr.
Dextrosa	1	gr.
Sulfatoferroso	0'2	gr.
Cloruro Sódico	5	gr
Tiosulfato Sódico	0'3	gr.
Agar	12	gr
Rojo Fenol	0'024	gr.
Agua destilada	1.000	cc.

-MEDIO OF BASAL (DIFCO)

Triptona	2	gr.
Cloruro Sódico	5	gr.
Fosfato Dipotásico	0'3	gr
Agar	2-3	gr
Agua destilada	1.000	cc.
Azul de Bromotimol	0'03-0'08	gr

-MEDIO OF BASAL CON 1% DE GLUCOSA

A 100 cc. de Medio OF Basal añadir aspticamente 10 cc. de una solución de Glucosa al 10%

Glucosa	10	gr.
Agua destilada	100	cc.

-MEDIO OF BASAL CON 1% DE MANITOL

A 100 cc. de Medio OF Basal, se le añaden asepticamente 10 cc. de una solución de Manitol al 10%

Manitol	10	gr.
Agua destilada	100	cc.

-MEDIO OF BASAL CON 1% DE LACTOSA .

A 100 cc. de Medio OF Basal, se le añaden asépticamente 10 cc. de una solución de lactosa al 10%

Lactosa	10	gr.
Agua destilada	100	cc.

-MEDIO OF BASAL CON 1% DE SACAROSA.

A 100 cc. de Medio OF Basal, se le añaden asépticamente 10 cc. de una solución de Sacarosa al 10%

Sacarosa	10	gr
Agua destilada	100	cc.

-MEDIO OF BASAL CON 1% DE MALTOSA.

A 100 cc. de Medio OF Basal, se le añaden asépticamente 10 cc. de una solución de Maltosa al 10%

Maltosa	10	gr.
Agua destilada	100	cc.

-AGAR SALMONELLA SHIGELLA (DIFCO)

Extracto de carne	5	gr.
Proteosa Peptona	5	gr.
Lactosa	10	gr.
Sales Biliares nº 3	8'5	gr.
Citrato Sódico	8'5	gr.
Tiosulfato Sódico	8'5	gr.

Citrato Férrico	1	gr.
Agar	13'5	gr.
Verde brillante	0'33	gr.
Rojo neutro	0'025	gr.
Agua destilada	1.000	cc.

-AGAR CITRATO DE SIMMONS. (DIFCO)

Sulfato de Magnesio	0'2	gr.
Fosfato Monoamónico	1	gr.
Fosfato dipotásico	1	gr.
Citrato Sódico	2	gr.
Cloruro Sódico	5	gr.
Agar	15	gr.
Azul de Bromo Timol	0'08	gr.
Agua destilada	1.000	cc.

-AGAR UREA DE CHRISTENSEN (MERCK)

Peptona	1	gr.
Cloruro Sódico	5	gr.
Fosfato Potásico	2	gr.
Glucosa	1	gr.
Agar	25	gr.
Rojo Fenol al 2%	6	gr.
Agua destilada	1.000	cc.

Añadir 10 cc. de una solución de urea (Llorente) estéril al 20%.

-CALDO DE NITRATO

Extracto de carne	3	gr.
Peptona	5	gr.
Nitrato Potásico	1	gr.
Agua destilada	1.000	cc.

Este caldo se suplementa con 0'3% de Agar, y queda un medio de cultivo semisólido que permite visualizar la formación de N_2 gas a partir del Nitrato Potásico.

-AGUA PEPTONA

Peptona	10	gr.
Agua destilada	1.000	cc.

-MEDIO PARA MOTILIDAD CON INFUSION DE GELATINA (DIFCO)

Caldo de infusión de corazón	15	gr.
Gelatina	53'4	gr.
Agar	3	gr.
Agua destilada	1.000	cc.

-MEDIO DE ESCULINA

Peptona	20	gr.
Cloruro Sódico	5	gr.
Esculina	0'5	gr.
Citrato Férrico Amoniacal	0'5	gr.

Agar	20	gr.
Agua destilada	1.000	cc.

-MEDIO BASE MOELLER DESCARBOXILASA

(DIFCO)

Peptona	5	gr.
Extracto de carne	5	gr.
Glucosa	0'5	gr.
Púrpura Bromocresol	0'1	gr
Rojo cresol	0'005	gr.
Piridoxal	0'005	gr.
Agua destilada	1.000	cc.

-MEDIOBASE MOELLER DESCARBOXILASA CON LISINA AL 1%

Medio base Moeller	100	cc.
L (+) Lisina dihidroclorada	1	gr.

-MEDIO BASE MOELLER DESCARBOXILASA CON ARGININA AL 1%

Medio base Moeller	100	cc.
L (+) Arginina Monohidroclorada	1	gr.

-MEDIO BASE MOELLER DESCARBOXILASA CON ORNITINA AL 1%

Medio base Moeller	100	cc.
L (+) Ornitina dihidroclorada.	1	gr.

-AGAR FENILALANINA

(DIFCO)

Extracto levadura	3	gr.
Fosfato dipotásico	1	gr.

Cloruro sódico	5	gr.
DL Fenilalanina	2	gr.
Agar	12	gr.
Agua destilada	1.000	cc.

-MEDIO CON 6'5% de CLORURO SODICO.

Infusión de cerebro y corazón	52	gr.
Glucosa	10	gr.
Cloruro sódico	60	gr.
Púrpura Bromocresol	20	gr.
Agar	25	gr.
Agua destilada	1.000	cc.

-MEDIO DNasa (DIFCO)

Triptona	20	gr.
Acido desoxirribonucleico	2	gr.
Cloruro sódico	5	gr.
Agar	15	gr.
Agua destilada	1.000	cc.

-CALDO MUELLER HINTON (DIFCO)

Infusión de carne	300	gr.
Casamino ácidos	17'5	gr.
Almidón soluble	1'5	gr.
Agua destilada	1.000	cc.

-AGAR MUELLER HINTON (DIFCO)

Infusión de carne	300	gr.
Casamino ácidos	17'5	gr.
Almidón soluble	1'5	gr.
Agar	17	gr.
Agua destilada	1.000	cc.

2.1.4.-REACTIVOS Y COMPUESTOS QUIMICOS:-

-AGUA OXIGENADA

-REACTIVO DE LA PRUEBA DE LA OXIDASA:

DISCOS DE DIMETIL-PARA-FENILENDIAMINA (DIFCO)

-REACTIVOS PARA DETECTAR LA REDUCCION DE
LOS NITRATOS

Reactivo A: alfa-naftil-amina 0'5 gr.
ácido Acético gla 100 cc.
cial 5 N al 30%

Reactivo B: Acido sulfanílico 0'83 gr.
Acido acético gla
cial 5 N al 30% 100 cc.

-REACTIVO DE KOVACS

Paradimetil amino benzaldehido 5 gr.
Alcohol amílico 75 cc.
Acido clorhidrico concentrado 25 cc.

-TIRAS DE GELATINA (DIFCO)

-CLORURO FERRICO al 10%, reactivo para detectar
la presencia de fenilalanina desaminasa.

- ACIDO CLORHIDRICO (MERCK)
- DISCOS DE ORTONITROFENIL- β -D-GALACTOPIRANOSIDO (ONPG)
- HIDROXIDO SODICO 1 N al 50% en METANOL (DIFCO)
- Hidróxido Sódico 40 gr (DIFCO)
- Agua destilada 500 cc.
- Metanol 500 cc. (MERCK)
- ACIDO CLORHIDRICO 6 N
- TRIFLUORURO DE BORO con METANOL (MERCK)
- HEXANO (MERCK)

2.2.-METODOS:

Sucesivamente a las 120 cepas estudiadas en el presente trabajo se les ha realizado una serie de pruebas bioquímicas, un análisis de los ácidos grasos estructurales por Cromatografía Líquido Gaseosa (CLG) y la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) a 16 antibióticos.

La conservación de las cepas se ha hecho por congelación en leche descremada al 20%, en congelador a -30° C /

El esquema de trabajo ha sido:

2.2.1.-Congelación y aislamiento

2.2.2.-Identificación bioquímica

2.2.3.-Identificación por Cromatografía Líquido Gaseosa.

2.2.4.-Determinación de las CMI a antibióticos.

2.21.-DESCONGELACION Y AISLAMIENTO:

La descongelación del vial de leche al 20% que contiene la cepa bacteriana a estudiar, se efectúa en un baño con agitación a 37°C, una vez conseguido esto, con una pipeta Pasteur estéril se inocula en una placa de Agar Brucella Sangre / para aislamiento y se incuba en aerobiosis a 37°C.

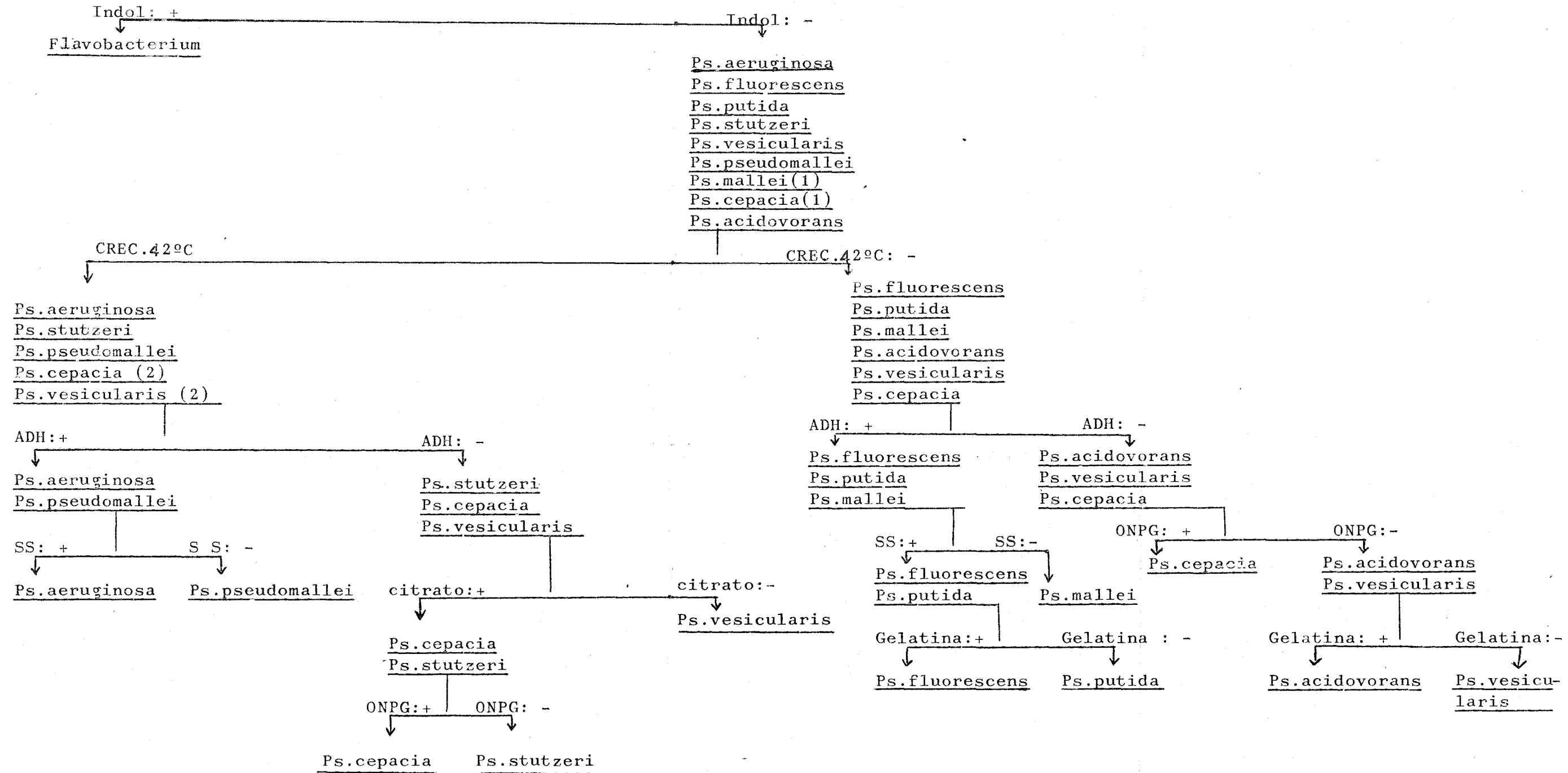
2.2.2.- IDENTIFICACION BIOQUIMICA:

Una vez realizada la descongelación y aislamiento de las 120 cepas bacterianas, se procede a hacer una identificación bioquímica según los esquemas 1 y 2 (11,27,46,52,97), utilizando las 25 pruebas bioquímicas siguientes:

- 1- Oxidación-Fermentación de la glucosa (OF glucosa)
- 2- Oxidación-Fermentación del manitol (OF manitol)
- 3- Oxidación-Fermentación de la maltosa (OF maltosa)
- 4- Oxidación-Fermentación de la lactosa (OF lactosa)
- 5- Oxidación-Fermentación de la sacarosa (OF sacarosa)
- 6- Producción de Catalasa
- 7- Producción de oxidasa
- 8- Crecimiento sobre agar Salmonella-Shigella (SS)
- 9- Utilización del citrato
- 10- Producción de Ureasa
- 11- Reducción de los nitratos.
- 12- Producción de Indol
- 13- Producción de ácido sulfhídrico en TSI(triple azúcar e hierro) (SH₂)
- 14- Producción de gelatinasa
- 15-Motilidad.

ESQUEMA DE IDENTIFICACION DE BGNNF -1

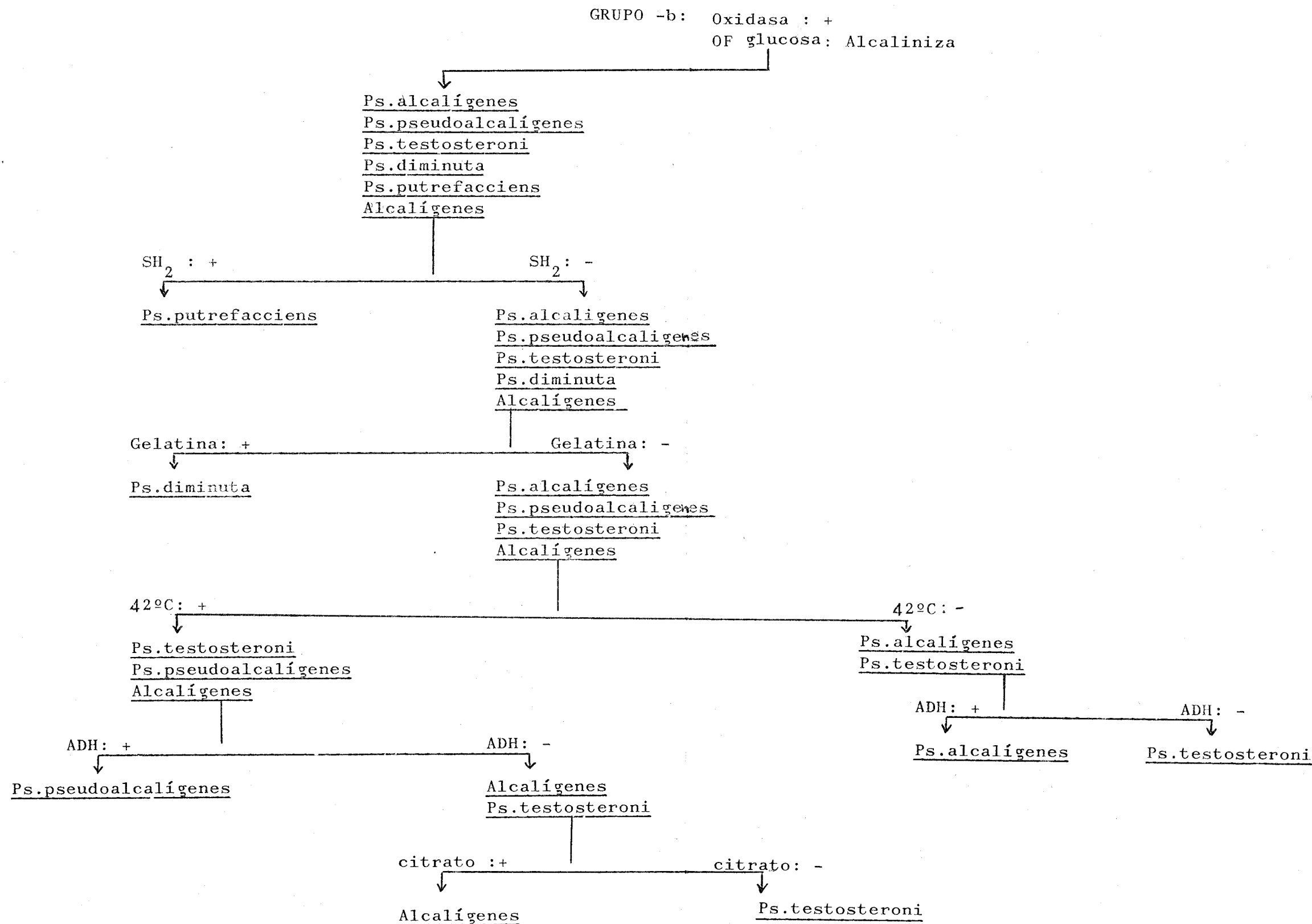
GRUPO- a: Oxidasa: +
OF glucosa: Oxida



(1)-Ps.mallei y Ps.cepacia son oxidasa variable.

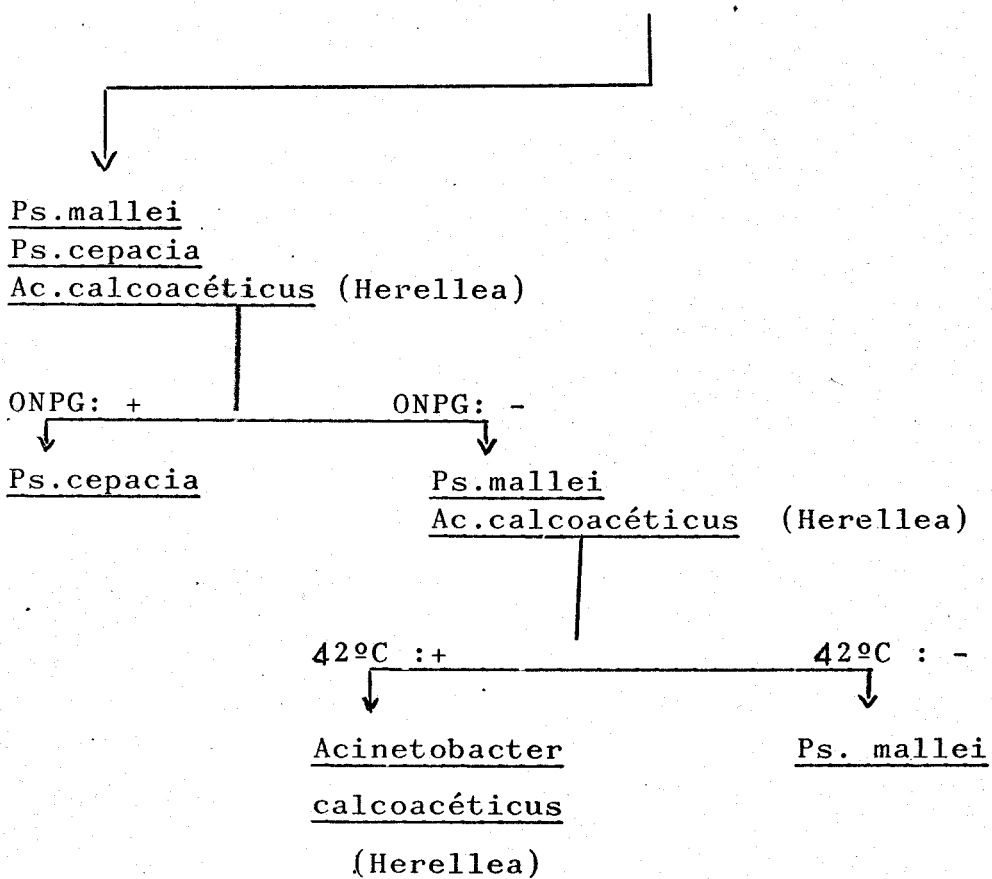
(2)-Ps.cepacia y Ps.vesicularis son variable en el crecimiento a 42°C

ESQUEMA DE IDENTIFICACION DE BGNNF -1- (Cont.)



ESQUEMA DE IDENTIFICACION DE BGNNF -1 (Cont.)

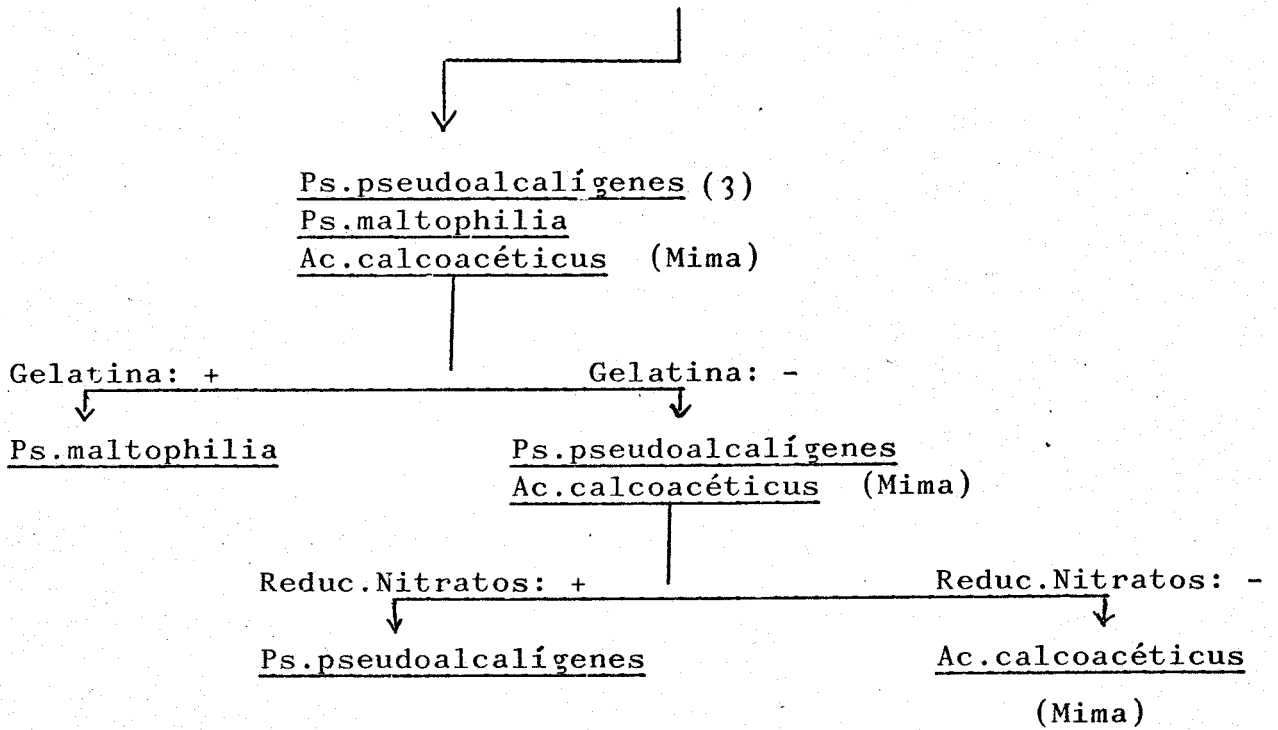
GRUPO- c: Oxidasa: -
OF glucosa: Oxida



ESQUEMA DE IDENTIFICACION DE BGNNF-1 (Cont.)

GRUPO-d: Oxidasa: -

OF glucosa: Alcaliniza



(3)= Prueba de la oxidasa variable.

"ESQUEMA DE IDENTIFICACION DE BGNNF -2"

	<u>Ps.aeruginosa</u>	<u>Ps.fluorescens</u>	<u>Ps.putida</u>	<u>Ps.stutzeri</u>	<u>Ps.alcaligenes</u>	<u>Ps.pseudoalcaligenes.</u>	<u>Ps.mallei</u>	<u>Ps.pseudomallei</u>	<u>Ps.cepacia</u>	<u>Ps.testosteroni</u>	<u>Ps.vesicularis</u>	<u>Ps.acidovorans</u>	<u>Ps.maltophilia</u>	<u>Ps.diminuta</u>	<u>Ps.putrefaciens</u>
OF glucosa:oxida	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	v
OF manitol:oxida	v	v	v	v	-	-	v	+	v	-	-	+	-	-	-
OF lactosa:oxida	-	v	v	-	-	-	v	+	v	-	-	-	-	-	-
OF maltosa:oxida	-	v	v	v	-	-	v	+	v	-	+	-	-	-	-
OF sacaro sa:oxida	-	v	v	-	-	-	-	+	v	-	-	-	-	-	-
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidasa	+	+	+	+	+	v	v	+	v	+	+	+	-	+	+
Crec.sobre SS	+	+	+	v	v	v	v	-	-	v	-	v	v	-	v
Citrato	+	+	+	+	v	v	-	v	+	-	-	v	v	-	-
Urea	v	v	v	v	-	v	-	v	v	-	v	v	-	-	v
Reduc. de Nitratos	+	- gas	v	+	v	+	+	+	v	v	-	v	v	-	+
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Prod.deSH ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Gelatina (Hidrol)	v	+	-	v	-	-	+	+	v	-	+	-	+	+	v
Motilidad	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Crec. a 42°C	+	-	-	+	-	+	-	+	v	v	v	-	v	v	v
Esculina (Hidrol)	-	-	-	-	-	-	-	-	v	-	-	-	v	-	v
LDC	-	-	-	-	-	-	-	-	v	-	-	-	v	-	-
ADH	+	+	+	-	+	+	+	+	v	-	-	-	-	-	-
ODC	-	-	-	-	-	-	-	-	v	-	-	-	v	-	-
Fenilalanina desaminasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tolerancia 6'5% ClNa	-	-	-	v	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	v
DNasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
ONPG	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	v	-	-

ESQUEMA DE IDENTIFICACION DE BGNNF-2 (Cont.)

	<u>Ac. calcoacéticus</u> (Mima)	<u>Ac. calcoacéticus</u> (Herellea)	<u>Alc. faecalis</u>	<u>Alc. faecalis</u> odorans.	<u>Alc. faecalis</u> denitrificans	<u>Flavobacterium</u> <u>meningosepticum</u>
OF glucosa	-	+	-	-	-	+
OF manitol	-	v	-	-	-	v
OF lactosa	-	v	-	-	-	v
OF maltosa	-	-	-	-	-	+
OF sacarosa	-	-	-	-	-	-
Catalasa	+	+	+	+	+	+
Oxidasa	-	-	+	+	+	+
Crec. sobre SS.	v	v	v	+	v	-
Citrato	v	v	+	+	+	v
Urea	v	v	v	v	v	-
Reducc. de nitratos	-	-	v	gas	gas	-
Indol	-	-	-	-	-	+
Prod. de SH ₂	-	-	-	-	-	-
Gelatina (Hidrol)	-	v	-	-	-	+
Motilidad	-	-	+	+	+	-
Crec. a 42°C	v	+	+	+	+	v
Esculina (Hidrol)	-	-	-	-	-	+
LDC	v	v	-	-	-	-
ADH	v	+	-	-	-	-
ODC	-	-	-	-	-	-
Fenilalanina desaminasa	-	-	-	-	v	-
Tolerancia 6'5% CLNa	-	-	-	v	-	-
DNasa	-	-	-	-	-	v
ONPG	-	-	-	-	-	+

(+) = Cuando más del 90% de las cepas dan / la reacción positiva.

(-) = Cuando más del 90% de las cepas dan / la reacción negativa.

(v) = Cuando hay un porcentaje variable de cepas que dan la prueba ó (+) ó (-).

Hidrol = hidrólisis

Oxida = oxidación

Reduc = Reducción

Prod. = Producción

Crec. = Crecimiento

- 16- Capacidad de crecimiento a 42°C
- 17- Hidrólisis de la Esculina
- 18- Producción de Lisina descarboxilasa (LDC)
- 19- Producción de arginina dehidrolasa (ADH)
- 20- Producción de ornitina descarboxilasa (ODC)
- 21- Producción de fenilalanina desaminasa (APP)
- 22- Tolerancia a 6'5% de ClNa.
- 23- Producción de desoxirribonucleasa (DNasa)
- 25- Sensibilidad a la penicilina (5 U.I)

1.-PRUEBA DE OXIDACIÓN-FERMENTACION DE LA GLUCOSA:(26)

Esta prueba se basa en determinar si un microorganismo va a actuar sobre la glucosa por vía oxidativa o por vía fermentativa.

El medio utilizado es el OF basal (medio oxidativo-fermentativo) con un 1% de glucosa, según HUGH y LEIFSON (47) es particularmente útil para la detección de pequeñas cantidades de ácidos producidos por metabolismo oxidativo.

Se inoculan dos tubos por cada microorganismo problema en picadura de tal forma que uno de ellos se tapa con parafina líquida con el fin de conseguir un ambiente anaerobio.

-Incubación: 2 a 4 días a 37°C.

-Lectura: si hay metabolización de la glucosa se van a producir ácidos que se manifiestan por un cambio de color del indicador de pH que es el azul de bromotimol que pasa de color verde a amarillo. Esta metabolización puede ser:

-por vía oxidativa: tubo abierto (amarillo)
tubo cerrado (verde)

-por vía fermentativa: tubo abierto (amarillo)
tubo cerrado (amarillo)

Si la bacteria no es capaz de metabolizar el azúcar ni por vía fermentativa ni oxidativa, el tubo abierto puede aparecer de color azul debido a la alcalinización del medio, debida a una utilización de las peptonas, y el tubo cerrado se mantiene verde y no se observa crecimiento alguno.

2-PRUEBA DE LA OXIDACION-FERMENTACION DEL MANITOL:(27)

Esta prueba es exactamente igual a la anterior, lo único que cambia es el hidrato de carbono utilizado, que en este caso es el manitol. El medio utilizado, por tanto será el OF basal con un 1% de manitol.

3-PRUEBA DE LA OXIDACION-FERMENTACION DE LA MALTOSA:(27)

El fundamento y técnica es igual a las dos pruebas anteriores con la única diferencia de que en este caso el hidrato de carbono utilizado es la maltosa. El medio de cultivo es el OF basal con un 1% de maltosa.

4-PRUEBA DE LA OXIDACION-FERMENTACION DE LA LACTOSA (27)

Esta prueba es igual a las anteriores cambiando sólo el carbohidrato que en este caso es la lactosa. El medio de cultivo es el OF basal con un 1% de lactosa .

5-PRUEBA DE LA OXIDACION-FERMENTACION DE LA SACAROSA: (27)

Igual que en las anteriores sólo cambia el sustrato hidrocarbonado, siendo en este caso la sacarosa. El medio es el OF basal con un 1% de sacarosa.

6-PRUEBA DE LA CATALASA(7) :

Se basa en la investigación del enzima catalasa. Es ésta una enzima por medio de la cual los microorganismos son capaces de reducir el peróxido de hidrogeno (H_2O_2) produciendo / agua (H_2O) y oxígeno libre.

Tecnica: Se basa en la adición de unas gotas de peróxido de hidrogeno sobre un cultivo crecido en un medio cualquiera que no contenga sangre.

Lectura: Se hace en pocos segundos y la positividad de la prueba se manifiesta por la aparición de burbujas que indican la liberación del oxígeno.

7-PRUEBA DE LA OXIDASA:

En esta prueba se investiga la producción del enzima oxidasa, que en presencia de aire actua sobre ciertas aminas / aromáticas produciendo complejos coloreados. Dicha enzima sólo la

van a producir aquellos microorganismos con citocromo, C, es decir los microorganismos aerobios

Técnica: Se usa un reactivo que es la paradimetilfenilendiamina impregnada en unos discos de papel absorbente (Pag. 17) con los cuales tomamos una colonia del microorganismo problema observándose un viraje de color hacia el púrpura, lo que indica la positividad de la prueba.

8-CRECIMIENTO SOBRE AGAR SALMONELLA-SHIGELLA: (97)

Con esta prueba pretendemos determinar la capacidad de crecimiento de un microorganismo sobre este medio de cultivo incubado durante 2 a 4 días a una temperatura de 37°C.

9-UTILIZACION DEL CITRATO: (7)

Consiste en determinar si un microorganismo es capaz de utilizar el citrato como única fuente de carbono. El medio utilizado es el agar citrato de Simmons (Pag. 13)

-Técnica: Inocular en el medio de cultivo el microorganismo problema e incubar de 2 a 4 días a 37°C.

-Lectura: Si el microorganismo ha sido capaz de utilizar el citrato como única fuente de carbono se produce una alcalinización en el medio de cultivo que se manifiesta por un cambio de color del indicador (azul de bromotimol) de verde a azul.

La alcalinización se produce por el paso de citrato a oxalacetato y de este a piruvato y CO₂, en exceso. Este CO₂

reacciona con el Na y el agua del medio, produciéndose carbonato sódico (CO_3Na_2), compuesto, que es suficientemente alcalino para producir el cambio de pH que condiciona el viraje de color del indicador.

10-PRUEBA DE LA UREASA (7)

En esta prueba se investiga la capacidad de producción de la enzima ureasa. Para ello utilizamos como medio de cultivo el agar urea de Christensen (Pag. 13) que lleva entre otros componentes urea.

-Técnica: Se siembra la bacteria problema en el medio de cultivo y se incuba a 37°C durante 2 a 4 días.

-Lectura: Si la bacteria produce ureasa ésta va a actuar sobre la urea del medio de cultivo produciéndose a partir de ella amoníaco (NH_3), produciéndose una alcalinización, fenómeno éste que se manifiesta por un viraje del indicador de pH (rojo fenol) que pasa de color naranja a rojo.

11-INVESTIGACIÓN DE LA REDUCCION DE LOS NITRATOS (27)

En esta prueba vamos a ver la capacidad de un microorganismo para reducir los nitratos a nitritos o a nitrogénog-
-gas. El medio de cultivo utilizado es el caldo nitrato de Difco suplementado con un 0'3% de agar (Pag.14) quedando así un medio semisólido.

-Técnica: El microorganismo se siembra en picadura.

-Incubación: a 37°C de 2 a 4 días.

Lectura: Se hace añadiendo dos reactivos; el reactivo A (ácido sulfanílico) y el reactivo B (alfa-naftilamina). (Pag. 17). Puede ocurrir:

a.- Que aparezca un color rojo intenso lo que indica que la reacción es positiva, ya que los nitratos se han reducido a nitritos y van a reaccionar con el ácido sulfanílico y con la alfa-naftilamina dando un complejo de color rojo que es el para-sulfobenzeneazo-alfanaftilamina.

b.- Que no aparezca color alguno. Esto indica, bien que los nitratos no se han reducido o bien que la reducción ha sido total hasta la producción de nitrógeno-gas (denitrificación). Para ver cual de estos dos fenómenos es el que ha ocurrido hay que añadir al medio zinc, que actúa como catalizador de la reacción, de tal forma que si aparece entonces color rojo la reacción es negativa, mientras que si tras la adición de zinc sigue sin aparecer este color rojo, indica que la reducción ha sido total hasta nitrógeno-gas (denitrificación positiva).

12-PRUEBA DEL INDOL (7)

Por esta prueba investigamos la producción del indol a partir del triptófano, fenómeno que ocurre cuando un microorganismo es capaz de producir el enzima triptófano desaminasa. El medio de cultivo utilizado es un agua de peptona (Pag. 14) que contenga triptófano a la cual se añade el microorganismo problema, y se incuba a 37°C durante 2 y 4 días, realizándose la lectura, añadiendo el reactivo de Kovacs (Pag. 17) que /

va a reaccionar con el indol dando un color rojo en el caso de que esta prueba sea positiva.

13-INVESTIGACION DE LA PRODUCCION DE SULFHIDRICO EN EL MEDIO TRIPLE AZUCAR E HIERRO (TSI) (27)

Mediante esta prueba determinamos la capacidad de un microorganismo para producir sulfhídrico a partir del tiosulfato sódico presente en el medio de cultivo (TSI), que se manifiesta por la aparición de un precipitado de color negro que se debe a la producción de sulfuro ferroso (SFe) como resultado de la reacción del SH_2 con el sulfato ferroso ($\text{SO}_4 \text{ Fe}$) presente / asimismo en el medio de cultivo.

14-INVESTIGACION DE LA PRODUCCION DE GELATINA:(7)

Se basa en detectar la capacidad de un microorganismo para producir el enzima galatinasa capaz de hidrolizar la gelatina.

-Técnica: Consiste en introducir unas tiras de gelatina (Difco) en una suspensión densa en agua destilada del microorganismo problema. La incubación se hace a 37°C durante 4 días y la lectura se realiza a los 2 y 4 días observando la existencia de un aclaramiento de la tira de gelatina lo que indica la positividad de la prueba.

15-PRUEBA DE LA MOTILIDAD (97)

Por esta prueba vamos a determinar si el microorganismo es o no móvil. Para ello usamos el medio GI motilidad (Pag. 14)

Técnica: Consiste en sembrar el microorganismo que vamos a estudiar en picadura. La incubación se realiza a 37°C / durante 2 y 4 días.

Lectura: Se hace observando la existencia de crecimiento fuera de la línea de la picadura, lo que indica que efectivamente el microorganismo es móvil.

La motilidad puede visualizarse muy bien, en el medio semisólido, que utilizamos para investigar la reducción de / los nitratos ya que, las bacterias Gram negativas no fermentadoras, en presencia de nitratos pueden crecer en anaerobiosis por poder utilizar el nitrato como último aceptor de electrones en su cadena respiratoria. (11)

16-CRECIMIENTO A 42°C:

Con esta prueba investigamos la capacidad de determinados microorganismos para crecer a dicha temperatura. El medio de cultivo es el agar trypticasa-soja agar (72). La incubación se hace a 42°C durante 4 días y la lectura se realiza observando si existe o no crecimiento.

17-HIDROLISIS DE LA ESCULINA (7)

Se investiga la capacidad de un microorganismo para hidrolizar la esculina a esculetina y glucosa, lo cual se manifiesta por la aparición de un color marrón oscuro debido a la / reacción de la esculetina con el citrato férrico presente en el medio de cultivo utilizado (Pag. 14) La incubación se hace a / 37°C durante 4 días, al cabo de los cuales se realiza la lectura de la prueba.

18-INVESTIGACION DE LA LISINA DESCARBOXILASA (27)

Se investiga la producción del enzima lisina descarboxilasa capaz de descarboxilar la lisina a cadaverina. El me--dio de cultivo utilizado es el medio base MOeller descarboxilasa con un 1% de 1-(+)-lisina.

Técnica: consiste en inocular el microorganismo / problema e incubarlo a 37°C durante 4 días.

Lectura: Se realiza por la observación de un color púrpura que indica la alcalinización del medio debida a la producción de cadaverina que produce un viraje del indicador de violeta a púrpura.

19-INVESTIGACION DE LA ARGININA DEHIDROLASA (27)

Por esta prueba determinamos la capacidad de un microorganismo para actuar sobre la arginina produciendo agmatina mediante la producción de la enzima arginina dehidrolasa. El medio de cultivo utilizado es el mismo de la prueba anterior pero con la diferencia de que en este caso el aminoácido es la arginina. La lectura es igual que en la prueba anterior.

20-INVESTIGACION DE LA ORNITINA DESCARBOXILASA (27)

Por esta prueba vamos a determinar la producción del enzima ornitina descarboxilasa, mediante la cual los microorga--nismos van a ser capaces de actuar sobre la L-ornitina produciéndose putrescina. El medio de cultivo utilizado es el mismo que / en las dos pruebas anteriores pero el aminoácidos es la L-ornitina. La técnica y lectura de la prueba es igual que en las dos / anteriores.

21-PRUEBA DE LA FENILALANINA DESAMINASA (7)

Por esta prueba determinamos la capacidad de un microorganismo para desaminar la fenilalanina, produciendo ácido fenilpirúvico. Esta reacción es posible gracias al enzima fenilalanina desaminasa. El medio de cultivo utilizado es el agar fenilalanina.

-Técnica: Consiste en sembrar en superficie el microorganismo problema e incubar a 37°C durante 4 días.

-Lectura: Se hace añadiendo cloruro férrico al 10% al medio crecido que reacciona con el ácido fenilpiruvico produciendo un compuesto de color verde que indica que la reacción es positiva.

22-TOLERANCIA A 6'5% DE ClNa (97)

Esta prueba se basa en la determinación de la capacidad de crecimiento de un microorganismo, en un medio con una elevada concentración de ClNa (Pag. 16) Se realiza una siembra en / superficie incubando a 37°C durante 4 días.

Lectura: Si hay crecimiento se observa la aparición de un color amarillo como consecuencia de un cambio de pH que hace que el indicador (púrpura de bromocresol) vire a amarillo.

23-PRUEBA DE LA DESOXIRRIBONUCLEASA (DNasa) (7,27)

Se basa en demostrar la producción del enzima desoxirribonecleasa. Es ésta una enzima extracelular capaz de romper el ácido desoxirribonucléico. El medio de cultivo utilizado es el medio DNasa (Difco) (Pag. 16).

-Técnica: Consiste en sembrar una estria sobre una placa Petri. La incubación es a 37°C durante 4 días.

-Lectura: Se realiza añadiendo a la placa Petri ClH₁N. La positividad de la prueba se manifiesta por la aparición de una zona de aclaramiento alrededor de la estria.

24-PRUEBA DE LA β -GALACTOSIDASA (ONPG) (27)

Se basa en demostrar la presencia de beta-galactosidasa que es una enzima que va a actuar sobre la lactosa desdoblándola en galactosa y glucosa. La detección de este enzima se hace por la adición de ortonitrofenil β -D-galactopiranosido a una suspensión densa del microorganismo problema procedente de un cultivo sobre medio con lactosa, en agua destilada. Se incubaba a 37°C de 20 minutos a 24 horas.

-Lectura: Se realiza observando la aparición de un color amarillo que indica la presencia de ortonitrofenol, que es un compuesto que se produce por la reacción del ortonitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG) con el agua en presencia de la beta-galactosidasa. Esto indica la positividad de la prueba.

La lectura de todas estas pruebas se hizo a las 48 horas y 96 horas, sin observarse cambios significativos en ambas lecturas.

25-SENSIBILIDAD A LA PENICILINA (5 UI) (11)

Consiste en realizar una siembra sobre Brucella sangre en una placa Petri de forma que quede un crecimiento semi-confluyente. Colocar un disco de 5 UI de penicilina e incubar a

37°C durante 24 horas.

-Lectura: La aparición de un halo de inhibición del crecimiento alrededor del disco indica la sensibilidad del microorganismo del antibiótico ensayado.

2.2.3.-ANALISIS DE LOS ACIDOS GRASOS CONSTITUYENTES POR CROMATO- GRAFIA LIQUIDO GASEOSA.

A todas las cepas bacterianas se les ha sometido a un análisis por cromatografía líquido gaseosa, con el fin de determininar los ácidos grasos componentes estructurales de dicho grupo de bacterias. Para este fin hemos seguido el Método de MOSS y DEES / (1975) (64) con algunas modificaciones.

1.3.1.-Condiciones de cultivo:

Las cepas bacterianas descongelados y aisladas se subcultivan en placas de Agar Tripticasa soja con un 0'2% de glucosa

1.3.2.-Saponificación:

Se parte de un cultivo de 18 horas sobre placas de /
Trypticasa Soja Agar con 0'2% de glucosa.

Se toma toda la masa bacteriana de la superficie de la placa y se suspende en 5 ml. de Na OH 1N en 50% de metanol. Esta suspensión se somete a 100°C durante 1 hora. Dejar enfriar y / añadir ClH 6 N hasta conseguir un pH= 2.

1.3.3.-Esterificación:

Posteriormente se añaden 5 ml. de F₃B-metanol al / 20% (v/v) (Pag. 18) y se vuelve a calentar a 80°C durante 5 minutos, así conseguimos obtener los esteres metílicos de los ácidos grasos.

1.3.4.-Extracción:

Los esteres metílicos de los ácidos grasos son extraídos por adición de 10 ml. de Hexano, agitación durante 20 segundos, evaporar en rotavapor Buchi EE 130 a sequedad y reconstituir con Hexano hasta (0'2 ml.).

Se puede añadir SO₄ Na₂ para absorber la humedad.

Las muestras preparadas se conservan a menos 20°C. Una vez extraídos los esteres metílicos de los ácidos grasos constituyentes por el método expuesto se procede a realizar el análisis / cromatográfico, inyectando 5 microlitros de la muestra.

1.3.5.-Condiciones de trabajo:

- Cromatografo Hewlett Packard modelo 5880-A.
- Integrador Hewlett Packard.
- Columna de acero inoxidable de 6 pies de longitud / empaquetada con un relleno de 10% de OV-17 metil fenil silicna sobre Chromosorb W HP, 80/100 mallas.
- Gas portador: Nitrógeno.
- Detector de ionización de llama.

-Inyector 270°C

-Temperaturas de operación:

-Detector 270°C

-La temperatura inicial de la columna fue de 190°C. durante 5 minutos después de la inyección de la muestra, y la final de 220°C, la razón de programación fué de 2°C/min.

-Atenuación 2⁶

-Velocidad del papel 0'5 cm./min.

Los picos de los cromatogramas obtenidos se identificaron por comparación con los tiempos de retención de los correspondientes a la obtenidos con patrones de gran pureza de / esterres metílicos de ácidos grasos (Applied Sciences Laboratories y Supelco Inc.). El tiempo de retención, el área y el % / del área de los picos nos lo dá el integrador directamente.

Para evitar los errores de medida hemos repetido la la cromatografía líquido gaseosa de cada cepa en 5 ocasiones, / tomando como concentración de los distintos ácidos grasos la media aritmética de las cinco observaciones realizadas, expresadas en %

$$X = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n}$$

n=5

El área del pico representa la concentración del ácido graso caracterizado por dicho pico. Al medio de cultivo también se le hizo CLG por el método descrito, para determinar su composición en ácidos grasos y así ver las posibles interferencias entre él y las cepas problemas, cultivadas sobre dicho medio.

PATRONES DE ESTERES METILICOS DE ACIDOS GRASOS PARA LA CLG :

-Metil decanoato	10:0	(Supel. Inc)
-Metil undecanoato	11:0	"
-Metil-2-hidroxidecanoato	2-OH 10:0	"
-Metil dodecanoato	12:0	"
-Metiltridecanoato	13:0	"
-Metil 2 hidroxi dodecanoato	2-OH 12:0	"
-Metil 3 hidroxi dodecanoato	3-OH 12:0	"
-Metil tetradecanoato	14:0	"
-Metil 12 metil tetradecanoato	a 15:0	"
-Metil pentadecanoato	15:0	"
-Metil 2 hidroxi tetradecanoato	2-OH 14:0	"
-Metil 3 hidroxi tetradecanoato	3-OH 14:0	"
-Metil hexadecanoato	16:0	"
-Metil 14 metil hexadecanoato	a 17:0	"
-Metil dl-cis 9,10-metil hexadecanoato	17:Δ	"
-Metil 2 hidroxi hexadecanoato	1-OH 16:0	"
-Metil estearato	18:0	"
-19 Metil cis 9,10 metilenoctadecanoato	19:Δ cis	(Appli. Sci.)
-19 Metil trans 9, 10 metilen octadecanoato.	19:Δ trans	"
-20 Metil cis,cis, 9,10 y 12,13 Dimetilen octadecanoato.	20:Δ	"

2.2.4.-DETERMINACION DE SENSIBILIDAD A ANTIBIOTICOS:

A todas las cepas estudiadas en el presente trabajo se les ha determinado las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) frente a 16 antibióticos. (Pag. 9)

Se define concentración mínima inhibitoria como la / más baja concentración de antibiótico capaz de inhibir el crecimiento de un inóculo de 10^5 unidades formadoras de colonias / (UFC) por ml. Este inóculo se obtiene a partir de un cultivo de 18 horas, la CMI se expresa en $\mu\text{g/ml}$ ó gr/l .

Se ha seguido el método de dilución en agar WASHINGTON II y BARRY, 1.974.(103). Este método nos permite determinar la CMI dentro de un amplio rango de diluciones de antibiótico, simultáneamente a un gran número de microorganismos.

Para la realización de esta técnica, empleamos un aparato replicador descrito por STEERS y cols 1.959 (95) con él pueden ser inoculadas simultaneamente 36 cepas bacterianas en la superficie de una placa de cultivo sólido Agar Mueller Minton (pag. 7).

Preparación del inóculo: 3-4 colonias de un cultivo de 18 horas en Agar Brucella (Pag. 10) y se incuba en un caldo nutritivo (Caldo Mueller Hinton) (Pag. 16) y se incuba hasta alcanzar aproximadamente 10^8 unidades formadoras de colonias por / ml.

Las placas conteniendo las diluciones seriadas de antibiótico son inoculadas con 0'001 ml. (3×10^5 bacterias) mediante el replicador de Steer. Se incuban a 35°C durante 18 horas.

Los controles realizados son los siguientes: al prin
cipio y al final de cada serie de placas con cada antibiótico /
se inocular una placa sin antibiótico, para asegurarnos que han
sido inoculados todos los pocillos y que todas las bacterias /
eran viables se emplean ~~estirpes~~ estirpes con sensibilidad conocida frente
te a los distintos antibióticos para detectar posibles errores.
en las diluciones de los mismos (Pag. 8).

RESULTADOS

3.1.-RESULTADOS DE LA IDENTIFICACION BIOQUIMICA:

Los resultados obtenidos de la identificación por la aplicación de 25 pruebas bioquímicas según los esquemas / de identificación: MANUAL DE BERGEY (11) Mc.FADDIN (28), TATUM y cols.(97//), HUGH y GILARDI (46) y KING (52) nos han permitido establecer los siguientes grupos :

GRUPO A.- Incluye a 31 cepas (25'8%) que / fueron identificadas como Ps.aeruginosa. De todas ellas, el 100% oxidaron la glucosa en el medio OF glucosa al 1%. Sólo 6 cepas / (19'3%) oxidaron el manitol en el medio OF manitol al 1%. El 100% alcalizaron el OF Lactosa, OF maltosa y OF sacarosa.

La totalidad de las cepas dieron positivas las siguientes pruebas bioquímicas: Producción de catalasa, oxidasa

arginina dehidrolasa, nitrato reductasa, así como el crecimiento en TSA a 42°C, crecimiento sobre el medio S-S y crecimiento sobre agar citrato como única fuente de carbono. El 100% de las cepas fueron móviles.

La producción de Indol, hidrólisis de la esculina, producción de ornitina descarboxilasa, producción de DNasa, producción de β -galactosidasa, producción de fenil alanina desaminasa, producción de SH₂ y el crecimiento en 6'5% de CLNa, fueron negativas para la totalidad de las cepas.

10 cepas (32'2%) dieron positiva la prueba de la Urea, 21 (67'7%) hidrolizaron la gelatina y sólo una cepa (3'2%) produjo lisina descarboxilasa. (Tabla nº III).

GRUPO B.- Dentro de este grupo incluimos 8 cepas (6'6%) que fueron identificadas como Ps.fluorescens de las cuales el 100% oxidaron el OF con 1% de glucosa, mientras que sólo el 25% oxidaron el OF con 1% de manitol. La totalidad de las cepas alcalinizaron el OF con lactosa, maltosa y sacarosa.

En el 100% de los casos dieron positivas las siguientes pruebas bioquímicas: Producción de catalasa, oxidasa, gelatinasa, arginina dehidrolasa, así como el crecimiento sobre el medio S-S y sobre agar citrato. También en este grupo todas fueron móviles.

Sólo el 25% de las cepas hidrolizaron la Urea.

La producción de indol, reducción de los nitratos, producción de SH₂, hidrólisis de la esculina, producción de lisina descarboxilasa, ornitina descarboxilasa y de fenil alanina

na desaminasa, así como producción de desoxirribonucleasa y crecimiento a 42°C fueron negativos en todas las cepas ensayadas (Tabla III).

GRUPO C.- En él incluimos a 11 cepas (9'1%) que / fueron identificadas como Pseudomonas pútida. De ellas, todas oxidaron el OF con un 1% de glucosa, mientras que sólo una (9%) oxidó el OF con un 1% de manitol. La totalidad alcalinizó el OF maltosa, OF lactosa y el OF sacarosa.

En el 100% de los casos dieron negativas las pruebas: Producción de indol, sulfhídrico, lisina descarboxilasa, ornitina descarboxilasa, fenilalamina desaminasa, desoxirribonucleasa β-galactosidasa, hidrólisis de la gelatina, así como el crecimiento a 42°C y la tolerancia a 6'5% de ClNa.

2 de las cepas (18'2%) hidrolizaron la urea y 3 / (43%) redujeron los nitratos. (Tabla nº III).

GRUPO D.- Este grupo abarca 6 cepas (5%) que se / identificaron como Ps.alcalígenes, y todas alcalinizaron el OF glucosa, OF manitol, OF lactosa, OF sacarosa y OF maltosa.

Las siguientes pruebas bioquímicas fueron positivas para la totalidad de las cepas: Producción de catalasa, oxidasa, nitrato reductasa y arginina dehidrolasa. Fué también común a / todas la motilidad.

En el 100% de los casos la respuesta fué negativa ante las siguientes pruebas: Producción de ureasa, indol, SH₂, gelatinasa, fenilalanina desaminasa y desoxirribonucleasa, al igual que la hidrólisis de la esculina, el crecimiento a 42°C

y el crecimiento en 6'5% de ClNa.

5 cepas (83%) crecieron sobre agar citrato, mientras que 3 (50%) crecieron sobre agar SS. (Tabla nº IV).

GRUPO E.- En este grupo se han incluido a 3 cepas / (2'5%) de las 120 ensayadas que se han identificada como Ps.ce-
pacia y la totalidad oxidaron el OF glucosa y alcanizaron el OF manitol, OF maltosa, OF lactosa y OF sacarosa.

Asimismo, el 100% de las cepas dieron positivas las / pruebas: Producción de catalasa, arginina dehidrolasa y β -galactosidasa y también la motilidad y el crecimiento en agar citrato.

2 cepas (66'6%) dieron positiva la producción de oxidasa, mientras que sólo una cepa (33'3%) dió positivo el crecimiento a 42°C, así como la reducción de los nitratos, hidrólisis de la gelatina y esculina y la producción de la lisina descarboxilasa, y ornitina descarboxilasa.

El resto de las pruebas fueron negativas para la totalidad de las cepas (Tabla nº IV).

GRUPO F.- Incluye a 8 cepas (6'6%) que fueron tipadas bioquímicamente como Ps. maltophilia, de las que el 100% alcalinizaron el OF glucosa, OF maltosa, OF manitol, OF sacarosa y OF lactosa.

Todas las cepas dieron positiva la producción de catalasa, desoxirribonucleasa, β -galactosidasa, así como la motilidad

Sólo 3 cepas, (37'5%) crecieron en agar SS, mientras que 7 (87'5%) dieron positivas la hidrólisis de la gelatina, hidrólisis de la esculina, reducción de los nitratos, crecimiento sobre agar citrato y crecimiento a 42°C. 2 cepas 20% produjeron lisina descarboxilasa y ornitina descarboxilasa.

Al resto de las pruebas bioquímicas respondieron negativamente todas las cepas. (Tabla nº IV).

GRUPO G.- Tan sólo 3 cepas (2'5%) se tiparon como / Ps. putrefaciens. Todas ellas alcalinizaron el OF lactosa, OF maltosa, OF sacarosa y OF manitol. Sólo una cepa (33'3%) oxidó el OF glucosa.

Todas las cepas dieron positivas las reacciones: Producción de oxidasa, catalasa, SH₂, nitrato reductasa, desoxirribonucleasa, así como la motilidad. Una cepa (33'3%) creció sobre / agar SS y citrato e hidrolizó la gelatina. El crecimiento a 42°C y la hidrólisis de la esculina fue positiva en el 66'6% de las cepas de este grupo. (Tabla IV)

GRUPO H.- Incluimos en él a 3 cepas (2'5%) que se / identificaron como Ps. stutzeri de las cuales, todas oxidaron el OF 1% glucosa, mientras que el OF manitol lo oxidó sólo una cepa. Todas alcalinizaron el OF lactosa, sacarosa y maltosa.

En La totalidad de las cepas fué positivo su comportamiento ante las pruebas bioquímicas: producción de catalasa, oxidasa, nitrato reductasa, así como la motilidad, el crecimiento a 42°C, crecimiento en agar SS y crecimiento en agar citrato.

Una cepa (33'3%) dió positiva la prueba de la urea y la de la hidrólisis de la gelatina.

El 100% de las cepas respondieron negativamente al resto de las pruebas. (Tabla nº V).

GRUPO I:- Incluye 8 cepas (5'8%) que se identificaron como Ps pseudoalcaligenes de las cuales todas alcalinizaron el OF glucosa, OF manitol, OF maltosa, OF sacarosa y OF lactosa.

El 100% dió respuesta positiva a: la producción de catalasa y arginina dehidrolasa así como la motilidad y el crecimiento en agar citrato.

6 cepas (75%) dieron positiva la prueba de la oxidasa y el crecimiento a 42°C, sólo una (12'5%) hidrolizó la urea.

2 (25%) crecieron sobre agar SS y 5 (62'5%) fueron capaces de reducir nitratos.

El resto de las pruebas fueron negativas para la totalidad de las cepas. (Tabla V)

GRUPO J: 15 cepas (12'5%) se identificaron bioquímicamente como Acinetobacter calcoacéticus var Mima. El 100% de las cepas alcalinizaron el OF glucosa, OF manitol, OF maltosa, OF sacarosa y OF maltosa. La totalidad de las cepas dieron positiva / la prueba de la catalasa.

10 cepas (64'2%) fueron capaces de crecer a 42°C, / mientras que 7 (50'7%) lo hicieron sobre agar citrato. 8 (57'1%) produjeron arginina dehidrolasa mientras que sólo 2 (7'1%) crecieron sobre agar SS y fueron capaces de producir ureasa y lisina descarboxilasa.

El resto de las pruebas fueron negativas para la totalidad de las cepas (Tabla nº VI).

GRUPO K:- Incluye a 9 cepas (8'3%) que se identificaron como Acinetobacter calcoacéticus var Herellea. El 100% / oxidaron el OF glucosa, mientras que 12 (92'3%) fueron capaces de oxidar el OF manitol. Todas alcalinizaron el OF maltosa, OF sacarosa y OF lactosa.

También la totalidad de las cepas de este grupo dieron positiva: la producción de catalasa y de arginina dehidrolasa.

8 cepas (88'8%) crecieron sobre agar citrato y sobre TSA a 42°C. 4 (44'4%) hidrolizaron la lisina y sólo una (11'1%) creció sobre agar SS.

El resto de las pruebas bioquímicas fueron negativas en el 100% de las cepas ensayadas. (Tabla nº VI)

GRUPO L.- Sólo 3 cepas (2'5%) se identificaron como Flavo-bacterium, de las que el 100% oxidaron el OF glucosa. Todas alcalinizaron el OF lactosa, OF manitol y OF maltosa.

Todas respondieron positivamente a las pruebas siguientes: Producción de catalasa, oxidasa, indol, así como la hidrólisis de la esculina, desoxirribonucleasa y β -galactosidasa.

2 cepas (66'6%) hidrolizaron la gelatina y sólo una (33'3%) dió positiva la prueba de la ureasa, así como el creci-

miento a 42°C y sobre agar citrato.

El resto de las pruebas bioquímicas fueron negativas para la totalidad de las cepas. (Tabla nº VI).

De las cepas aisladas de muestras clínicas, ninguna fué identificada bioquímicamente como: Ps. Testosteroni, Ps. venesularis, Ps. acidovorans, Ps. diminuta, Alcaligenes faecalis, Alcaligenes faecalis var. odorans ni Alcaligenes faecalis, var. denitrificans.

De las 120 cepas bacterianas estudiadas, 4 (3'3%) no se pudieron incluir por sus características bioquímicas en ninguno de los grupos antes reseñados. (Tabla nº VII)

TABLA I II

"CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DE LOS BGNNF"

.-RESULTADOS EXPRESADOS EN % POSITIVIDAD-

() = nº de cepas.

	-GRUPO A-	-GRUPO B-	-GRUPO C-
	<u>Ps.aeruginosa</u> (31)	<u>Ps.fluorescens</u> (8)	<u>Ps.putida</u> (11)
OF GLUCOSA : oxida	100	100	100
OF MANITOL : oxida	19'3	25	9
OF LACTOSA : oxida	0	0	0
OF MAETOSA : oxida	0	0	0
OF SACAROSA: oxida	0	0	0
CATALASA : +	100	100	100
OXIDASA : +	100	100	100
CREC.SOBRE SS : +	100	100	100
CITRATO : +	100	100	100
UREA : +	32'2	25	18'2
REDUCC.DE NITRATO: +	100	0	43'3
INDOL : +	0	0	0
PROD. DE SH ₂ : +	0	0	0
GELATINA(Hidrol): +	67'7	100	0
MOTILIDAD : +	100	100	100
CREC. a 42° C : +	100	0	0
ESCULINA(Hidrol): +	0	0	0
LDC : +	3	0	0
ADH : +	100	100	100
ODC : +	0	0	0
FENILALANINA DESAMINASA : +	0	0	0
TOLERANCIA 6'5% CINa : +	0	0	0
DNasa : +	0	0	0
ONPG : +	0	0	0

TABLA IV

"CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DE LOS BGNNF"

.-RESULTADOS EXPRESADOS EN % DE POSITIVIDAD-

() = nº de cepas.

	-GRUPO D-	-GRUPO E-	-GRUPO F-	-GRUPO G-
	Ps.alcalig.	Ps.cepacia	Ps.maltoph.	Ps.putref.
	(6)	(3)	(8)	(3)
OF GLUCOSA :oxida	0	100	0	33'3
OF MANITOL :oxida	0	0	0	0
OF LACTOSA :oxida	0	0	0	0
OF MALTOSA :oxida	0	0	0	0
OF SACAROSA :oxida	0	0	0	0
CATALASA :+	100	100	100	100
OXIDASA :+	100	66'6	0	100
CREC.SOBRE SS :+	50	0	37'5	33'3
CITRATO :+	83	100	87'5	33'3
UREA :+	0	0	0	0
REDUCC.DE NITRATO :+	100	33'3	87'5	100
INDOL :+	0	0	0	0
PROD.DE SH ₂ :+	0	0	0	100
GELATINA(Hidrol) :+	0	33'3	87'5	33'3
MOTILIDAD :+	100	100	100	100
CREC. a 42°C :+	0	33'3	87'5	66'6
ESCULINA(Hidrol) :+	0	33'3	87'5	66'6
LDC :+	0	33'3	20	0
ADH :+	100	0	0	0
ODC :+	0	33'3	20	0
FENILALANINA DESAMINASA :+	0	0	0	0
TOLERANCIA 6'5 % ClNa :+	0	0	0	0
DNasa :+	0	0	100	100
ONPG :++	0	100	100	0

TABLA V
=====

"CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DE LOS BGNNF"

.-RESULTADOS EXPRESADOS EN % DE POSITIVIDAD-

() = nº de cepas.

	-GRUPO H-	-GRUPO I-
	Ps.stutzeri	Ps.pseudoalcaligenes.
	(3)	(8)
OF GLUCOSA :oxida	100	0
OF MANITOL :oxida	33'3	0
OF LACTOSA :oxida	0	0
OF MALTOSA :oxida	0	0
OF SACAROSA :oxida	0	0
CATALASA :+	100	100
OXIDASA :+	100	75
CREC.SOBRE SS :+	100	25
CITRATO :+	100	100
UREA :+	33'3	12'5
REDUCC.DE NITRATO:+	100	62'5
INDOL :+	0	0
PROD.DE SH ₂ :+	0	0
GELATINA(hidrol):+	33'3	0
MOTILIDAD :+	100	100
CREC.a 42°C :+	100	75
ESCULINA(Hidrol):+	0	0
LDC :+	0	0
ADH :+	0	100
ODC :+	0	0
FENILALANINA DESAMINASA :+	0	0
TOLERANCIA 6'5% ClNa :+	0	0
DNasa :+	0	0
ONPG :+	0	0

TABLA VI

=====

"CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DE LOS BGNNF"

.-RESULTADOS EXPRESADOS EN % DE POSITIVIDAD-
()= nº de cepas.

	-GRUPO J-	-GRUPO K-	-GRUPO L-
	Ac. calcoacéticus	Ac. Calcoacéticus	Flavobacterium
	(Mima)	(Herellea)	meningosepticum
	(15)	(9)	(3)
OF GLUCOSA :oxida	0	100	100
OF MANITOL :oxida	0	92'3	0
OF LACTOSA :oxida	0	0	0
OF MALTOSA :oxida	0	0	0
OF SACAROSA :oxida	0	0	0
CATALASA :+	100	100	100
OXIDASA :+	0	0	100
CREC. SOBRE SS :+	7'1	11'1	0
CITRATO :+	50'7	88'8	33'3
UREA :+	7'1	0	33'3
REDUCC. DE NITRATO:+	0	0	0
INDOL :+	0	0	100
PROD. DE SH ₂ :+	0	0	0
GELATINA(Hidrol):+	0	0	66'6
MOTILIDAD :+	0	0	0
CREC. a 42°C :+	64'2	88'8	33'3
ESCOLINA(Hidrol):+	0	0	100
LDC :+	7'1	44'4	0
ADH :+	57'8	100	0
ODC :+	0	0	0
FENILALANINA DESAMINASA :+	0	0	0
TOLERANCIA 6'5% ClNa :+	0	0	0
DNasa :+	0	0	100
ONPG :+	0	0	100

TABLA VII
=====

"CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DE 4 CEPAS NO
INCLUIDAS EN NINGUNO DE LOS GRUPOS ANTERIORES."
() = nº de cepas.

	-GRUPO M-			
	1	2	3	4
OF GLUCOSA :oxida	-	+	+	+
OF MANITOL :oxida	-	-	-	-
OF LACTOSA :oxida	-	-	-	-
OF MALTOSA :oxida	-	-	-	-
OF SACAROSA :oxida	-	-	-	-
CATALASA :+	+	+	+	+
OXIDASA :+	+	+	+	-
CREC.SOBRE SS :+	-	+	-	+
CITRATO :+	+	+	+	+
UREA :+	-	-	-	-
REDUC.DE NITRATO :+	-	-	-	-
INDOL :+	-	-	-	-
PROD.de SH ₂ :+	-	-	-	-
GELATINA (Hidrol) :+	+	-	+	-
MOTILIDAD :+	+	+	+	-
CREC. a 42°C :+	-	+	+	+
ESCULINA(hidrol) :+	-	-	-	-
LDC :+	-	-	-	-
ADH :+	-	+	+	+
ODC :+	-	-	-	-
FENILALANINA DESAMINASA :+	-	-	-	-
TOLERANCIA 6'5 % ClNa :+	-	-	-	-
DNasa :+	-	-	-	-
ONPG :+	-	-	-	-

3-2.-RESULTADOS DE LA CROMATOGRAFIA LIQUIDO GASEOSA(CLG):

Atendiendo a los diferentes perfiles cromatográficos que definen la composición celular en ácidos grasos de las 120 cepas bacterianas del presente trabajo, hemos podido / establecer los grupos siguientes:

GRUPO I.- Dentro de él incluimos a todos aquellos BGNNF que van a presentar un perfil cromatográfico comun a alguna de las cepas patrones (Pag. 7) incluidas en el presente trabajo; por lo que dentro de este grupo vamos a distinguir los / subgrupos siguientes:

I-1.- Incluye a 23 de la totalidad de las cepas ensayadas(19'2%), caracterizándose todas ellas por un perfil cromatográfico común al presentado por la cepa tipada bioquímicamente

como Ps.aeruginosa ATCC 25619. Este perfil se caracteriza por la presencia de nueve picos que representan a ácidos grasos de cadena normal (12:0, 14:0, 15:0, 16:0, y 18:0), hidroxiácidos / (2 ó 3 -OH 12:0), los denominados ciclopropanos (17:Δ y 19:Δ trans) y uno de los picos (tiempo de retención =9) que queda sin identificar por los patrones estandar utilizados (Applied / Sciences Lab. y Supelco, Inc) (Pag. 41) (Tabla VIII Fig.2). Cabe destacar en este subgrupo la ausencia total de ácidos grasos de cadena ramificada y la presencia de ciclopropano de 19 átomos de carbono isómero trans y de hidroxidodecanoico. (2 ó 3 OH 12:0).

I-2.- En él se incluyen 5 de las cepas estudiadas / (4'1%), las cuales quedan definidas por un perfil cromatográfico común al presentado por la cepa tipada bioquímicamente como Ps.fluorescens ATCC 13525, en el que se corresponden con ácidos grasos de cadena normal (12:0, 14:0, 15:0, 16:0 y 18:0), hidroxiácidos (2 ó 3 OH 12:0) y los denominados ciclopropanos (17:Δ) y sólo un pico con un tiempo de retención 9 queda sin identificar por los patrones estandar (Applied Sciences, Lab. y Supelco, Inc) (Pag. 41) (Tabla Nº VIII, Fig, 3). Se observa la ausencia de ciclopropano 19: Δ trans. y la presencia de anteiso 17:0 y de / hidroxidodecanoico.

I-3.- Fueron 4 (3'3%) cepas las que se incluyeron en este subgrupo, caracterizadas todas ellas por poseer un cromatograma común al presentado por la cepa tipada bioquímicamente como Ps. putida ATCC 12633. Este cromatograma se define por la presencia de 15 picos representativos de 15 ácidos grasos, de los cuales tres quedan sin identificar por no corresponder

se con ninguno de los patrones utilizados (Pag. 41). Los restantes picos quedaron bien identificados, correspondiéndose con ácidos / grasos de cadena normal (10:0, 11:0, 13:0, 14:0, 15:0, 16:0 y 18:0) hidroxiaácidos (2 ó 3 OH 12:0), ácidos grasos de cadena ramificadas (anteiso 17:0) y los ciclopropanos (17: Δ , 19: Δ cis). Cabe destacar en este grupo la ausencia del ácido ciclopropapo (19: Δ trans) así como la presencia de hidroxitetradecanoico, hidroxidodecanoico y de 2 ácidos no identificados (tiempo de retención= 4 y 4'7), también es destacable la ausencia del ácido dodecanoico (12:0) (Tabla VIII, Fig.4).

I-4.- Cuatro de las 120 especies bacterianas estudiadas (3'4%), quedan incluidas en este subgrupo por poseer un perfil cromatográfico común al presentado por Ps.alcaligenes ATCC 14909. Dicho perfil queda definido por la presencia de 9 ácidos grasos de / los que sólo 1 (tiempo de retención = 9) queda sin identificar por los patrones standard (Pag. 41). Los 8 picos restantes quedan perfectamente definidos como ácidos de cadena normal (10:0,12:0,13:0, 14:0,15:0,16:0 y 18:0)y ciclopropano (17: Δ). Se observa la ausencia de hidroxiaácidos, de ácidos grasos de cadena ramificada y de / ciclopropanos de 19 átomos de carbono (Tabla IX, Fig.5).

I-5.-Sólo 2 (1'2%) de las cepas se incluyeron en / este subgrupo por presentar un perfil cromatográfico común al de la cepa tipada bioquímicamente como Ps.cepacia ATCC 17759. Dicho subgrupo queda definido por un cromatograma constituido / por 8 ácidos grasos de los cuales sólo 1 (tiempo de retención=9'5) queda sin identificar por los patrones standard (Pag. 41), los otros quedan identificados como ácidos grasos de cadena normal

(12:0, 14:0, 15:0, 16:0 y 18:0) y ácidos ciclopropanos (17: Δ y 19: Δ trans). Es destacable la ausencia total de hidroxiácidos y de ácidos grasos de cadena ramificada, así como la presencia del ciclopropano (19: Δ trans) (Tabla nº IX, Fig.6).

I-6.- Este subgrupo incluye a 6 de las cepas ensayadas (5%), por presentar un perfil cromatográfico común al de la cepa tipada bioquímicamente como Ps maltophilia ATCC 13637. Dicho perfil se caracteriza por la presencia de 12 ácidos grasos de los que 3 (tiempo de retención 4,4,7 y 9'5) quedan sin identificar como ácidos estándar utilizados (Pag. 41), el resto quedan identificados como ácidos grasos de cadena normal / (10:0, 11:0, 14:0, 15:0, 16:0, y 17:0), hidroxiácidos (2 ó 3 OH 12:0 y 2 ó 3 OH 14:0), ácidos de cadena ramificada (a-17:0) y ciclopropanos (17: Δ y 19: Δ cis.). Se observa la presencia de ciclopropano de 19 átomos de carbono (19: Δ trans) así como la ausencia del ácido graso de cadena normal 12:0 (Tabla Nº IX Fig.7).

I-7.- De las especies bacterianas ensayadas 3 (2'5%). Se caracterizaron por tener un perfil cromatográfico común al / presentado por la cepa tipada bioquímicamente como Ps putrefaciens NCTC 10735. Se detecta la presencia de 12 picos cromatográficos que representan a 12 ácidos grasos de los que 2 quedan sin identificar (tiempo de retención = 4'7 y 9 respectivamente) por los patrones estándar (Pag. 41). Los 10 picos restantes quedan identificados como ácidos de cadena normal (12:0, 13:0, 14:0, / 15:0, 16:0 y 18:0), hidroxiácidos (2 ó 3 OH 12:0, y 2 ó 3 OH / 14:0), ácidos grasos de cadena ramificada (anteiso 17:0) y ciclopropano (17: Δ). Es de destacar la ausencia de ciclopropano de 19 átomos de carbono (19: Δ cis y 19: Δ trans). (Tabla IX, /

Fig.8).

I-8.- En este subgrupo se incluyeron 17 (14'1%) de las cepas estudiadas, caracterizándose todas ellas por un perfil cromatográfico común al presentado por Acinetobacter calcoaceticus var. Mima NCIB 9091, de los que sólo 12 quedan sin identificar por los patrones estandar (Pag. 41), los otros quedan / perfectamente definidos como, ácidos grasos de cadena normal / (12:0, 13:0, 14:0, 15:0, 16:0 y 18:0), hidroxiaácidos (2 ó 3 OH 12:o) y ciclopropano (17: Δ).

Cabe destacar en este subgrupo la ausencia de ácidos grasos de cadena ramificada, así como la ausencia de ciclopropanos de 19 átomos de carbono (19:Δ cis y 19: Δ trans). (Tabla / Nº X. Fig. 9).

I-9.- Sólo 2 (1'5%) de las cepas estudiadas se incluyeron en este grupo, identificándose como Alcaligenes faecalis por presentar un perfil cromatográfico común a la cepa tipada bioquímicamente como Alcaligenes faecalis ATCC 21400. Este perfil queda definido por la presencia de 8 picos cromatográficos representativos de 8 ácidos grasos de los que sólo uno queda sin identificar, mientras que los restantes, quedan identificados / por los patrones estandar (Pag. 41), como ácidos grasos de cadena normal (12:0, 14:0, 15:0, 16:0 y 18:0) hidroxiaácidos (2 ó 3 OH 12:0) y ciclopropanos (17: Δ y 19:Δ trans).

Es de destacar la ausencia de ácidos grasos de cadena ramificada y del ciclopropano de 19 átomos de carbono (19:Δ cis)

(Tabla Nº X, Fig. 10).

I-10.- De las cepas estudiadas 5 (4%) quedan incluidas en este grupo por poseer todas ellas un perfil cromatográfico común a la cepa tipada bioquímicamente como Alcalígenes faecalis var odorans ATCC 15173. La caracterización de este perfil viene definida por la presencia de 9 picos representativos de 9 ácidos / grasos, de los que 1 (tiempo retención = 9) queda sin identificar por los patrones usados (Pag. 41), mientras que el resto quedan / identificados como ácidos de cadena normal (12:0,13:0,14:0,15:0, 16:0, y 18:0) hidroxiaácidos (2 ó 3 OH 12:0) y ciclopropano (17:Δ). Cabe destacar en este subgrupo la presencia del ácido tridecanóico (13:0) aunque sólo sea en concentraciones o'1% (Trazas), así como la presencia del ácido dodecanóico (12:0) en concentraciones mayores que el tetradecanóico (14:0) en concentraciones mayores que el tetradecanóico (14:0), ausencia de ciclopropanos de 19 átomos de / carbono (19:Δ cis y 19:Δ trans) y de ácidos de cadena ramifica da (Tabla X, Fig. 11).

1-11.- Este subgrupo está definido por el perfil cromato gráfico que presenta la cepa bacteriana tipada bioquímicamente como Alcalígenes faecalis var denitricans ATCC 15554. Cuatro de las cepas estudiadas (3'3%) presentaron un perfil cromatográfico común, caracterizado por la presencia de 8 ácidos grasos de los cuales sólo 1 / queda sin identificar por los patrones standard (Pag. 41), los 7 restantes, quedan identificados como ácidos de cadena normal (12:0, 14:0, 15:0, 16:0 y 18:0) hidroxiaácidos (2 ó 3 OH 12:0) y ciclopropano (17:Δ_L). Cabe destacar la ausencia de ciclopropanos de 19 áto mos de carbono (19:Δ cis y 19:Δ trans), del ácido tridecanóico / (13:0) y de ácidos de cadena ramificada. Se observa que el ácido tetradecanóico (14:0) y que el ciclopropano de 17 átomos de carbono (17:Δ) se encuentra en altas concentraciones. (Tabla X Fig.12).

I-12.- Sólo 3 (2'5%) de las cepas se incluyeron en este subgrupo caracterizado por un perfil cromatográfico común al presentado por la cepa tipada bioquímicamente como Flavobacterium meningosepticum ATCC 13253. Dicho perfil está definido por la presencia de 13 ácidos grasos de los que 5 quedan sin / identificar por los patrones estandard (Pag. 41), mientras que los restantes sí quedan identificados como ácidos de cadena normal (10:0, 11:0, 14:0, 15:0) hidroxiaácidos (2 ó 3 OH 12:0 y 2 ó 3 OH 14:0 y 2 OH 16:0) y ciclopropano (19: Δ cis). Es destacable la ausencia del ácido ciclopropano de 17 átomos de carbono (17: Δ) del hexadecanoico y octodecanoico (16:0 y 18:0) presentes en todos los subgrupos anteriormente estudiados y del ácido dodecanoico (12:0) (Tabla XI, Fig.13).

GRUPO II.- Incluye: cepas patrones de BGNNF cuyos perfiles cromatográficos no fueron presentados por ninguna de las cepas aisladas en muestras clínicas.

II-1.- Se caracteriza por el perfil cromatográfico correspondiente a la cepa tipada bioquímicamente como Ps testosteroni ATCC 11996. Dicho perfil está, definido por 10 ácidos grasos de los cuales sólo 1 queda sin identificar por los patrones estandard (Pag. 41), siendo los otros identificados como ácidos de cadena normal (12:0, 13:0, 14:0, 15:0, 16:0 y 18:0), hidroxiaácidos (2 ó 3 OH 12:0 y 2 OH 16:0) y ciclopropano (17: Δ). Cabe destacar la presencia del ácido 2-hidroxihexadecanoico (2 OH-16:0) y ausencia de ciclopropanos de 19 átomos de carbono (19: Δ cis y 19 Δ trans). (Tabla XII, Fig. nº 14).

II-2.- Queda definido este subgrupo por el perfil / cromatográfico presentado por la cepa tipada bioquímicamente co

mo Ps vesicularis NCTC 10465, cuya característica es el poseer 6 picos cromatográficos de los que todos a excepción de uno / quedan identificados por los patrones standard (Pag. 41) como ácidos grasos de cadena normal (12:0, 14:0, 15:0, 16:0 y 18:0) y ciclopropano (17: Δ). Cabe destacar la ausencia de hidroxiácidos y de ácidos de cadena ramificada (Tabla XII Fig. nº 15).

II-3.- El perfil cromatográfico de la cepa tipada como Ps acidovorans ATCC 15568 caracterizado por la presencia de 7 picos cromatográficos representativos de 7 ácidos grasos identificados por los patrones (Pag. 41), como ácidos de cade na normal (12:0, 14:0, 15:0, 16:0 y 18:0) y ciclopropano (17: Δ). Sólo un pico queda sin identificar. Se observa la ausencia de / hidroxiácidos y de ácidos de cadena ramificada (Tabla XII Fig. nº 16).

II-4.- La cepa patrón Ps diminuta ATCC 11568 está definida por un perfil cromatográfico constituido por 10 picos identificados todos ellos a excepción de 1 según los patrones standard (Pag. 41) como ácidos grasos de cadena normal (11:0, 12:0, 14:0, 15:0, 16:0 y 18:0, y ciclopropanos (17: Δ y 19: Δ trans). Es destacable la ausencia de hidroxiácidos y de ácidos grasos de cadena ramificada, así como la presencia del ácido / undecanoico (11:0) y el ciclopropano (19: Δ trans) (Tabla XII Fig. nº 17).

II-5.- En este subgrupo se incluye la cepa tipada bioquímicamente como Ps. stutzeri ATCC 11607, que se caracteri za por presentar un cromatograma con 11 ácidos grasos identifi cados todos ellos por los patrones standard utilizados, a ex cepción de 2 que quedan sin identificar. Los ácidos que definen

este perfil son: ácidos grasos de cadena normal (10:0,12:0, / 14:0,15:0,16:0, y 18:0), ácidos de cadena ramificada (anteiso 17:0) y ciclopropanos (17:Δ y 19:Δ trans). Es destacable la ausencia de hidroxiaácidos y presencia de ácidos grasos de cadena ramificada y de ciclopropanos (Tabla nº XIII, Fig. 18).

II-6.- El perfil cromatográfico que define a este subgrupo es el presentado por la cepa tipada bioquímicamente como Ps pseudoalcaligenes ATCC 17440 ,caracterizado por la presencia de 11 picos cromatográficos de los que sólo uno queda / sin identificar por los patrones standard, mientras que los otros quedan perfectamente identificados como; ácidos grasos de cadena normal (12:0, 13:0, 14:0, 15:0, 16:0,y 18:0), hidroxiácidos (2 ó 3 OH 14:0 y 2 OH 16:0), ácidos de cadena ramificada (anteiso 17:0) y ciclopropano (17:Δ). Cabe destacar en este cromatograma la ausencia de los ciclopropanos de 19 átomos de carbono (19:Δ cis y 19:Δ trans) así como la presencia del hidroxihexadecanóico (2 OH 16:0) (Tabla nº XII, Fig. 19).

GRUPO III.- En este grupo incluimos a aquellos bacilos Gram negativos no fermentadores que presentan perfiles / cromatográficos que no se corresponden con ninguno de los perfiles representativos de los subgrupos anteriormente estudiados. Así podemos distinguir 5 subgrupos distintos:

III-1.- Incluye a 7 de las cepas estudiadas (5'8%) caracterizándose todas ellas por un perfil cromatográfico definido por la presencia de 14 ácidos grasos de los que 3 no se / identificaron por los patrones standard (Pag. 41) mientras que los 11 restantes quedaron perfectamente identificados como, áci

dos grasos de cadena normal (10:0, 11:0, 12:0, 13:0, 14:0, 15:0, 16:0, 18:0), hidroxiácidos (2 ó 3 OH 12:0) ácidos grasos de cadena ramificada (anteiso 17:0) y ciclopropano (17: Δ). Cabe destacar la ausencia de ciclopropanos de 19 átomos de carbono (19: Δ cis y 19: Δ trans), así como la presencia del tridecanóico /- (13:0) y de un ácido no identificado con tiempo de retención = 32. (Tabla nº XIV, Fig, 20).

III-2.- En este subgrupo incluimos a 14 de las cepas estudiadas (11'6%), caracterizadas todas ellas por tener un perfil cromatográfico común, de los cuales sólo 1 queda sin identificar por los patrones standard (Pag. 41), mientras que el / resto quedan perfectamente identificados como ácidos de cadena normal (12:0, 14:0, 15:0, 16:0 y 18:0), hidroxiácidos (2 ó 3 OH 12:0) y ciclopropano (17: Δ) (Tabla nº XIV, Fig. 21).

Es de destacar la ausencia de los ciclopropanos de / 19 átomos de carbono (19: Δ cis y 19: Δ trans), así como la presencia de hidroxidodecanóico (2 ó 3 OH 12:0).

III-3.- En él se incluyeron 5 de las cepas estudiadas (4'1%), caracterizándose todas ellas por poseer un perfil / cromatográfico común, definido éste por la presencia de 14 ácidos grasos, de ellos, 3 quedan sin identificar por los patrones standard (Pag. 41) mientras que el resto quedan identificados como ácidos de cadena normal, (10:0, 11:0, 12:0, 13:0, 14:0, /- 15:0, 16:0 y 18:0) hidroxiácidos (2 ó 3 OH 12:0) y ciclopropanos (17: Δ y 19: Δ trans). (Tabla nº XIV, Fig. 22).

Destaca la presencia del ácido tridecanóico (13:0), y del 19: Δ trans de cadena ramificada.

III-4.- En este grupo sólo se incluyeron a 2 de las cepas (1'6%), caracterizadas por un perfil cromatográfico común definido por la presencia de ácidos grasos, de los que todos quedaron identificados por los patrones standard, como ácidos de cadena normal (12:0,14:0, 15:0,16:0 y 18:0) hidroxiaácidos (2 ó 3 OH / 12:0 y 2 ó 3 OH 14:0), de cadena ramificada (anteiso 17:0) y ciclopropanos (17: Δ ,19: Δ trans) (Tabla XIV, Fig.23)

Destaca la ausencia de ácido tridecanóico (13:0), así como la presencia de ácidos de cadena ramificada e hidroxiaácidos.

III-5.-En este subgrupo incluimos 3 de las cepas estudiadas (2'5%) caracterizadas todas ellas por un perfil cromatográfico común, definido éste por la presencia de 10 picos cromatográficos representativos de 10 ácidos grasos, de los que sólo / uno queda sin identificar, mientras que el resto quedan identificados como ácidos de cadena normal (12:0, 14:0, 15:0, 16:0, y 18:0) hidroxiaácidos (2 ó 3 OH 12:0 y 2 ó 3 OH 14:0) ácidos de cadena ramificada (anteiso 17:0 a 15:0) y ciclopropano (17: Δ) / (Tabla nº XIV) (Fig. 24)

Cabe destacar la ausencia del ácido (19: Δ trans), así / como la presencia de hidroxiaácidos y ácidos de cadena ramificada, en especial del anteiso 15:0 ausente en todos los grupos anteriores.

Un 4'1% de la totalidad de las cepas, lo que representa 5 cepas, presentaron perfiles cromatográficos muy dispares, sin que ninguno de ellos pudiera incluirse en ninguno de los 23 subgrupos por nosotros definidos (Tabla nº XV).

CORRESPONDENCIA ENTRE EL METODO CROMATOGRAFICO (CLG) Y EL BIO-
QUIMICO.-

Atendiendo a los resultados obtenidos por CLG, 115 de las cepas bacterianas estudiadas en el presente trabajo quedaron clasificadas según su perfil cromatográfico dentro de los 23 subgrupos establecidos, vamos a ver la correlación de estos subgrupos con los establecidos por identificación bioquímica

La correlación entre el subgrupo cromatográfico I-1 y el bioquímico A (Ps. aeruginosa) fue de un 90% lo que indica / que de las 23 cepas estudiadas en el subgrupo, sólo 3 cepas -/ presentaron discordancia entre ambos métodos de identificación, 2 de ellas fueron identificadas bioquímicamente como Ps. putida, mientras que la otra como Ps. stutzeri.

Entre el subgrupo cromatográfico I-2 y el bioquímico B (Ps. fluorescens) la correspondencia fue sólo del 40%, ya que de las 5 cepas incluidas en el subgrupo, 2 mostraron correspondencia entre la cromatografía y la bioquímica, mientras que de las restantes, 2 se identificaron bioquímicamente como Ps. putida y 1 como Acinetobacter calcoaceticus var. Mima.

Entre el subgrupo cromatográfico I-3 y el bioquímico C (Ps. putida) la correspondencia fue de un 50% si bien de / las 2 cepas restantes, una se identificó como Ps. aeruginosa / y la otra como Ps. fluorescens.

En el subgrupo cromatográfico I-4 y el bioquímico D (Ps. alcaligenes) la correspondencia fue del 75%, ya que de las cuatro cepas incluidas en el subgrupo, sólo una no fue identificada bioquímicamente como tal, sino como Ps. stutzeri.

Ente el subgrupo cromatográfico I-5 y el bioquímico E (Ps.cepacia) observamos una correlación del 100% entre el método cromatográfico y el bioquímico.

Dentro del subgrupo cromatográfico I-6, que incluye a aquellas cepas identificadas cromatográficamente como Ps.maltophilia. Observamos una correspondencia entre el método cromatográfico y bioquímico del 100%.

Dentro del subgrupo cromatográfico I-7 y el bioquímico G (Ps.putrefaciens) la correspondencia entre ambos fue del / 100% .

Dentro del subgrupo cromatográfico I-8 y el bioquímico J (Acinetobacter calcoaceticus var. Mima), observamos que la correlación existente fue del 81'2%, sólo 3 cepas fueron identificadas bioquímicamente como Acinetobacter calcoaceticus var. Here-
llea.

El subgrupo cromatográfico I-9 que incluye a las cepas identificadas cromatográficamente como Alcaligenes faecalis, la correlación con la identificación bioquímica fue del 50%, ya que de 2 cepas incluidas en el subgrupo una se identificó como Ps. / pseudoalcaligenes. y otra fue la cepa patrón Alcaligenes faecalis ATCC.

No existió correlación entre la cromatografía y la / bioquímica dentro del subgrupo I-10, sólo con la cepa patrón Alcaligenes faecalis var. odorans el resto fue identificado como Ps. alcaligenes (3 cepas) y Ps. pseudoalcaligenes (1).

Dentro del subgrupo cromatográfico I-11, la correspondencia entre los resultados de la identificación cromatográfica y la bioquímica fué sólo del 25% ya que el resto se identificó como Ps. pseudoalcaligenes en vez de Alcaligenes faecalis var. denitrificans.

En el subgrupo cromatográfico I-12 y el bioquímico L (Flavobacterium) la correlación entre los resultados obtenidos / por el método cromatográfico y el bioquímico fué del 100%.

En los subgrupos II-1, II-2, II-3, II-4, II-5, y II-6, no podemos hablar de correlación entre ambos métodos por incluir todos ellos únicamente, a las cepas patrones: Ps. tetosteroni ATCC 11996, Ps. vesicularis ATCC 10465, Ps. acidovorans ATCC 15568 Ps. diminuta ATCC 11568, Ps. stutzeri ATCC 11607 y Ps. pseudoalcaligenes ATCC 17440.

En el subgrupo cromatográfico III-1 que no está definido por ninguna cepa patrón es destacable que todas las cepas aisladas de muestras clínicas incluidas en él, representaron un perfil cromatográfico común, al igual que una bioquímica común que se correspondía con Acinetobacter calcoaceticus var. Herellea, por lo / que podríamos decir que la correlación en este subgrupo del método cromatográfico y bioquímico es del 100%.

El subgrupo cromatográfico III-2, incluía a un grupo de bacterias que tenían un perfil cromatográfico común, no ocurría / así con su bioquímica, ya que, 3 cepas se identificaron como Ps. fluorescens; 1 como Ps. pseudoalcaligenes; 5 como Ps. aeruginosa; 1 como AC. calcoaceticus (Mima) y 4 como Ps. putida.

En el subgrupo cromatográfico III-3 se agruparon 5 cepas con un perfil cromatográfico común y una bioquímica relacionada que incluye a 2 Ps. aeruginosa; 1 Ps. fluorescens; y 2 Ps. putida, que son cepas que bioquímicamente están muy próximas.

Dentro del subgrupo cromatográfico III-4, se incluyen 2 cepas que presentan igual cromatografía pero que bioquímicamente una se tipó como Ps. aeruginosa y la otra como Ps. cepacia.

En el subgrupo cromatográfico III-5 se incluyen 3 cepas que si cromatográficamente son iguales no ocurre así bioquímicamente ya que: 1 Ac. calcoaceticus (Mima); 1 Ps. maltophilia y 1 Ps. pseudoalcaligenes, es destacable que si bien estas cepas son bioquímicamente distintas están bastante próximas entre sí.

El medio de cultivo presenta un cromatograma carente de picos que pudiera interferir con los cromatogramas de las cepas problema. (Fig.25)

TABLA VIII
=====

"COMPOSICION EN ACIDOS GRASOS DE BGNNF POR CLG"

() = nº de cepas.

Las cifras expresan la concentración de ácidos grasos en %

-GRUPO 1-

TIEMPO - RETENCION	ACIDO GRASO	SUBGRUPO 1	SUBGRUPO 2	SUBGRUPO 3
		<u>Ps.aeruginosa</u> (23)	<u>Ps.fluorescens</u> (5)	<u>Ps.putida</u> (4)
1'9	10:0			0'4
2'3	11:0			5'7
3	2 OH 10:0			
3'9	12:0	8'8	9'6	
4	NI*			3'7
4'7	NI			3'5
5	NI			
5'6	13:0			T*
6'9	2 ó 3 OH 12:0	12	12'9	1'8
8	14:0	2	2'6	5
9	NI	8'2	11'9	
9'5	NI			48
10	anteiso 15:0			
10'8	15:0	1'4	0'5	0'5
12'7	2 ó 3 OH 14:0			2
14	16:0	34'4	44'5	19
16'3	NI			
16'7	anteiso 17:0		2'9	5
18	17: Δ	3'4	6'5	0'4
20	2:OH 16:0			
21'8	18:0	28'6	8'6	4'5
23	NI			
24'6	19: Δ cis			0'5
27	19: Δ trans	1'2		

* T= Trazas = concentración menor a 0'1% .

* NI= No identificados

TABLA IX
=====

"COMPOSICION EN ACIDOS GRASOS DE BGNNF POR CLG"

() = nº de cepas.

Las cifras expresan la concentración de ácidos en %

-GRUPO 1-

TIEMPO - RETENCION	ACIDO GRASO	SUBGRUPO 4	SUBGRUPO 5	SUBGRUPO 6	SUBGRUPO 7
		<u>Ps.alcali- genes.</u> (4)	<u>Ps.cepacia</u> (2)	<u>Ps.maltophi- lia.</u> (6)	<u>Ps.putrefa- ciens.</u> (3)
1'9	10:0	0'7		0'2	
2'34	11:0			2'5	
3	2 OH 10:0				
3'8	12:0	3'3	T*		0'5
4	NI*			2	
4'7	NI			2'3	9'6
5	NI				
5'6	13:0	0'3			0'8
6'9	2 ó 3 OH 12:0			3	3'3
8	14:0	2'7	4	3'7	0'8
9	NI	5			40
9'5	NI		1'8	36	
10	anteiso 15:0				
10'8	15:0	3'3	2'2	4'3	3'2
12'7	2 ó 3 OH 14:0			2	1'5
14	16:0	49	50	22	16
16'3	NI				
16'7	anteiso 17:0			1	5'5
18	17:Δ	5	13	1'3	10'5
20	2 OH 16 :0				
21'8	18:0	31	25	20	8'3
23	NI				
24'6	19:Δ cis			T	
27	19:Δ trans		4	T	

* T= Trazas = concentración menor a 0'1%. NI= No Identificados

TABLA X
=====

"Composición en ácidos grasos de BGNNF por CLG"

() = nº de cepas.

Las cifras expresan la concentración de ácidos grasos en %

GRUPO -I

TIEMPO - RETENCION	ACIDO GRASO	SUBGRUPO-8	SUBGRUPO-9	SUBGRUPO-10	SUBGRUPO-11
		Alc. calcoá- ceticus. Mima (17)	Alc. faeca- lis (2)	Alc. odorans (5)	Alc. denitri- licans (4)
1'9	10:0				
2'34	11:0				
3	2 OH 10:0				
3'8	12:0	4'5	T*	3'9	2
4	NI*				
4'7	NI				
5	NI	T			
5'6	13:0	T		T	
6'9	2 ó 3 OH 12:0	3'3	T	2'4	3
8	14:0	16'6	0'2	2	5
9	NI	16'3	15'6	11	9'5
9'5	NI				
10	anteiso 15:0				
10'8	15:0	6'3	6	10	2'5
12'7	2 ó 3 OH 14:0				
14	16:0	23	15'7	40	62
16'3	NI				
16'7	anteiso 17:0				
18	17: Δ	2	1'5	13'7	10
20	2 OH 16:0				
21'8	18:0	28	62	17'1	6
23	NI				
24'6	19: Δ cis				
27	19: Δ-trans		5		

* T= Trazas = concentración menor a 0'1%

NI= No Identificados.

TABLA XI

"Composición en ácidos grasos de BGNNF por CLG"

() = nº de cepas.

Las cifras expresan la concentración de ácidos grasos en %

-GRUPO - I

TIEMPO - RETENCION	ACIDO GRASO	SUBGRUPO 12
		Flavobacterium meningosepticum (3)
1'9	10:0	T*
2'34	11:0	T
3	2 OH 10:0	
3'9	12:0	
4	NI*	
4'7	NI	2
5	NI	
5'6	13:0	
6'9	2 ó 3 OH 12:0	0'8
8	14:0	0'9
9	NI	
9'5	NI	50
10	anteiso 15:0	
10'8	15:0	1'5
12'7	2 ó 3 OH 14:0	1'2
14	16:0	
14'7	NI	22
16'3	NI	11
16'7	anteiso 17:0	
18	17: Δ	
20	2 OH 16:0	0'7
21'8	18:0	
23	NI	2
24'6	19: Δ cis	8
27	19: Δ trans	

*T= Trazas = Concentración menor a 0.1%

TABLA XII
=====

"Composición en ácidos grasos de BGNNF por CLG"

() = nº de cepas.

Las cifras expresan la concentración de ácidos grasos en %

GRUPO -II

TIEMPO - RETENCION	ACIDO GRASO	SUBGRUPO-1	SUBGRUPO-2	SUBGRUPO-3	SUBGRUPO-4
		<u>Ps.testos-</u> <u>teroni.</u> (1)	<u>Ps.vesicu-</u> <u>laris.</u> (1)	<u>Ps.acido-</u> <u>vorans</u> (1)	<u>Ps,diminuta</u> (1)
1'9	10:0				
2'34	11:0				1
3	2 OH 10:0				
3'8	12:0	3'7	0'3	3	0'5
4	NI*				
4'7	NI				0'4
5	NI				
5'6	13:0	0'2			
6'9	2 ó 3 OH 12:0	0'2			
8	14:0	0'6	4	0'7	5'7
9	NI				10'6
9'5	NI	1'5	2	1'5	
10	anteiso 15:0				
10'8	15:0	4'8	7	6'3	5'2
12'7	2 ó 3 OH 14:0				
14	16:0	59'6	30	56'2	30
16'3	NI				
16'7	anteiso 17:0				
18	17:Δ	4'6	1'8	19'3	2'8
20	2 OH 16:0	6			
21'8	18:0	18'8	54'9	13.	34'3
23	NI				
24'6	19: Δ cis				
27	19: Δ trans				3'8
* NI = No Identificados			T=Trazas=Conc. menor 0'1%		

TABLA XIII

"Composición de ácidos grasos de BGNNF por CLG"

() = nº de cepas.

Las cifras expresan la concentración de ácidos grasos en %

-GRUPO II-

TIEMPO RETENCION	ACIDO GRASO	SUBGRUPO-5	SUBGRUPO-6
		Ps. stutzeri (1)	Ps. pseudo- alcaligenes (1)
1'9	10:0	0'3	
2'34	11:0		
3	2 OH 10:0		
3'8	12:0	11'7	11'4
4	NI*		
4'7	NI	0'2	
5	NI		
5'6	13:0		0'5
6'9	2 ó 3 OH 12:0		
8	14:0	4'8	0'8
9	NI		
9'5	NI	1	1'5
10	anteiso 15:0		
10'8	15:0	1'8	4'4
12'7	2 ó 3 OH 14:0		0'8
14	16:0	31	56'8
16'3	NI		
16'7	anteiso 17:0	7'6	7
18	17: Δ	3'9	5'2
20	2 OH 16:0		4'5
21'8	18:0	36'8	7'1
23	NI		
24'6	19: Δ cis		
27	19: Δ trans	0'9	
NI	=	No Identificados.	
T	=	Trazas= Conc. menor 0'1%	

TABLA XIV
=====

"Composición de ácidos grasos de BGNNF "

() = nº de cepas

Las cifras expresan la concentración de ácidos grasos en %

-GRUPO III-

TIEMPO RETENCION	ACIDO GRASO	SUBGRUPO	SUBGRUPO	SUBGRUPO	SUBGRUPO	SUBGRUPO
		-1-	-2-	-3-	-4-	-5-
		(7)	(14)	(5)	(2)	(3)
1'9	10:0	T*		T		
2'34	11:0	T		0'6		
3	2 OH 12:0					
3'8	12:0	10'2	7'3	13'3	9	0'5
4	NI*					
4'7	NI			T		T
5	NI	0'5		0'8		
5'6	13:0	0'5		0'5		
6'9	2 ó 3 OH 12:0	8	5'7	7'9	7	1'5
8	14:0	6	1'9	4'5	3	2
9	NI	3	15'6	12'7		
9'5	NI					
10	a-15:0					25
10'8	15:0	4	1'5	1'5	1	2
12'7	2 ó 3 OH 14:0				0'2	7
14	16:0	30	35'5	31	40	44
16'3	NI					
16'7	anteiso 17:0	1			1	5
18	17: Δ	6	3	5'5	2	8
20	2 OH 16:0					
21'8	18:0	30	29'5	21	37	5
23	NI					
24'6	19: Δ cis					
27	19: Δ trans			0'7	T	
31'7	NI	0'7				
* NI = No Identificados.		*T=Trazas=Conc. menor 0'1%				

TABLA XV

"Composición en ácidos grasos de 5 cepas no incluidas en ninguno de los grupos anteriores".

() = nº de cepas

Las cifras expresan la concentración de ácidos grasos en %

TIEMPO RETENCION	ACIDO GRASO	1	2	3	4	5
1'9	10:0	T*			1'9	
2'34	11:0	T				
3	2 OH 12:0					
3'8	12:0	0'2	8'3	31	4'6	4
4	NI*					
4'7	NI	3'2				
5	NI		2			
5'6	13:0			0'8		
6'9	2 ó 3 OH 12:0	0'2			9	2'5
8	14:0	0'9	3	1'6	1'3	1'7
9	NI			4'9	30	4'5
9'5	NI	68	17'7			
10	anteiso 15:0					
10'8	15:0	0'3	1'3	1'5	0'5	0'8
2'7	2 ó 3 OH 14:0	0'3				
14	16:0	10'6	37'4	27'5	26'4	41'6
14'7	NI	7				
16'3	NI	9				
16'7	anteiso 17:0					1'9
18	17: Δ		5	0'7	11'3	3'2
20	2 OH 16:0					
21'8	18:0	T	25	30'9	9'6	37'8
23	NI					
24'6	19: Δ cis					
27	19: Δ trans			T		0'4
31	NI					
*NI = No Identificados.		*T=Trazas=Conc. menor 0'1%				

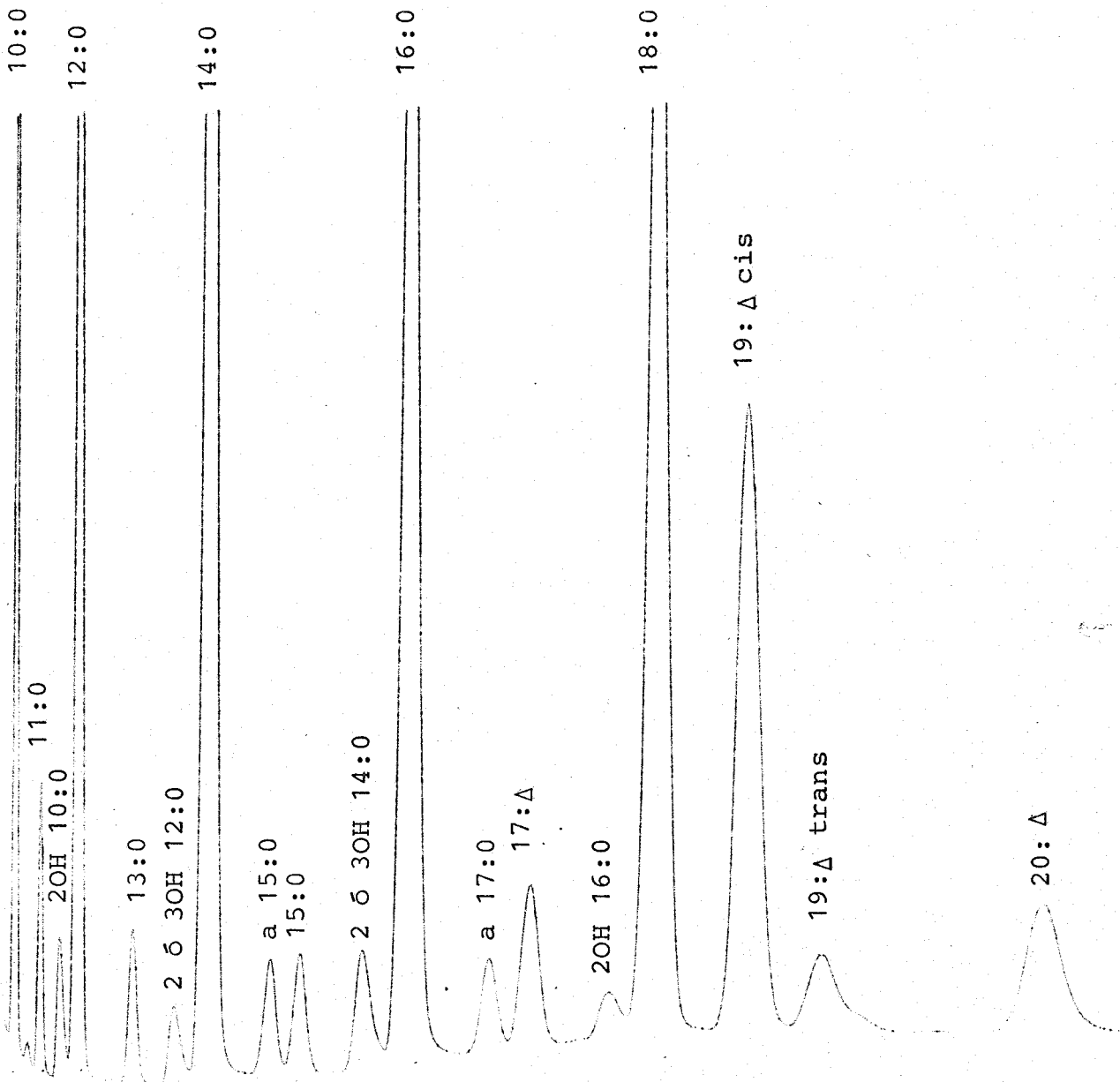


FIG. 1.- Cromatografía líquido-gaseosa de la mezcla patrón de ácidos grasos esterificados.

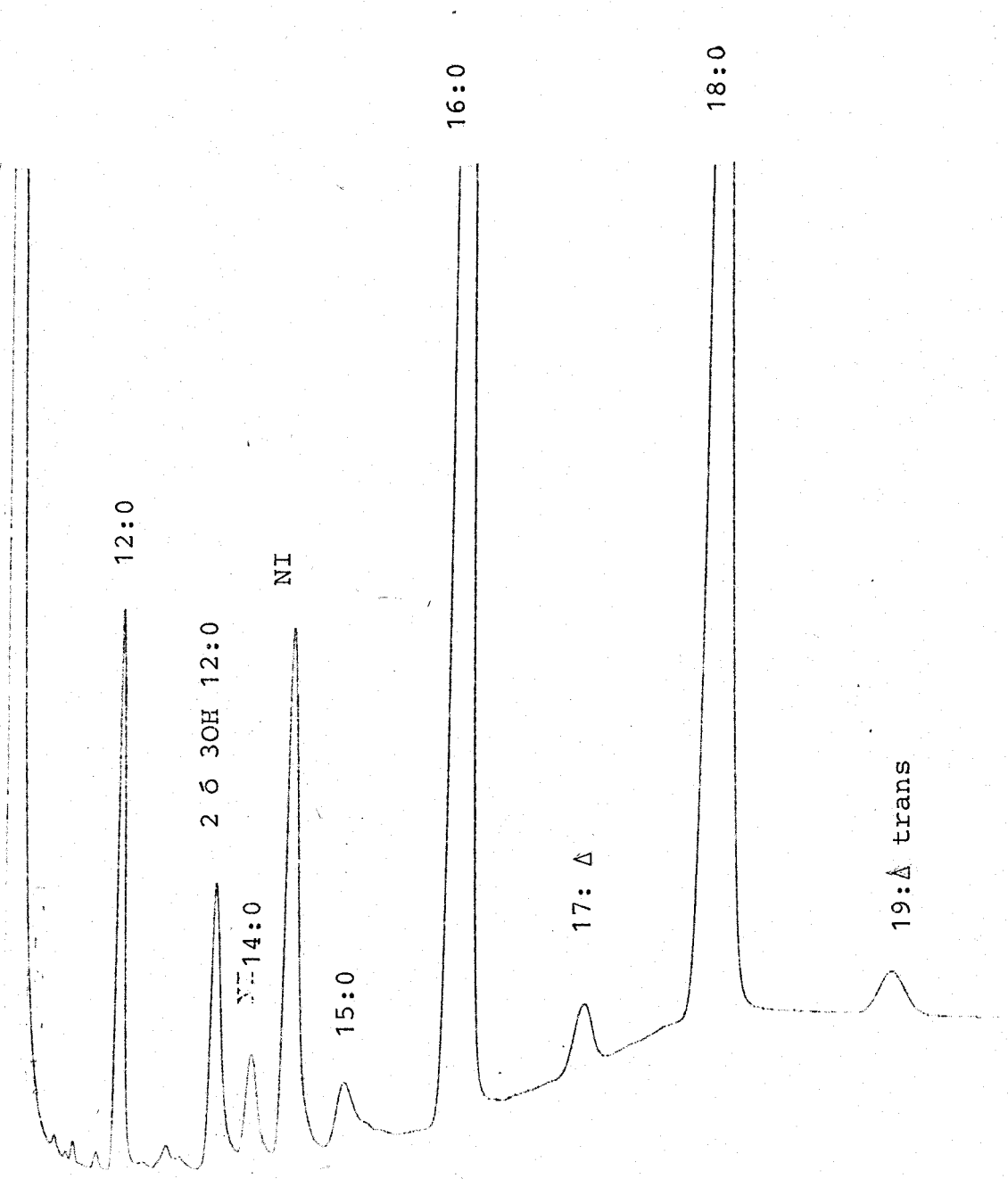


FIG. 2.- Cromatografía líquido-gaseosa de los ácidos grasos esterificados del subgrupo I-1 (Ps.aeruginosa).

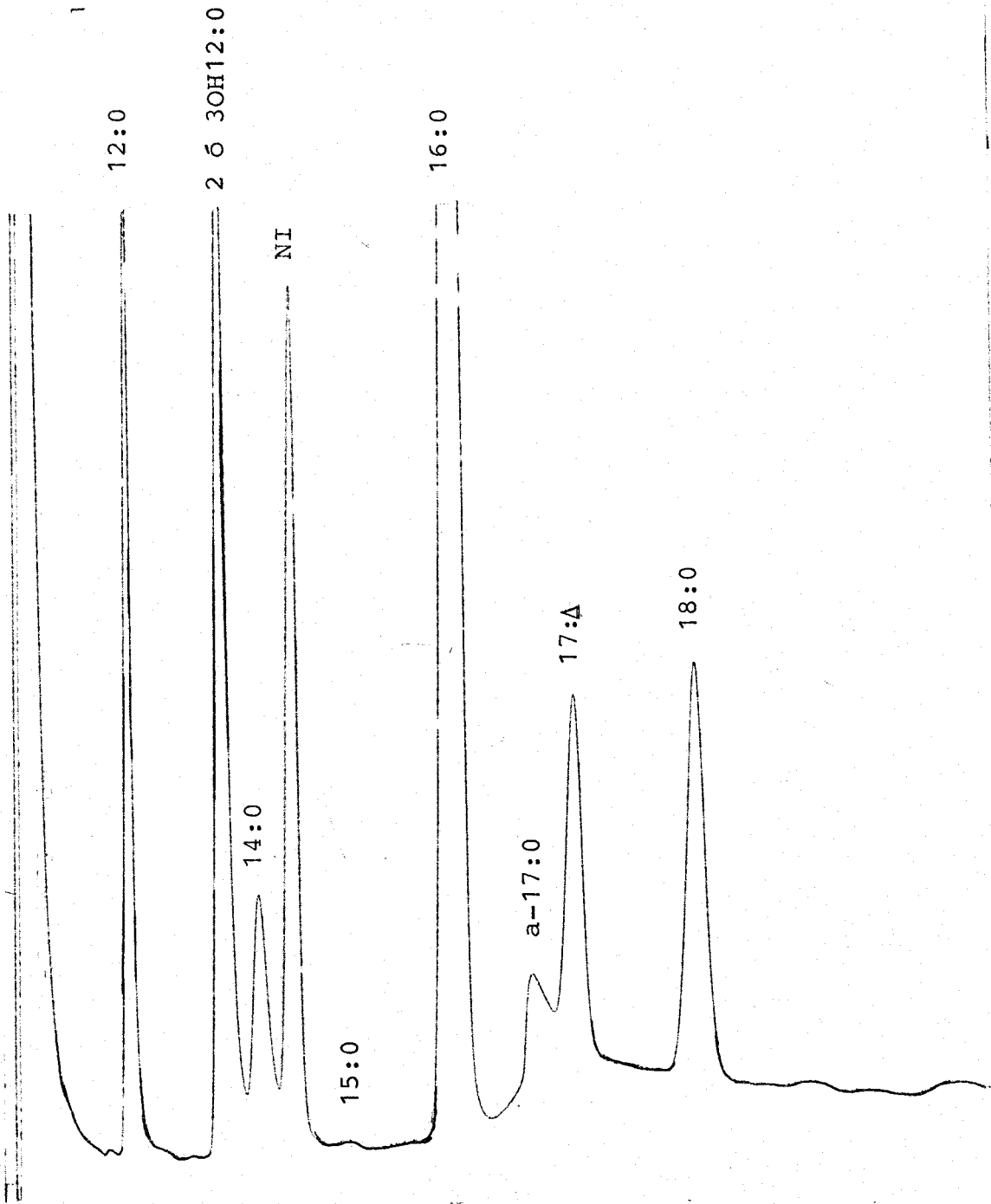


FIG. 3.- Cromatografía líquido-gaseosa de los ácidos grasos esterificados del subgrupo I-2 (Ps.fluorescens)

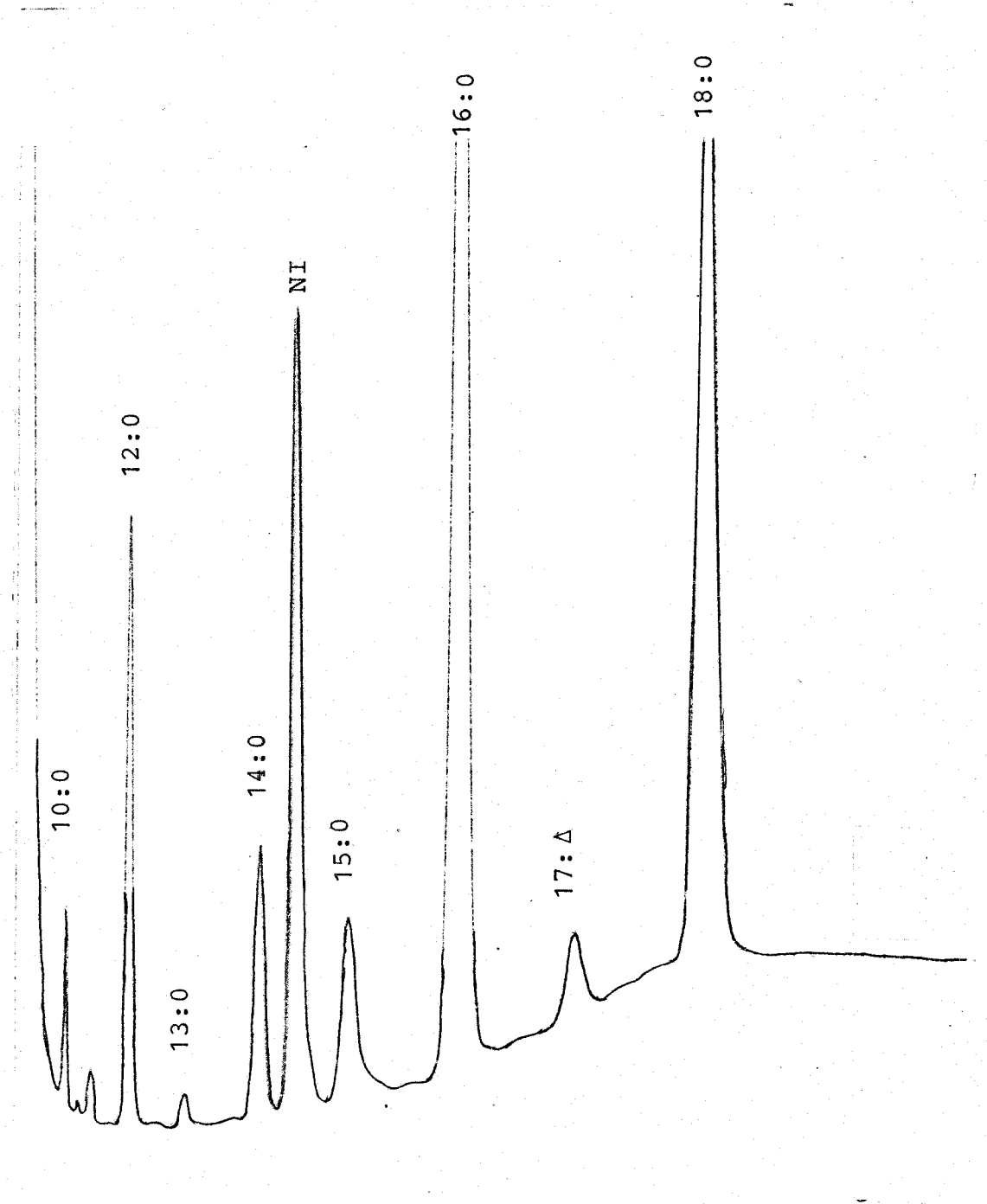


FIG.5.- Cromatografía líquido-gaseosa de los ácidos grasos esterificados del subgrupo I-4 (Ps.alcaligenes)

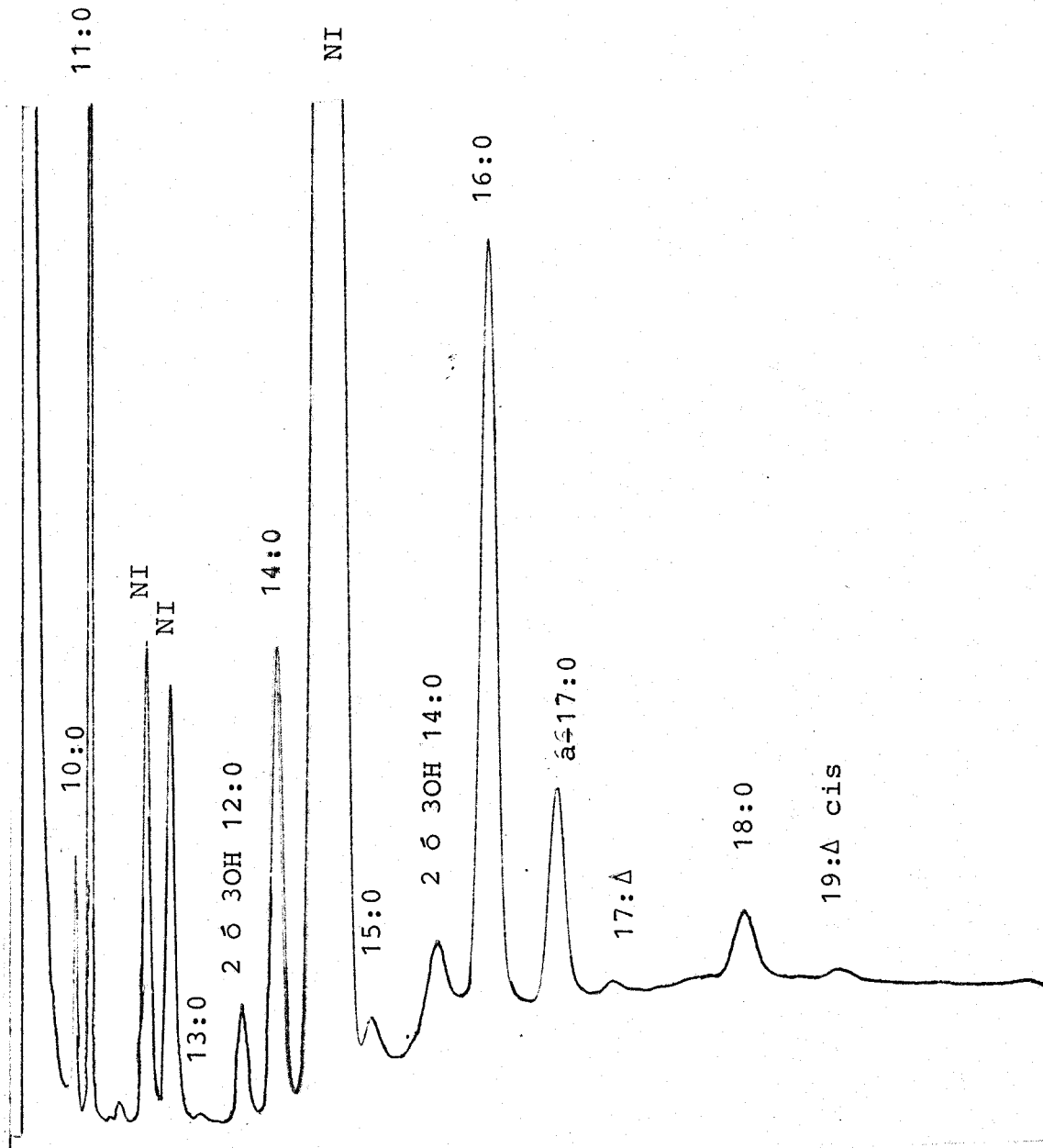


FIG.4.- Cromatografía líquido-gaseosa de los ácidos grasos esterificados del subgrupo I-3 (Ps.putida).

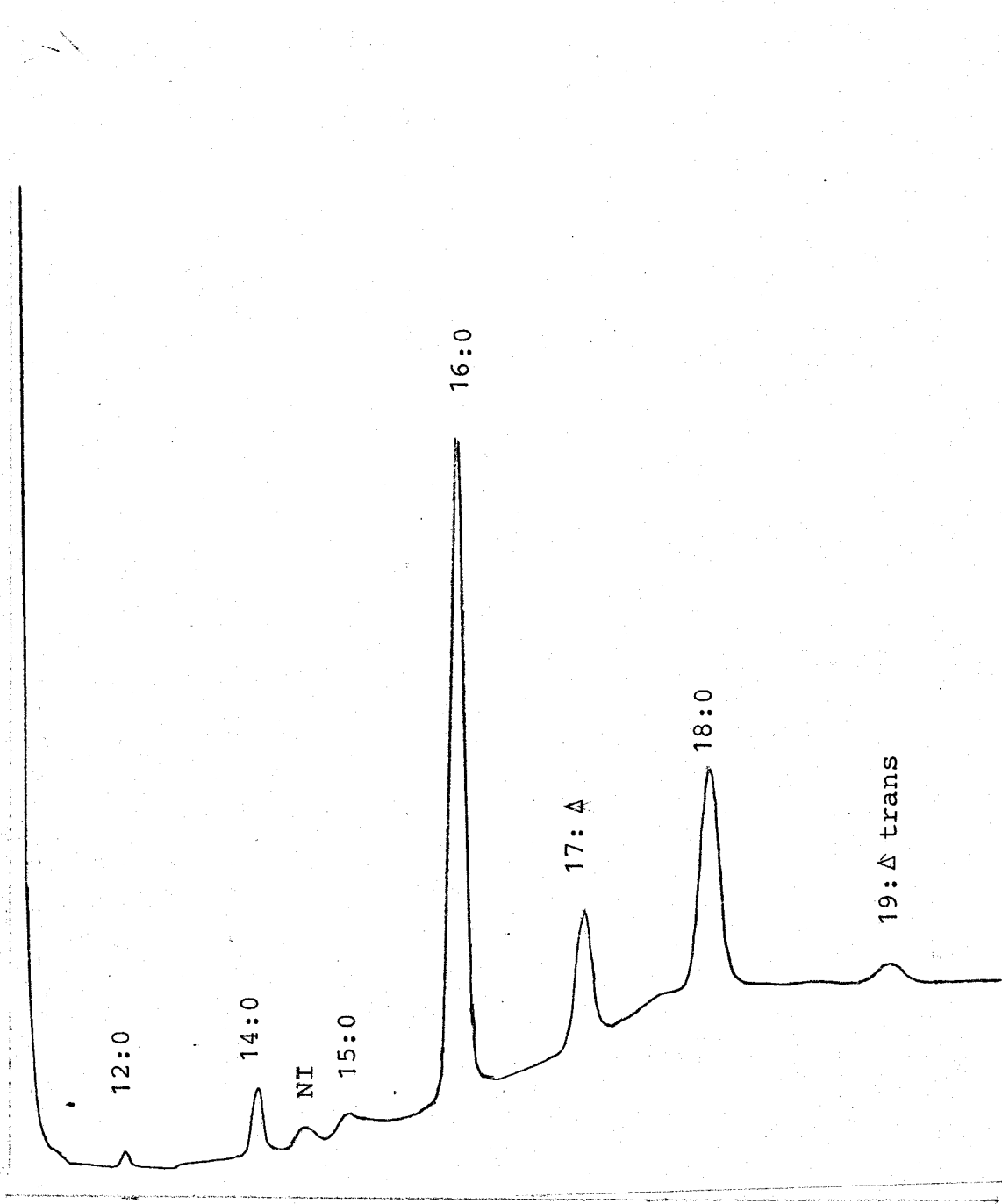


Fig. 6.- Cromatografía líquido-gaseosa de los ácidos grasos esterificados del subgrupo I-5 (Ps.cepacia)

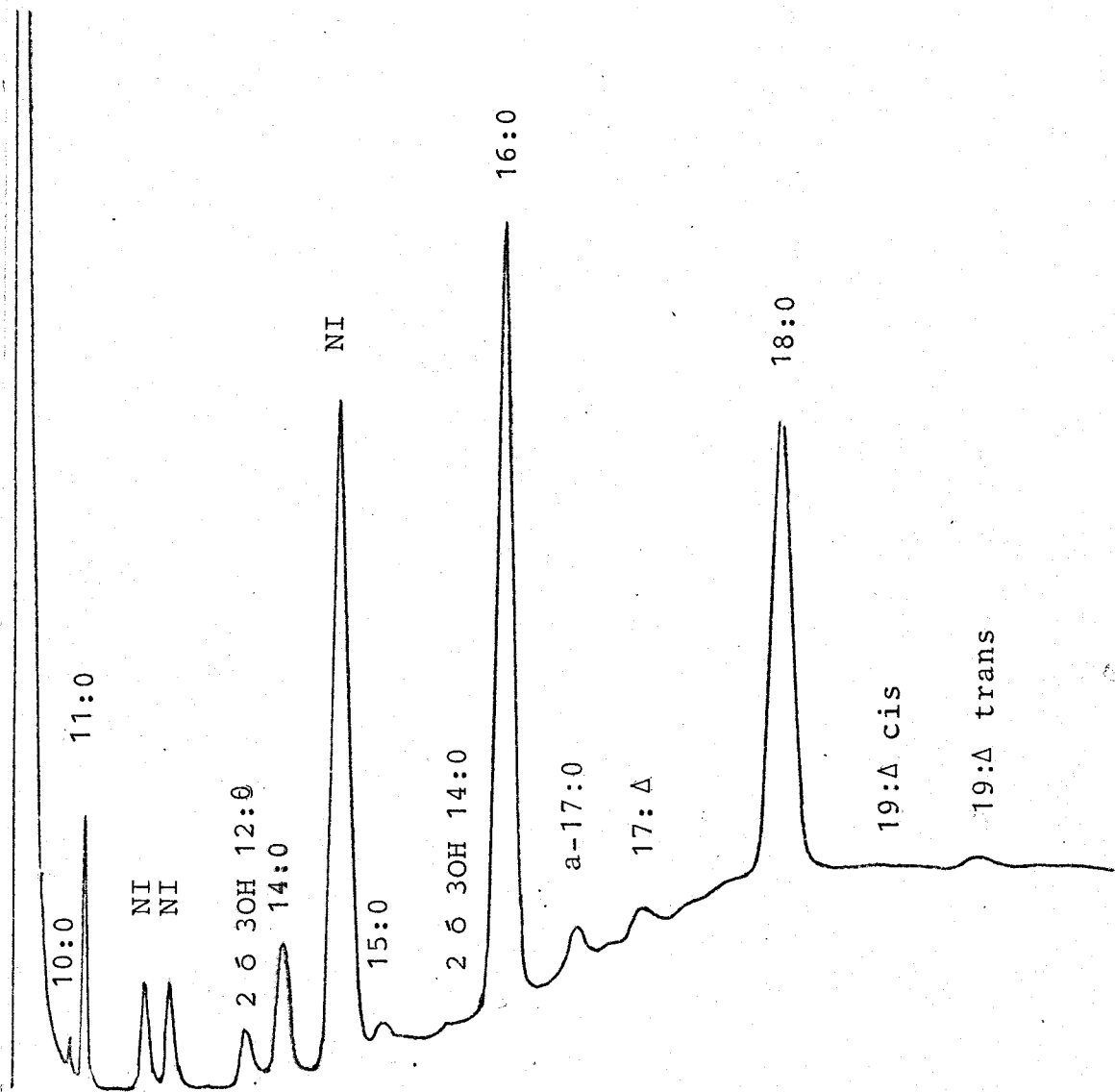


Fig.7.- Cromatografía líquido-gaseosa de los ácidos grasos esterificados del subgrupo I-6 (Ps.maltophilia).

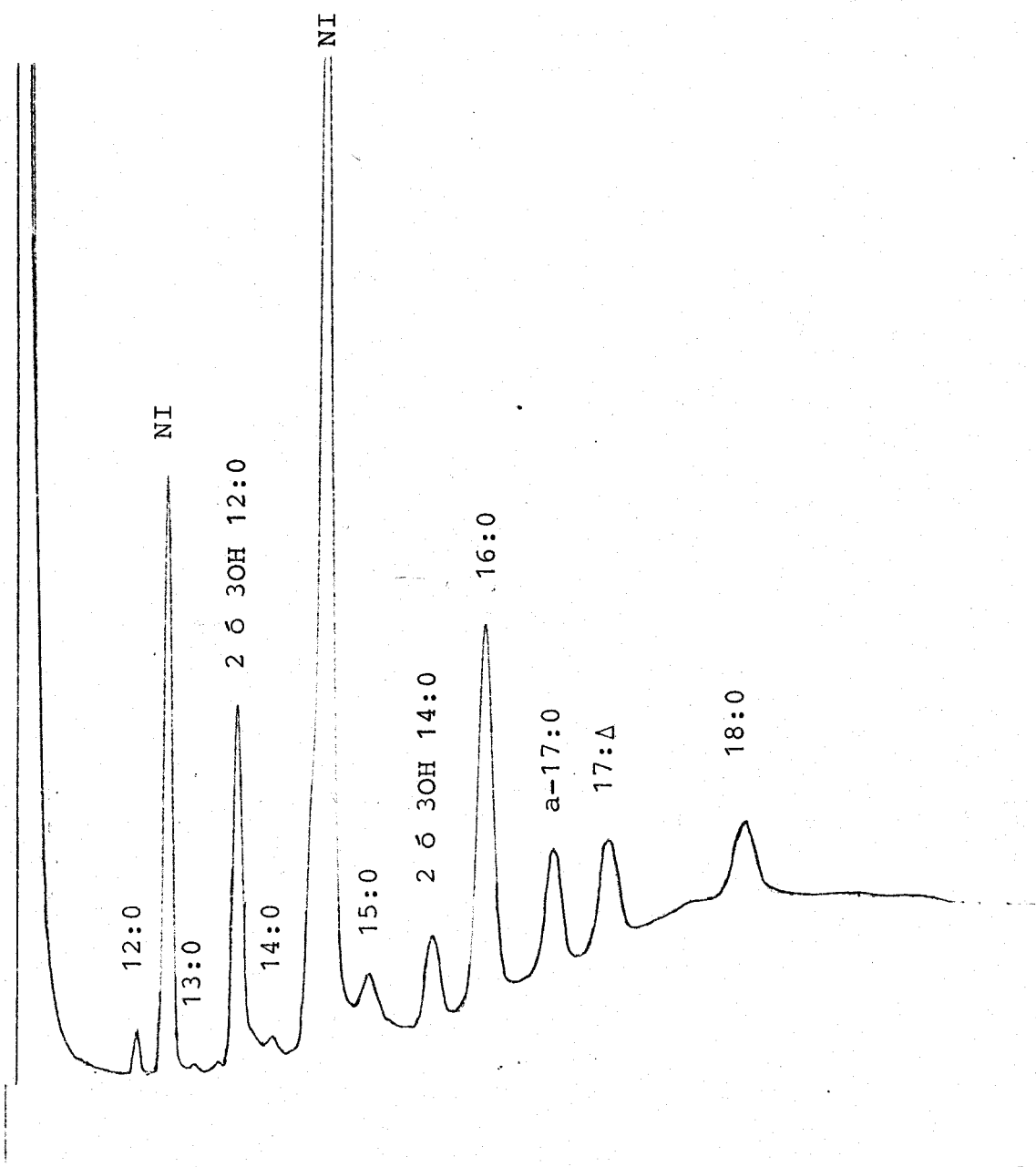


Fig.- 8.- Cromatografía líquido-gaseosa de los ácidos grasos esterificados del subgrupo I-7 (Ps.putrefacciens)

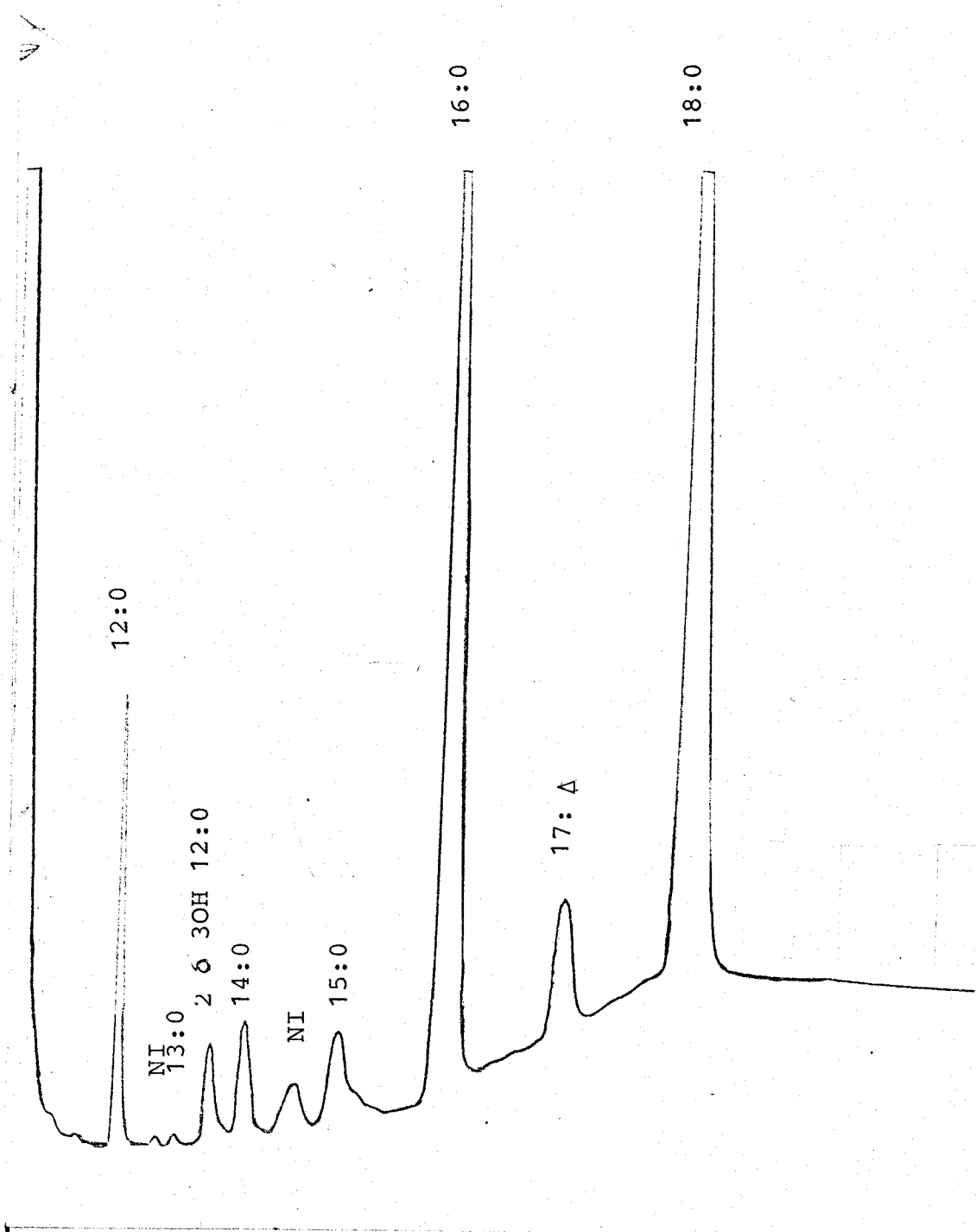


Fig. 9.- Cromatografía líquido-gaseosa de los ácidos grasos esterificados del subgrupo I-8 (Acinetobacter / calcoaceticus var Mima)

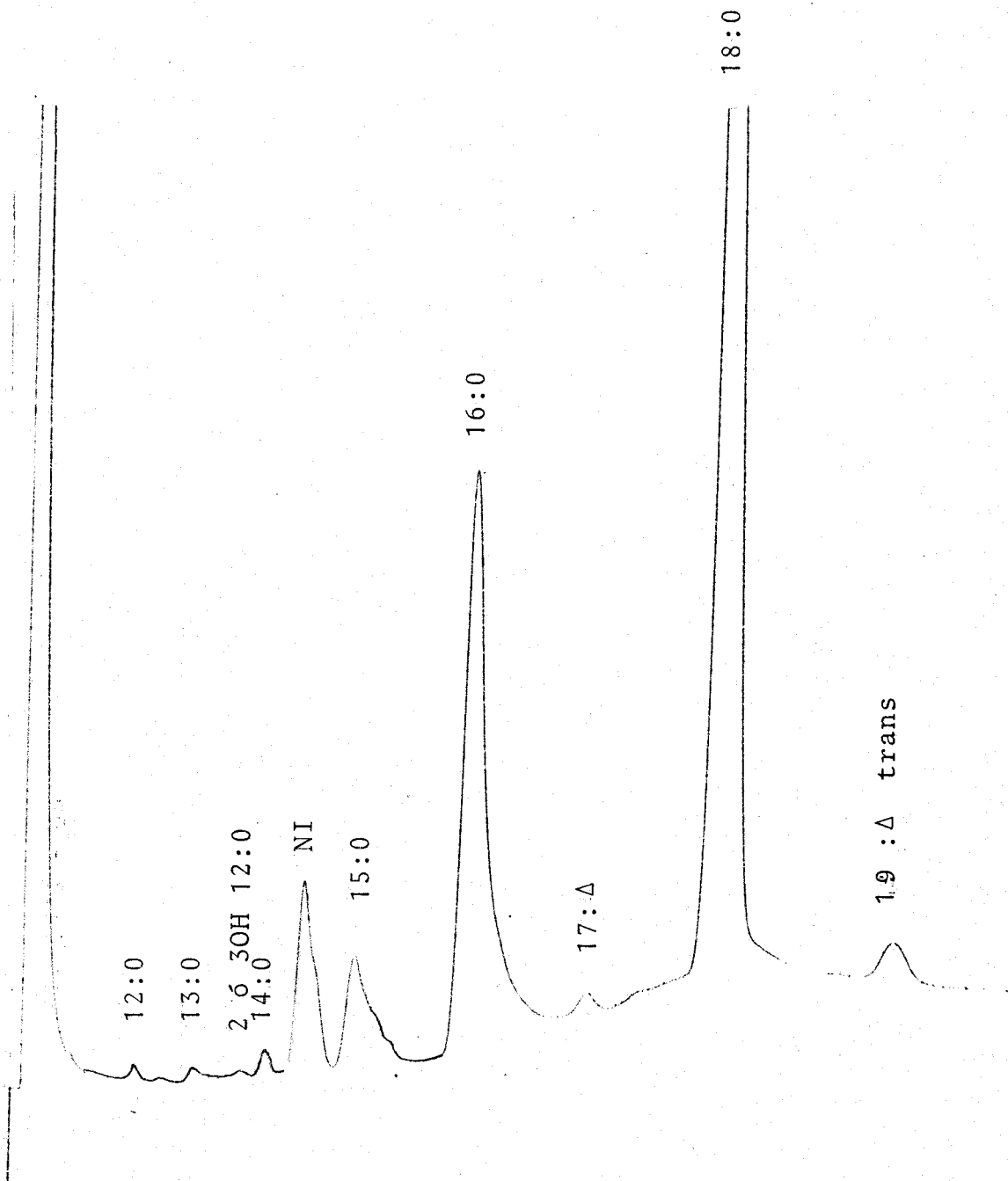


Fig. 10.- Cromatografía líquido-gaseosa de los ácidos grasos esterificados del subgrupo I-9 (Alcaligenes faecalis)

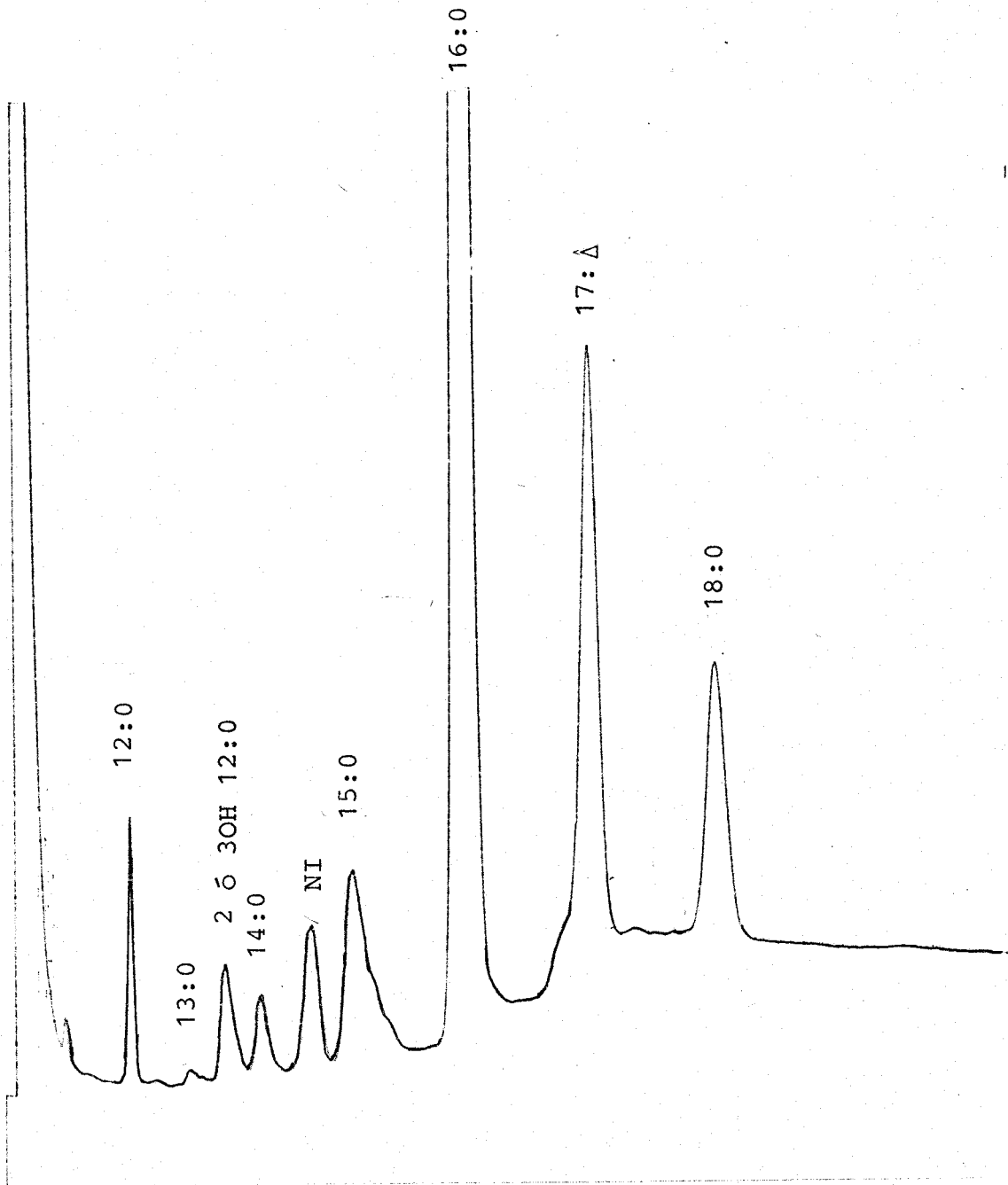


Fig. 11.- Cromatografía líquido-gaseosa de los ácidos grasos esterificados del subgrupo I-10 (Alcalígenes faecalis var odorans).

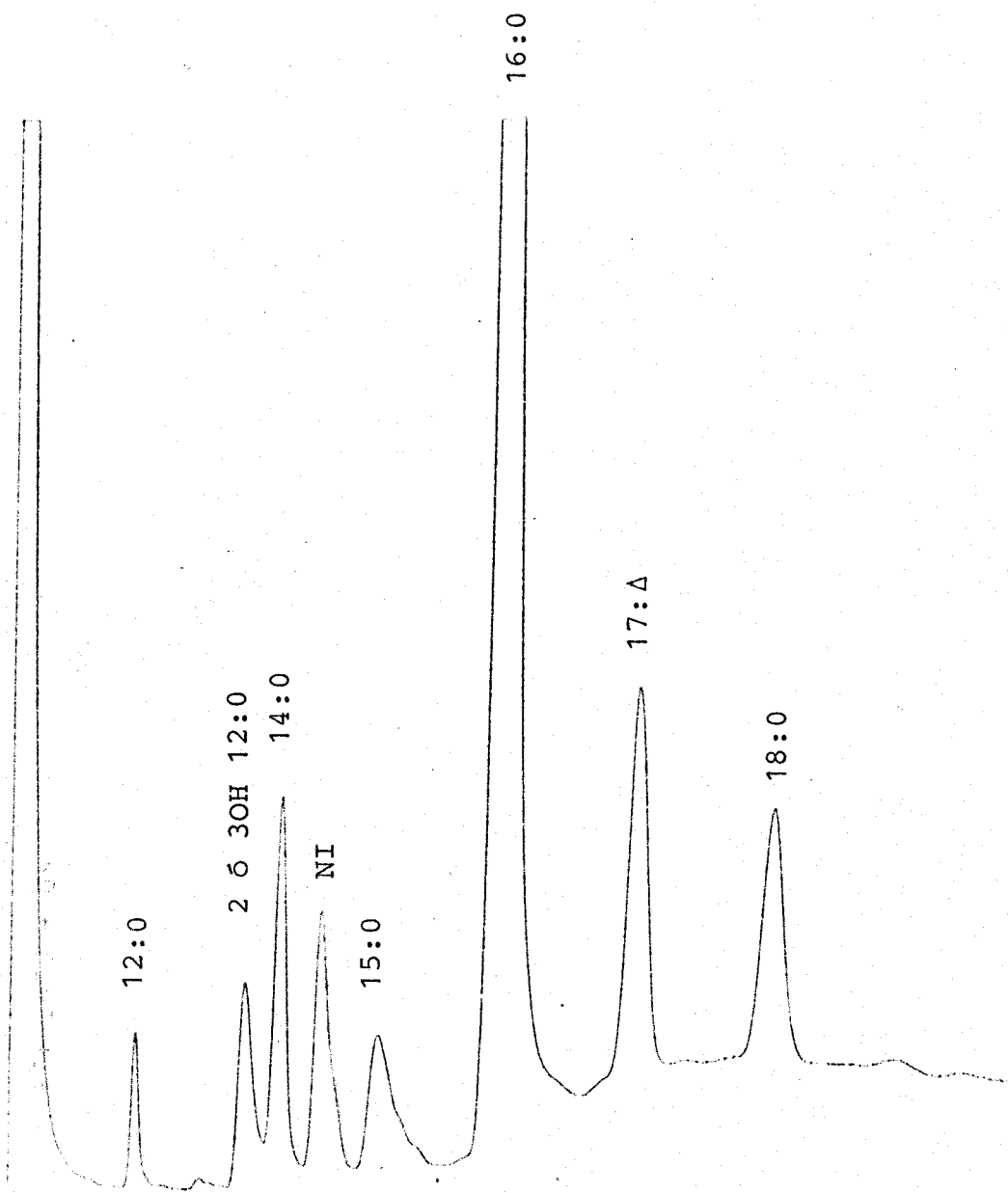


Fig. 12.- Cromatografía líquido-gaseosa de los ácidos grasos esterificados del subgrupo I-11 / (Alcalígenes faecalis var denitrificans).

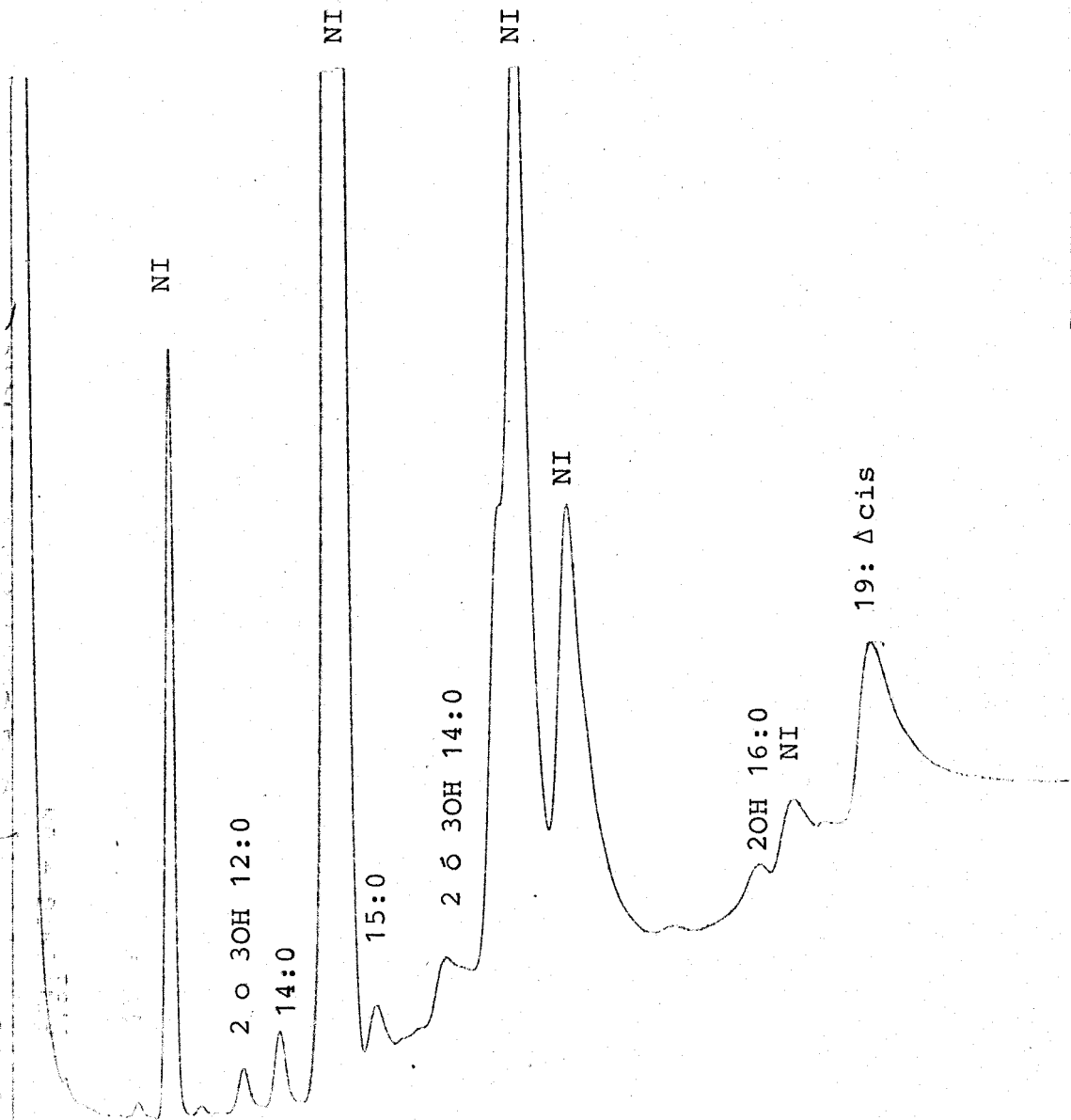


Fig.- 13.- Cromatografía líquido-gaseosa de los ácidos grasos esterificados del subgrupo I-12 / (Flavobacterium meningosepticum).

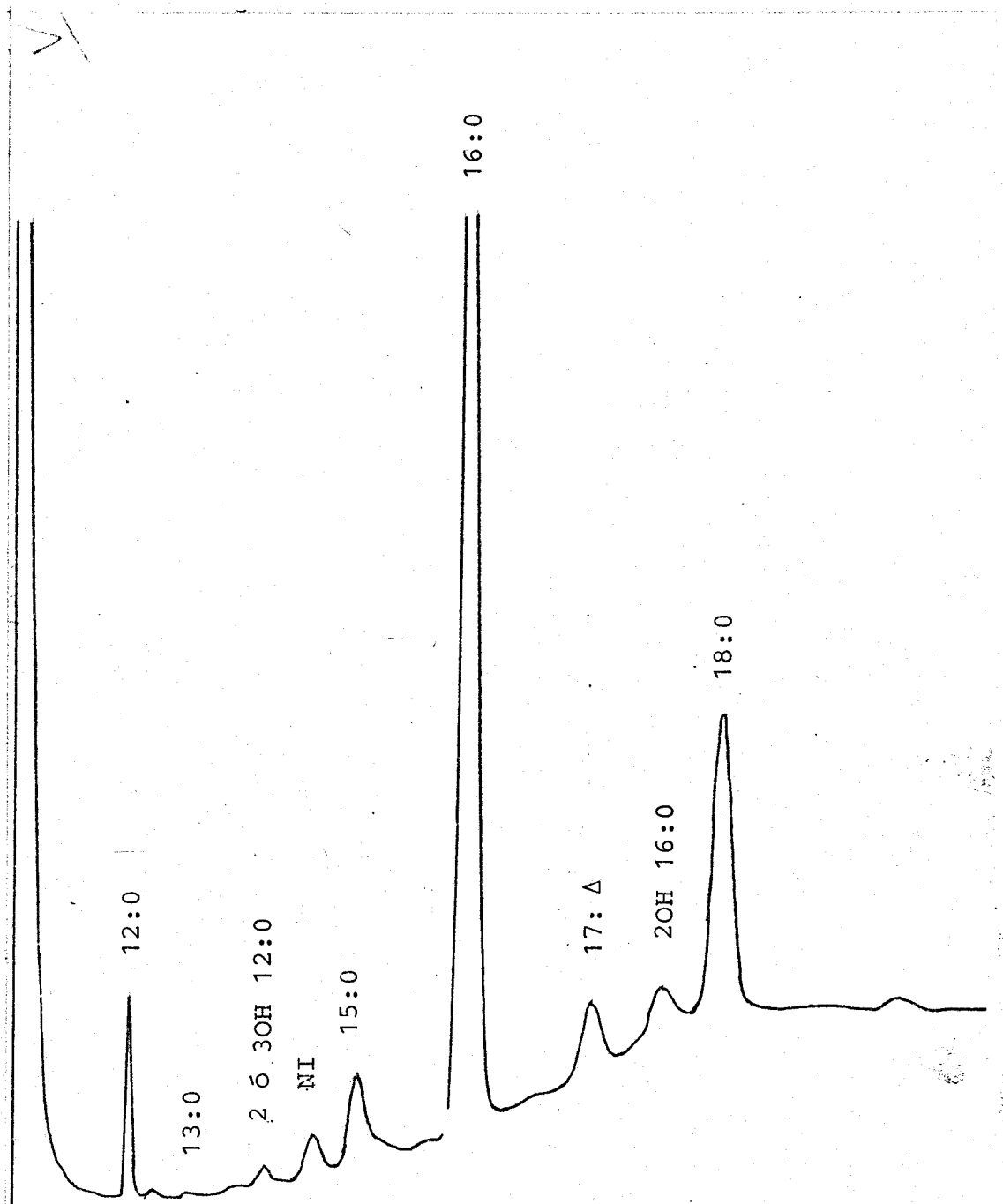


Fig. 14.- Cromatografía líquido-gaseosa de los ácidos grasos esterificados del subgrupo II-1 / (Ps.testosteroni).

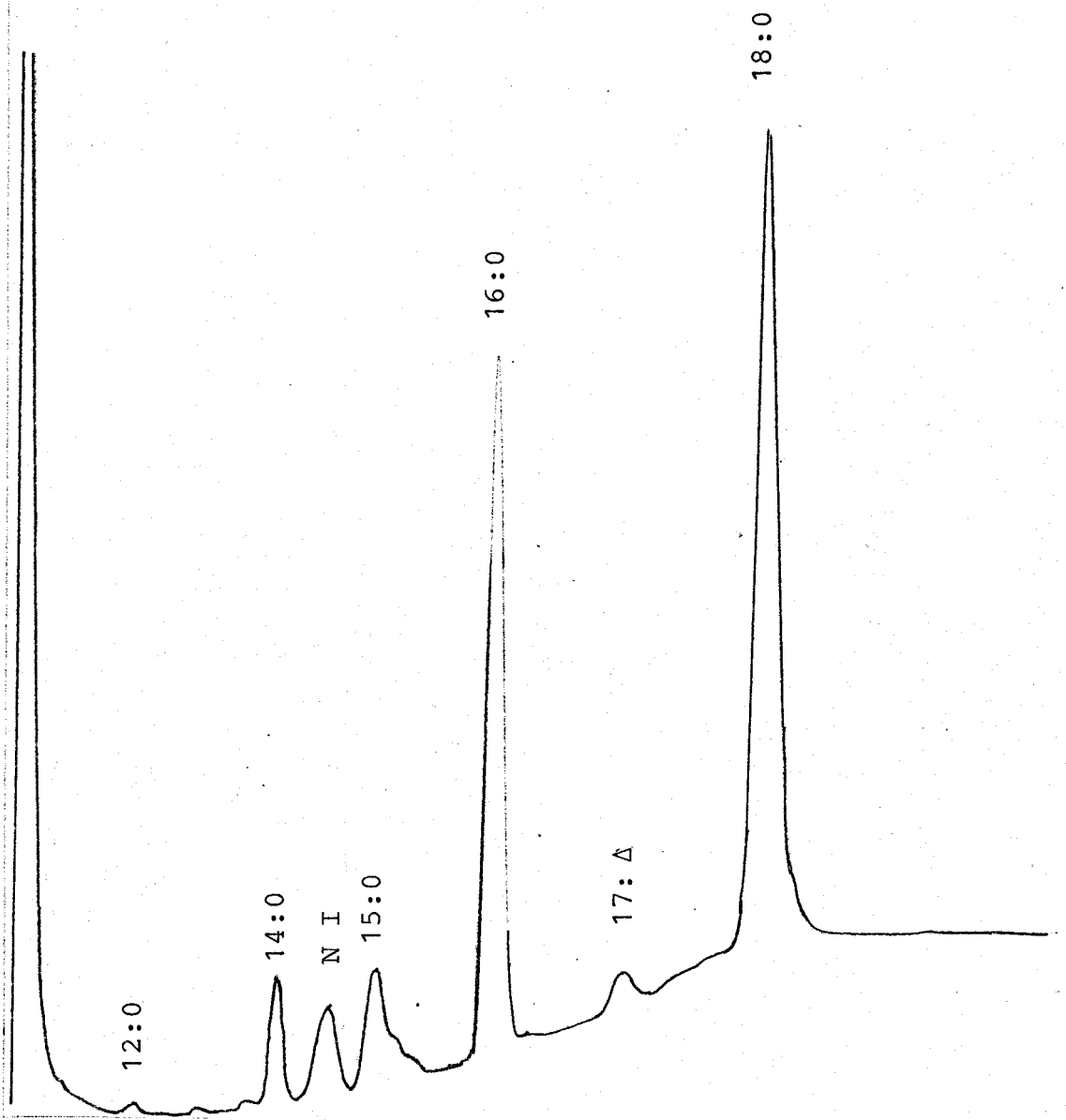


Fig. 15.- Cromatografía líquido-gaseosa de los ácidos grasos esterificados del subgrupo II-2 / (Ps.vesicularis).

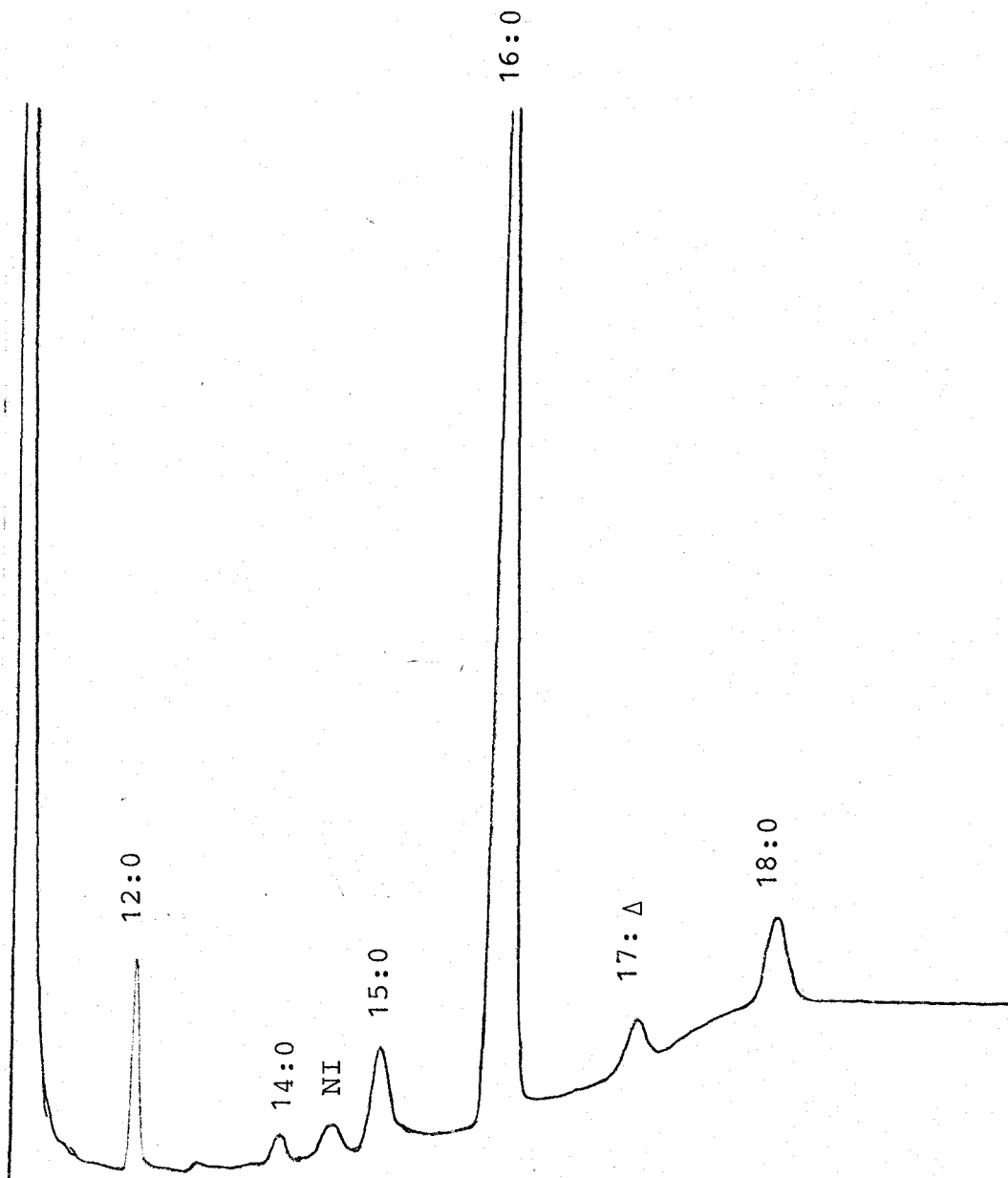


Fig. 16.- Cromatografía líquido-gaseosa de los ácidos grasos esterificados del subgrupo II-3 (Ps. acidovorans).

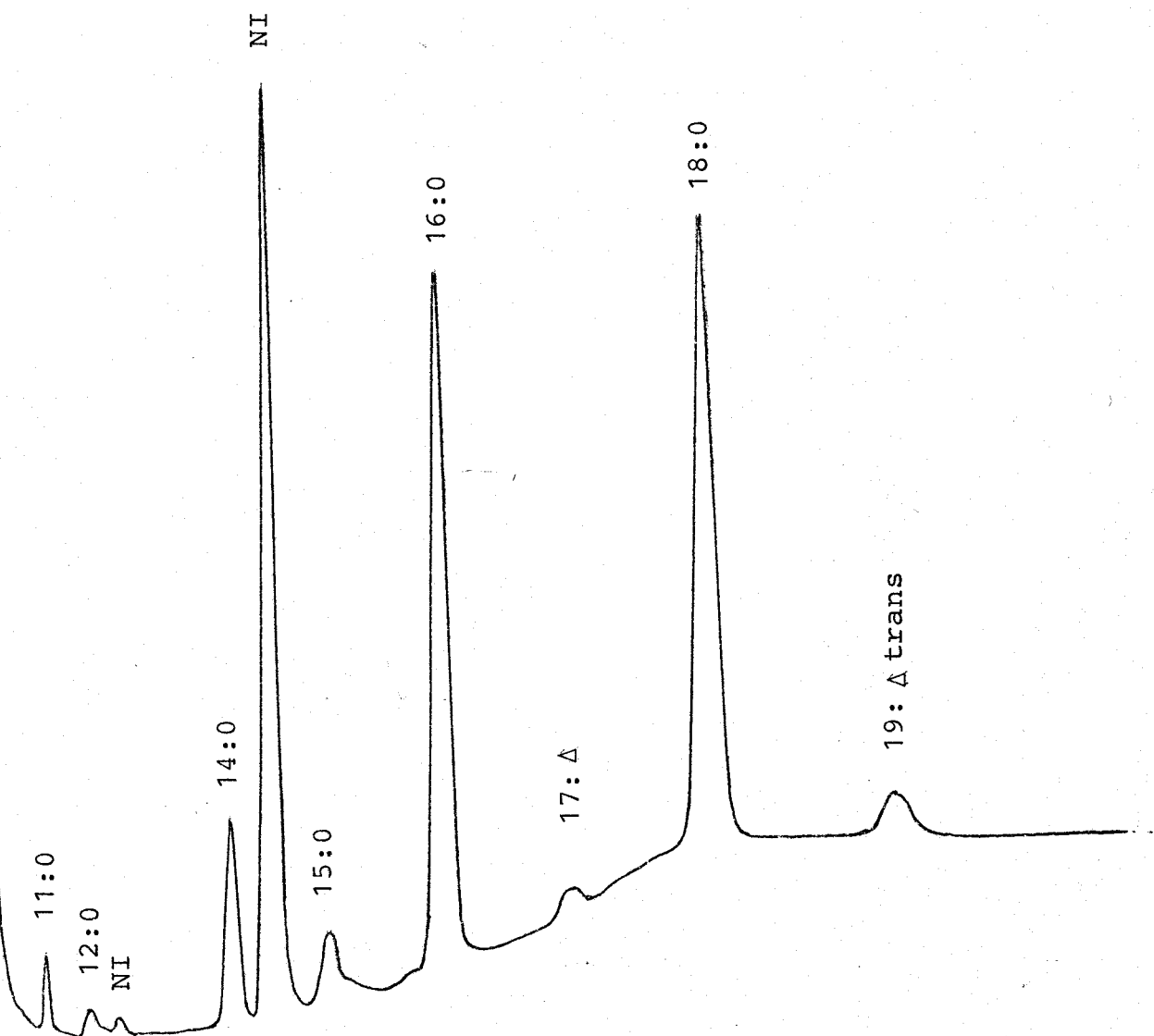


Fig. 17.- Cromatografía líquido-gaseosa de los ácidos grasos esterificados del subgrupo II-4 (Ps. diminuta).

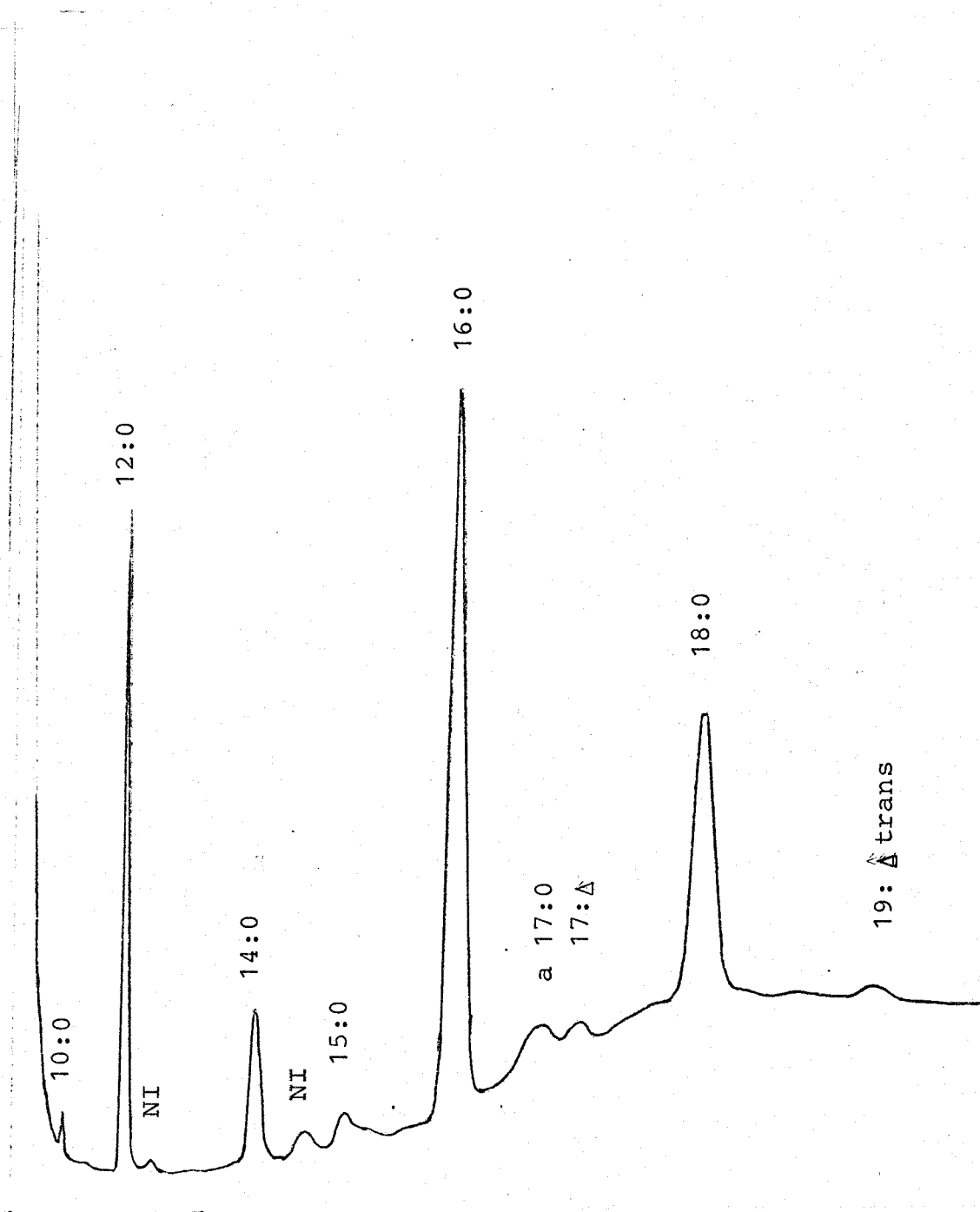


Fig. 18.- Cromatografía líquido-gaseosa de los ácidos grasos esterificados del subgrupo II-5 (Ps.stutzeri).

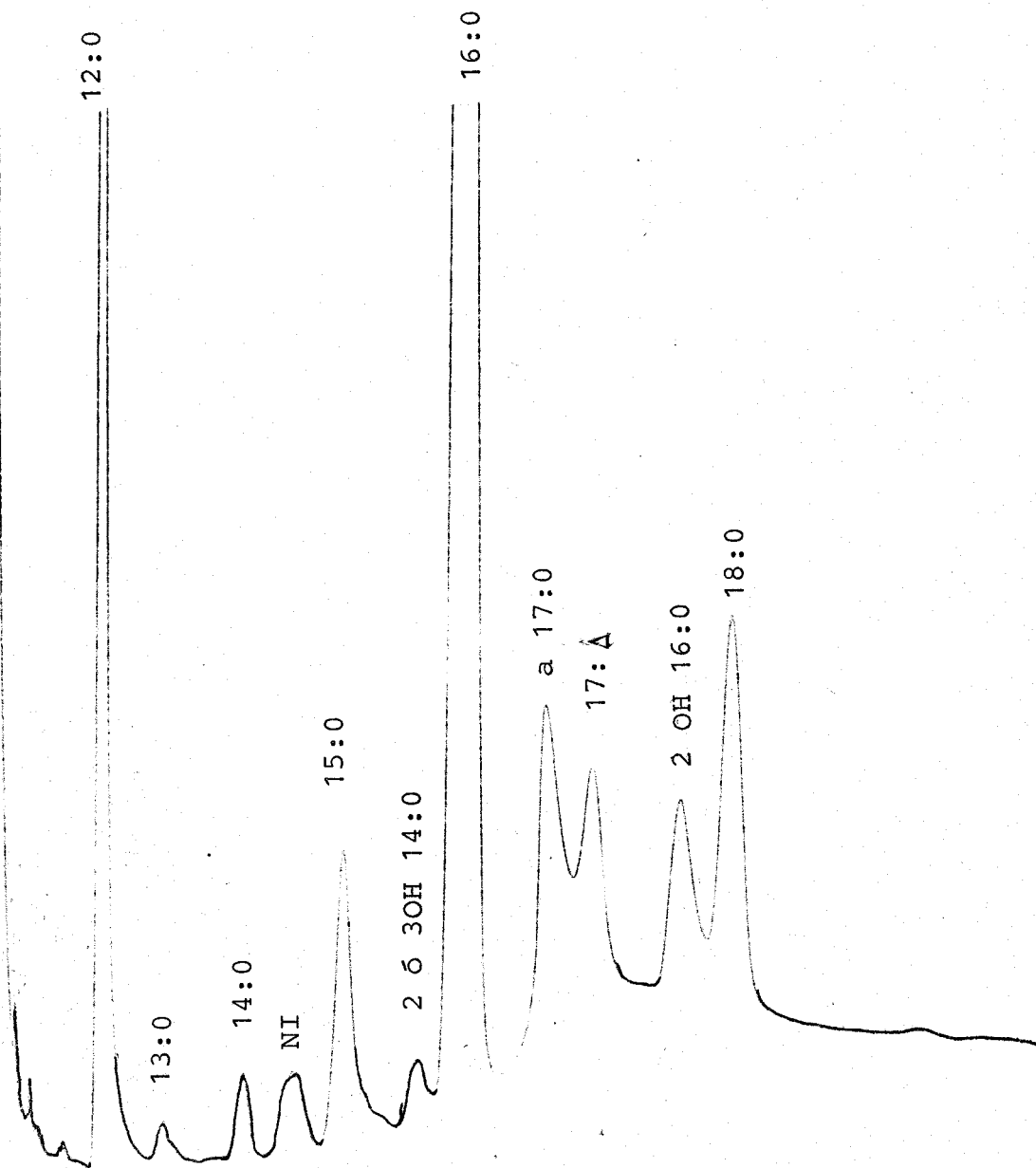


Fig.-19.- Cromatografía líquido-gaseosa de los ácidos grasos esterificados del subgrupo II-6 (Ps.pseudoalcaligenes).

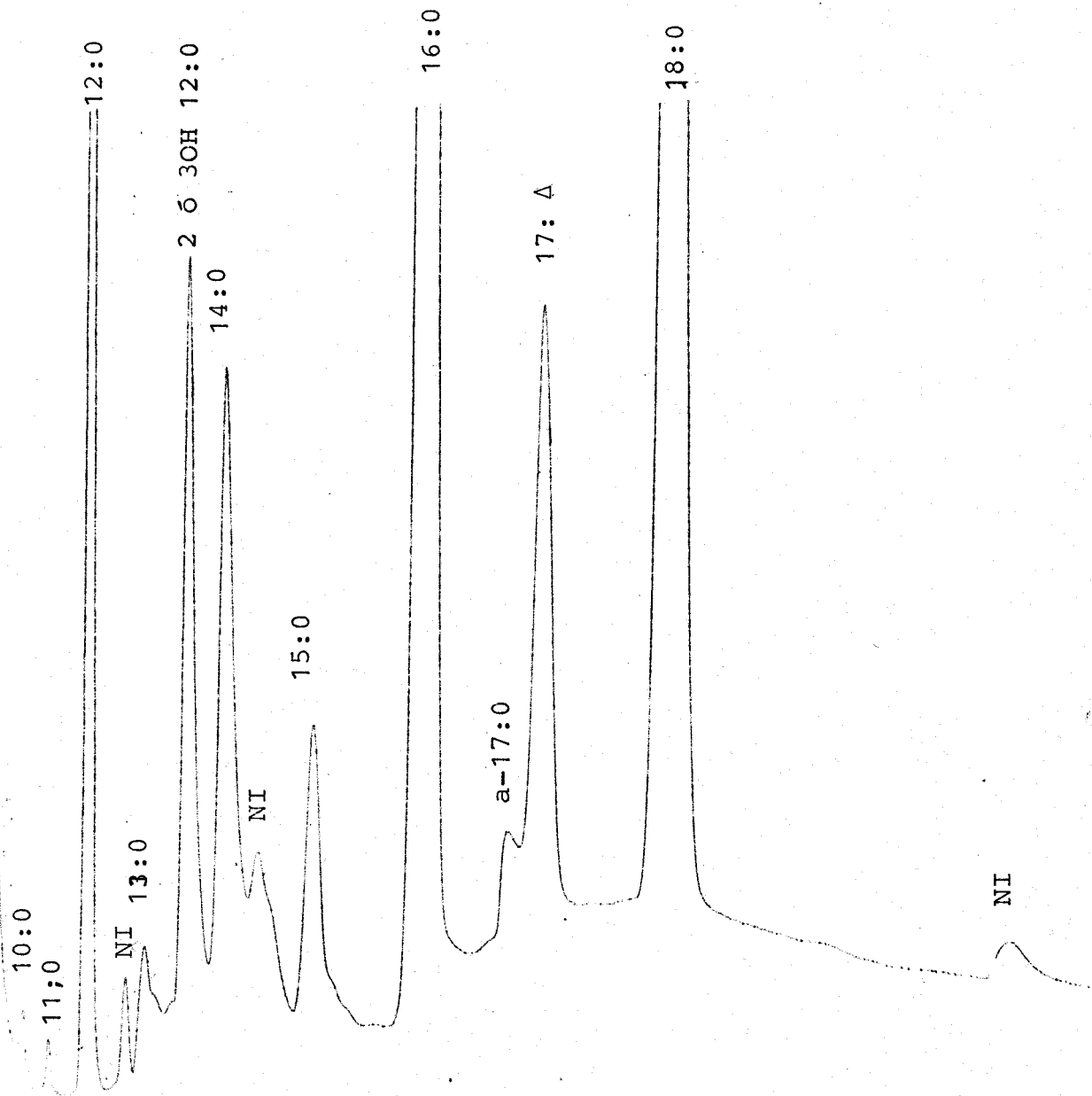


Fig. 20.- Cromatografía líquido-gaseosa de los ácidos grasos / esterificados del subgrupo III-1

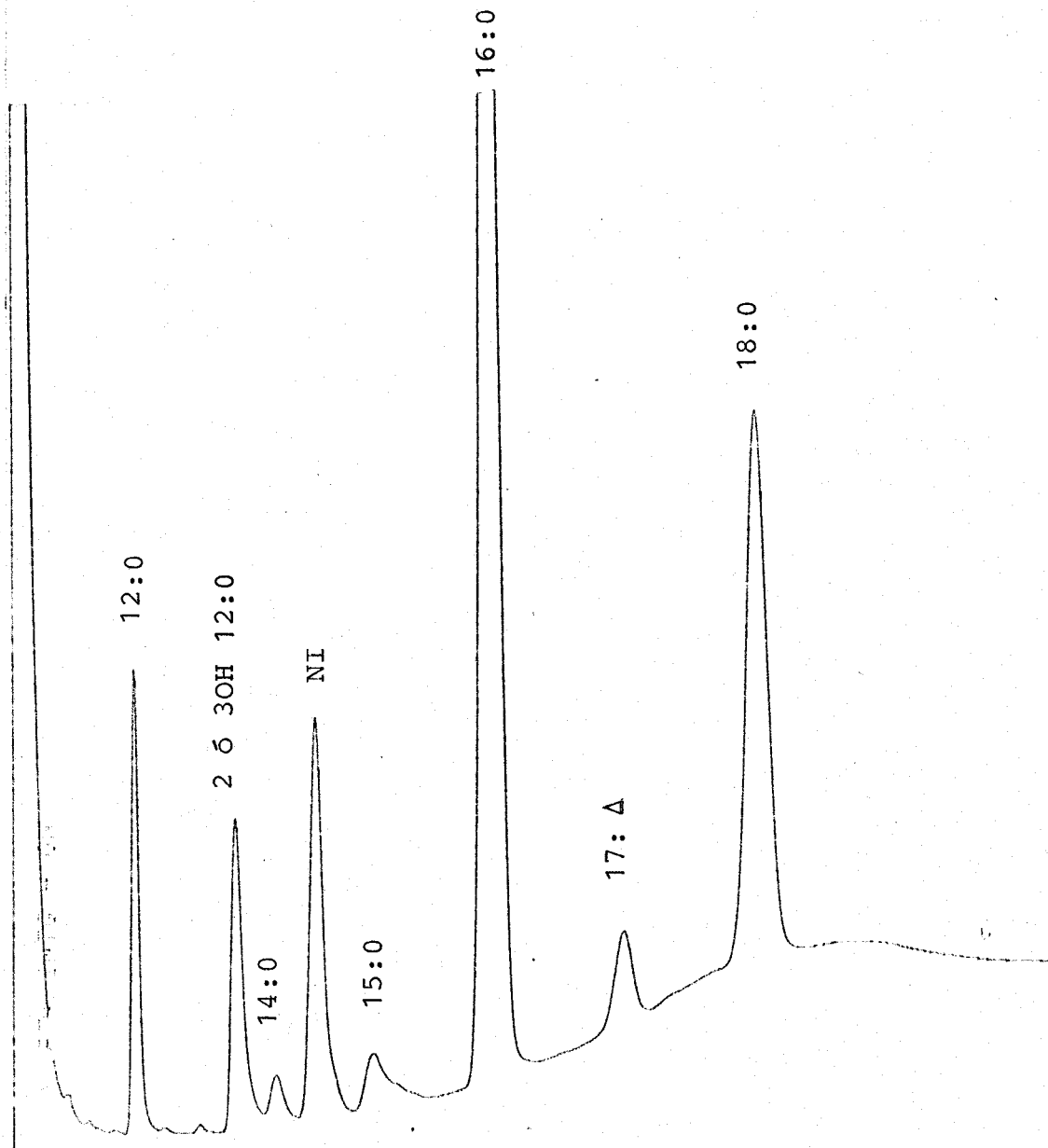


Fig.- 21.- Cromatografía líquido-gaseosa de los ácidos grasos esterificados del subgrupo III-2

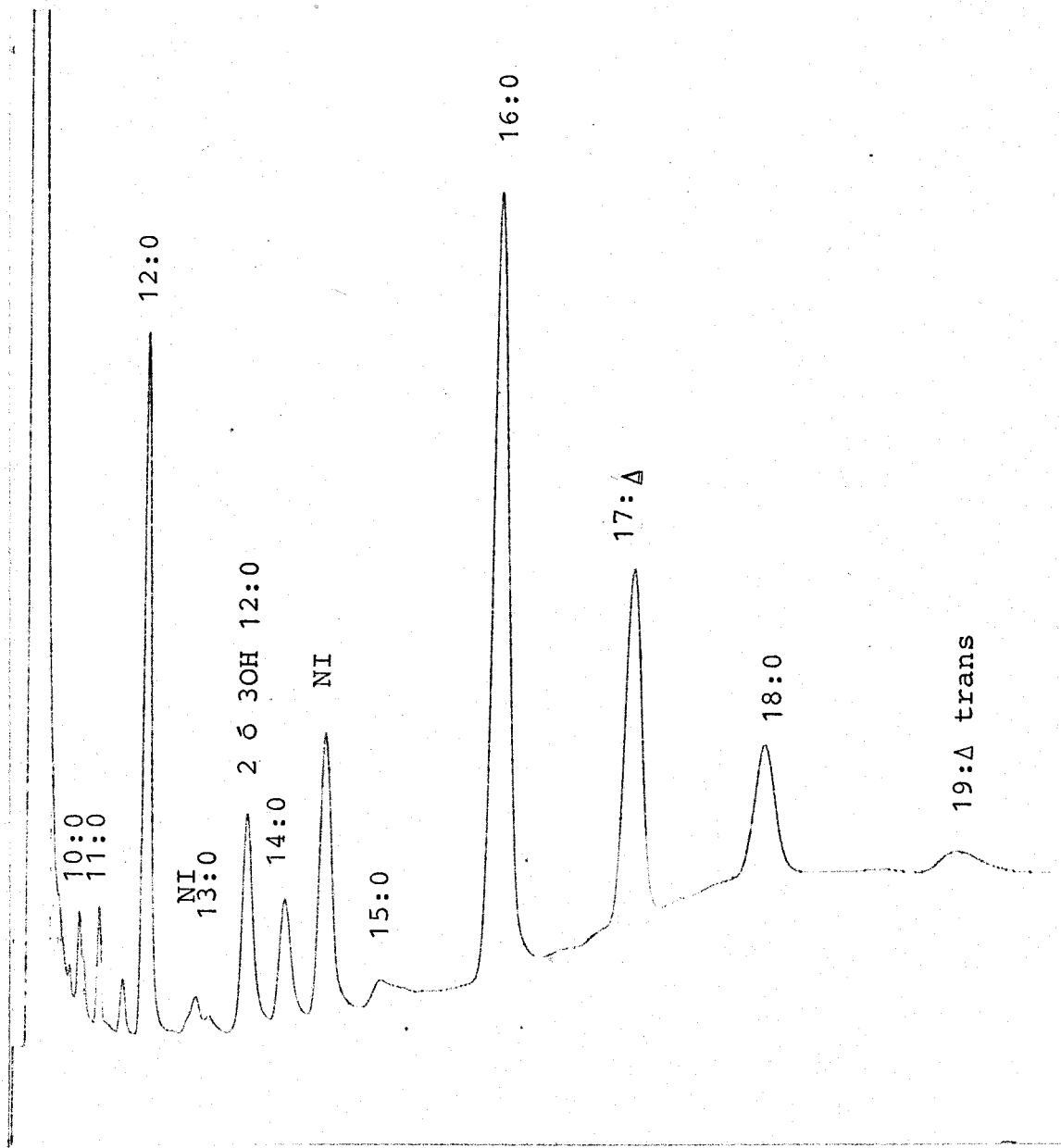


Fig. 22.- Cromatografía líquido-gaseosa de los ácidos grasos esterificados del subgrupo III-3

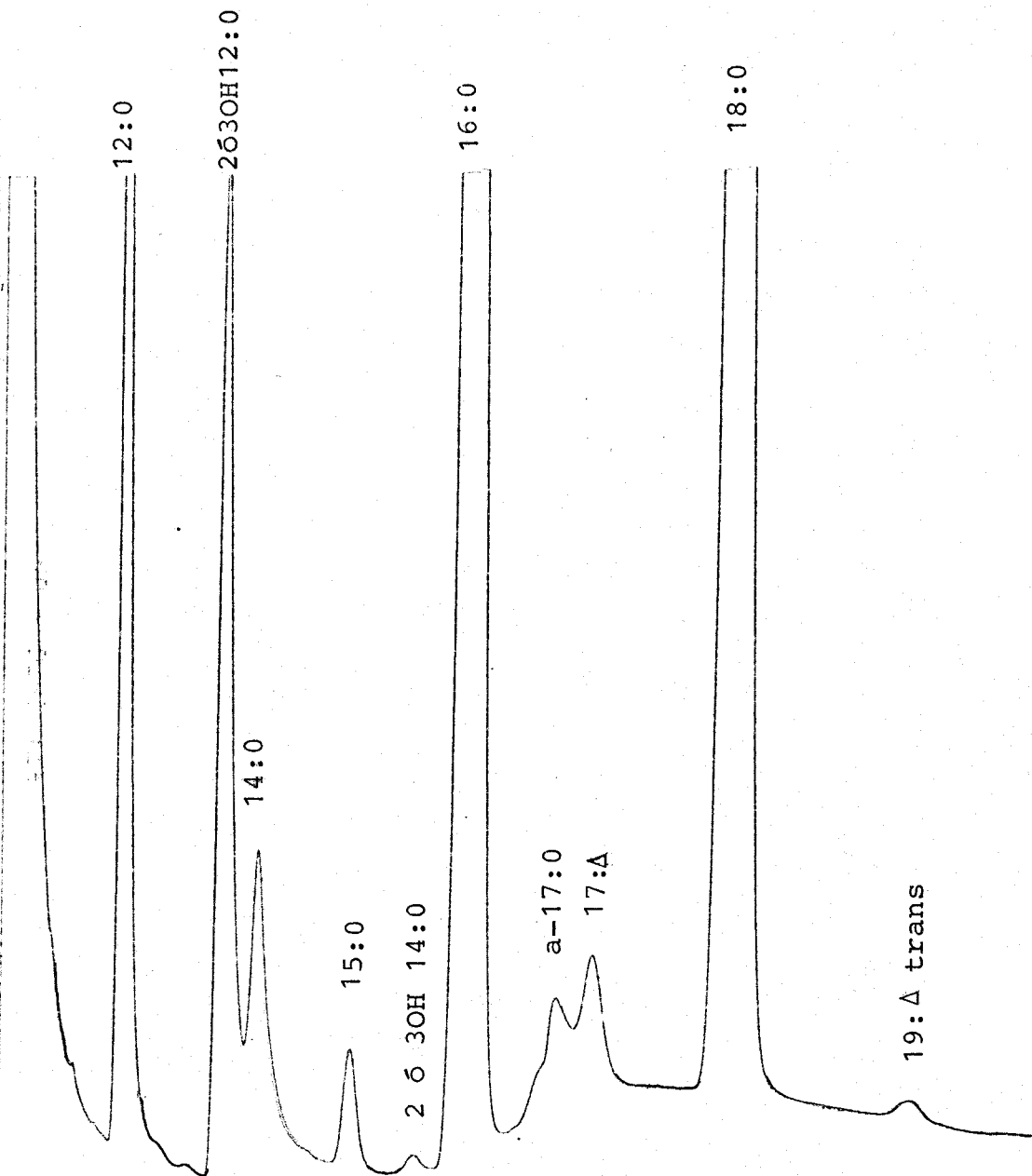


Fig. 23.- Cromatografía líquido-gaseosa de los ácidos grasos esterificados del subgrupo III-4

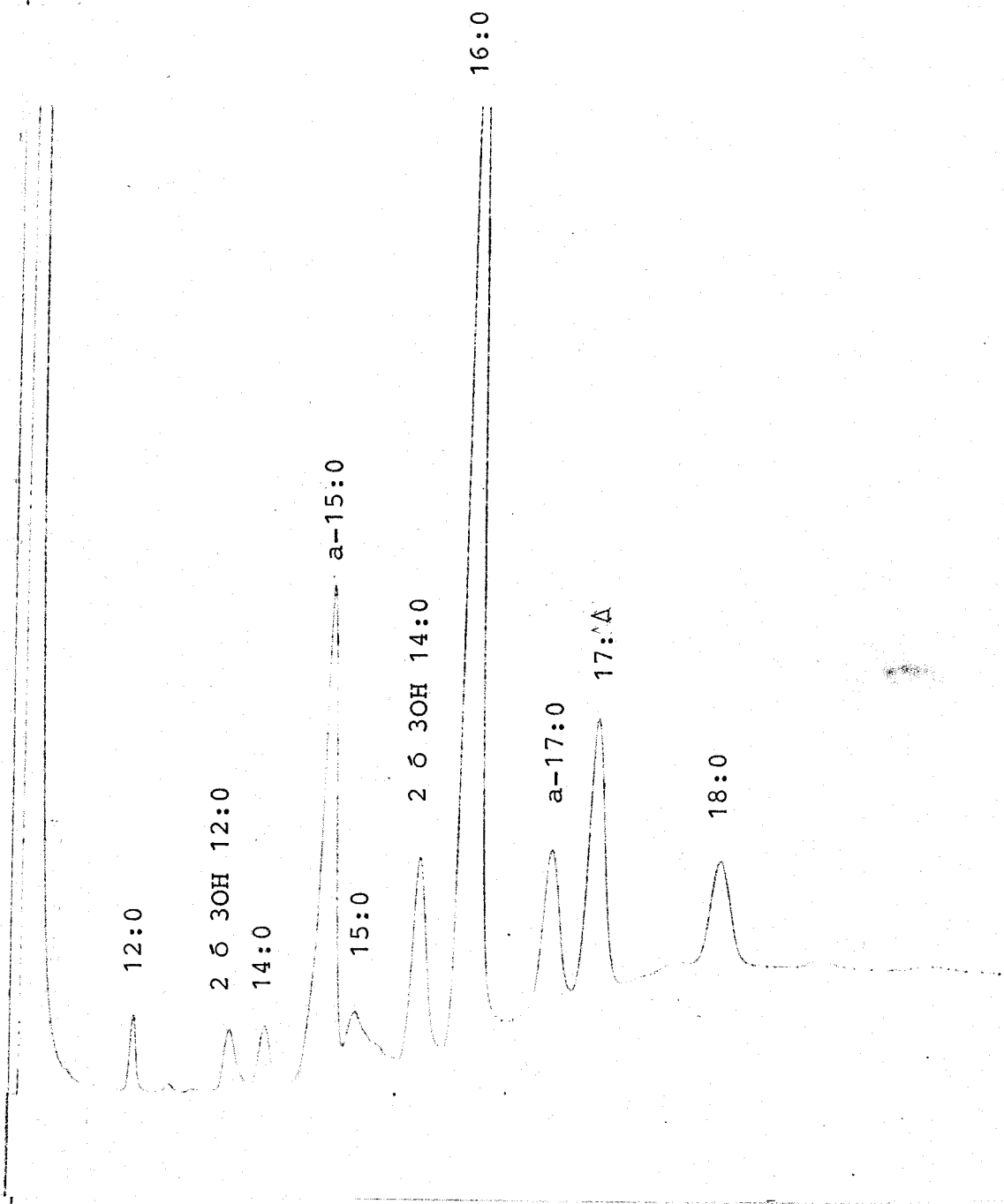


Fig. 24.- Cromatografía líquido-gaseosa de los ácidos grasos esterificados del subgrupo III-5

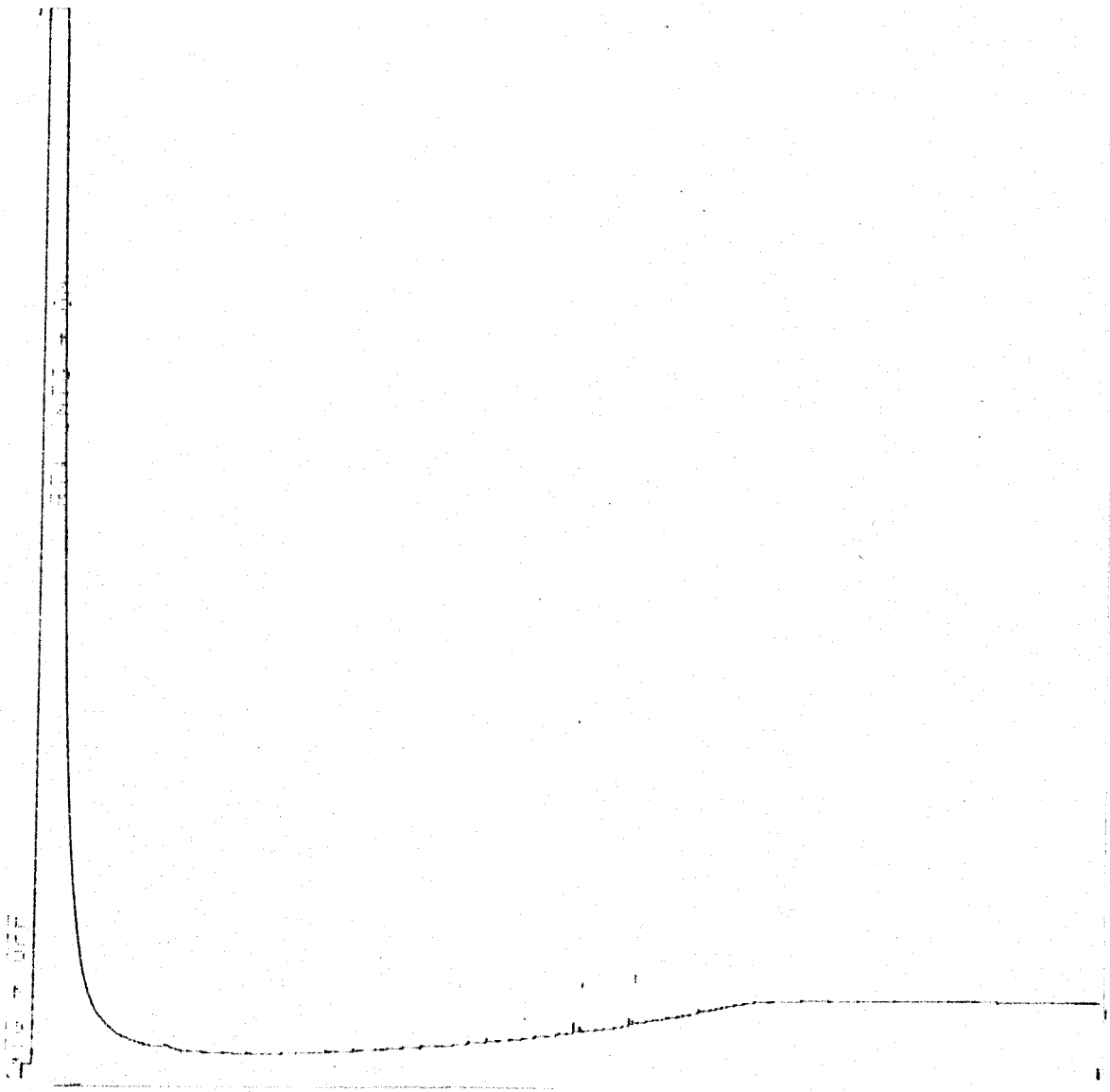


Fig.25.- Cromatografía líquido-gaseosa del medio de cultivo
Trypticosa Soja Agar (TSA).

3.3.- RESULTADOS DE LA SENSIBILIDAD FRENTE A LOS 16 AGENTES ANTIMICROBIANOS ENSAYADOS.-

Se determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de los distintos grupos de BGNNF, previamente establecidos por la identificación bioquímica frente a: Ampicilina, cefuroxima, cefalotina, cefazolina, cefoxitina, moxalactan, cefoperazona, cefotaxime, cefmetazol, azlocilina, sisomicina, ampicilina, gentamicina, tobramicina, colistina y trimetoprim-sulfametoxazol.

Los resultados obtenidos muestran que de todos los antibióticos ensayados los más activos fueron: Cefoperazona, y azlocilina mostrando ambos unos valores de CMI muy similares para todos los grupos ensayados, si bien los valores más bajos / lo presentaron los grupos D (Ps. alcaligenes), G (Ps. putrefac-

ciens ya que el 100% de las cepas ensayadas se inhiben a una concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, mientras que en el grupo L (Flavobacterium) se necesita una concentración mayor de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para que se inhiban el 100% de las cepas (Tablas XVI y XVII).

La actividad de los 4 aminoglicósidos ensayados (sisomicina, amicacina, gentamicina y tobramicina) fué muy similar / frente a todos los grupos, siendo los valores de CMI relativamente bajos, excepto para el grupo E (Ps.cepacia) que muestra valores de CMI altos para todos los aminoglicósidos, menos para la / gentamicina frente a la que el 66'6% de las cepas quedaban inhibidas a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Tablas XVIII, XIX, XX y XXI)

Los valores de CMI obtenidos frente a colistinaa fueron bajos para todos los grupos ensayados, excepto para el E (Ps. cepacia), y L (Flavobacterium) que necesitaron concentraciones superiores a 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para la total inhibición de las cepas (Tabla / XXII).

La actividad de trimetoprim-sulfametoxazol frente a todos los grupos fué similar siendo los valores de CMI más bajos en los grupos G (Ps. putrefacciens), H (Ps.stutzeri) y L (Flavobacterium) ya que el 100% de las cepas se inhibían a la concentración más baja ensayada (Tabla XXIII).

La ampicilina fué poco activa en todos los grupos, a excepción del G(Ps. putrefacciens). La sensibilidad de la cepa del grupo J (Acinetobacter calcoaceticus var. Mima) fue muy variable / (Tabla XXIV).

El resto de los antibióticos ensayados muestran una baja actividad frente a todos los BGNNF ensayados.

Según estos resultados tres de los grupos estudiados: G (Ps. putrefaciens), E (Ps. cepacia) y L (Flavobacterium); presentan un comportamiento homogéneo frente a los antibióticos ensayados, pudiéndose hablar de la existencia de patrones de sensibilidad.

De todos los antibióticos estudiados sólo nos van a ser útiles a este fin 5 : (azlocilina, tobramicina, Sisomicina, colistinas y trimetoprim-sulfametoxazol). (Tabla XXV).

Mientras que los grupos restantes presentan una gran variabilidad de sensibilidad.

Tomando como punto de referencia la concentración de azlocilina 5 $\mu\text{g/ml}$, podemos decir que el 100% de las cepas del grupo G (Ps. putrefaciens) se inhiben a esta concentración, expresamos este resultado como S, mientras que el 100% de las cepas incluidas en los grupos E y G persisten a esta concentración, resultado éste que expresamos como R. (Tabla XXV).

De los aminoglicósidos nos van a ser útiles, sólo la tobramicina y la sisomicina, tomando como referencia la concentración de 2'5 $\mu\text{g/ml}$, observamos que el 100% de las cepas G se inhiben a dicha concentración, (S), mientras que de los grupos E y L ninguna cepa es inhibida a la concentración antes indicada. (R) (Tabla XXV).

En cuanto a la colistina podemos decir, que el 100% de las cepas del grupo G se inhiben a una concentración de 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ que es la tomada como referencia, mientras que los otros dos / grupos necesitan concentraciones mayores (Tabla XXV).

Para el trimetoprim-sulfametoxazol, tomamos como referencia la concentración de 2/40 $\mu\text{g}/\text{ml}$, observando que el 100% de las cepas del grupo G (Ps. putrefaciens) y I (Flavobacterium) quedaban inhibidas a dicha concentración (S), no ocurriendo así con el grupo E (Ps. cepacia) en el que sólo el 66'6% de las cepas se inhibían a esta concentración, es por ello que en la Tabla XXV, expresamos este resultado como variable (V).

- GRUPO A: Ps.aeruginosa
- GRUPO B: Ps.fluorescens
- GRUPO C: Ps.putida
- GRUPO D: Ps.alcalígenes
- GRUPO E: Ps. cepacia
- GRUPO F: Ps.maltophilia
- GRUPO G: Ps.putrefaciens
- GRUPO H: Ps.stutzeri
- GRUPO I: Ps.pseudoalcalígenes
- GRUPO J: Ac.calcoacéticus (Mima)
- GRUPO K: Ac.calcoacéticus (Herellea)
- GRUPO L: Flavobacterium meningosepticum

TABLA XVI
=====

"Sensibilidad de los 12 grupos de BGNNF a Azlocilina".

-	% de cepas inhibidas a CMI ($\mu\text{g/ml}$) de :					
	1	5	10	20	100	> 100
GRUPO-A	3'2 (1)	6'4 (2)	13 (4)	71 (22)	77'4 (24)	100(31)
GRUPO-B				50 (4)	87'5(7)	100(8)
GRUPO-C		9 (1)		72'8 (8)	91 (10)	100(11)
GRUPO-D	16'6(1)	50 (3)	66'6(4)	100 (6)		
GRUPO-E				66'6 (2)	100 (3)	
GRUPO-F		12'5 (1)		50 (4)	75 (6)	100 (8)
GRUPO-G		100 ((3)				
GRUPO-H		33'3 (1)		100 (3)		
GRUPO-I	62'5(5)	75 (6)			87'5(7)	100 (8)
GRUPO-J	6'6(1)		13'3(2)	66'6(10)	86'6(13)	100(15)
GRUPO-K			22'2(2)	44'4(4)	100 (9)	
GRUPO-L					33'3 (1)	100 (3)
-Entre paréntesis se expresa el número de cepas-						

TABLA XVII

"Sensibilidad de los 12 grupos de BGNNF a Cefoperazona"

-	% acumulación de los valores CMI $\mu\text{g/ml}$ de:					
-	1	5	10	20	100	> 100
GRUPO-A	3'2 (1)	51'6(16)	67'7(21)	87 (27)	100 (31)	
GRUPO-B		50 (4)	62'5(5)		100 (8)	
GRUPO-C	9 (1)	45'5(5)	63'6(7)	72'7(8)	81'8 (9)	100(11)
GRUPO-D	16'6(1)	100 (6)				
GRUPO-E		33'3 (1)	66'6(2)	100 (3)		
GRUPO-F		50 (4)		75 (6)	100 (8)	
GRUPO-G	100(3)					
GRUPO-H	33'3(1)	100(3)				
GRUPO-I	25 (2)	75(6)		100 (8)		
GRUPO-J	6'6 (1)	40(6)	53'3(8)	66'6(10)	100(15)	
GRUPO-K		44'4(4)		55'5(5)	100 (9)	
GRUPO-L					33'3(1)	100 (3)

-Entre paréntesis se expresa el número de cepas.

TABLA XVIII
=====

"Sensibilidad de los 12 grupos de BGNNF a Gentamicina"

-	% de cepas inhibidas a CMI ($\mu\text{g/ml}$) de:				
	1	2'5	5	10	> 10
GRUPO-A	6'4 (2)	25'8 (8)	54'8(17)	83'8(26)	100 (31)
GRUPO-B	37'5 (3)	37'5 (3)	75 (6)	87'5 (7)	100 (8)
GRUPO-C	54'5 (6)	72'8 (8)	91 (10)		100 (11)
GRUPO-D	16'6 (1)	50 (3)	83'3 (5)		100 (6)
GRUPO-E	66'6 (2)				100 (3)
GRUPO-F	12'5 (1)	50 (4)			100 (8)
GRUPO-G	100 (3)				
GRUPO-H	33'3 (1)			100 (3)	
GRUPO-I	25 (2)		50 (4)		100 (8)
GRUPO-J	33'3 (5)	60 (9)	73'3(11)	80 (12)	100 (15)
GRUPO-K	44'4 (4)	55'5 (5)	66'6 (6)		100 (9)
GRUPO-L					100 (3)

-Entre paréntesis se expresa el número de cepas.

TABLA XIX

=====

"Sensibilidad de los 12 grupos de BGNNF a Tobramicina"

-	% de cepas inhibidas a CMI ($\mu\text{g/ml}$) de:				
	1	2'5	5	10	> 10
GRUPO-A	25'8 (8)	58 (18)	77'4(24)	100 (31)	
GRUPO-B	25 (2)	75 (6)		100 (8)	
GRUPO-C	73 (8)		82 (9)	91 (10)	100 (11)
GRUPO-D	16 (1)	33'3 (2)	50 (3)	66'6 (4)	100 (6)
GRUPO-E					100 (3)
GRUPO-F	37'5 (3)	50 (4)			100 (8)
GRUPO-G	100 (3)				
GRUPO-H	33'3 (1)	66'6 (1)			100 (3)
GRUPO-I	12'5 (1)	25 (2)	50 (4)		100 (8)
GRUPO-J	40 (6)	66'6(10)	73'3 (11)	80 (12)	100 (15)
GRUPO-K	55'5 (5)	66'6(6)	77'7 (7)	88'8 (8)	100 (9)
GRUPO-L					100 (3)
-Entre paréntesis se expresa el número de cepas.					

TABLA XX

"Sensibilidad de los 12 grupos de BGNNF a Amicacina"

-	% de cepas inhibidas a CMI ($\mu\text{g/ml}$) de :				
	1	5	10	100	> 100
GRUPO-A	32'2 (10)	67'7(21)	87 (27)	100 (31)	
GRUPO-B	25 (2)	75 (6)	100 (8)		
GRUPO-C	63'6 (7)	81'8 (9)	91 (10)		100 (11)
GRUPO-D		50 (3)	66'6 (4)		100 (6)
GRUPO-E			33'3 (1)		100 (3)
GRUPO-F	37'5(3)	50 (4)			100 (8)
GRUPO-G	33'3 (1)	100 (3)			
GRUPO-H		66'6 (2)			100 (3)
GRUPO-I	12'5 (1)	50 (4)	75 (6)		100 (8)
GRUPO-J	53'3 (8)	80 (12)	93'3(14)	100 (15)	
GRUPO-K	44'4 (4)	88'9 (8)		100 (9)	
GRUPO-L		33'3 (1)		66'6(2)	100 (3)

-Entre paréntesis se expresa el número de cepas.

TABLA XXI
=====

"Sensibilidad de los 12 grupos de BGNNF a Sisomicina

-	% de cepas inhibidas a CMI ($\mu\text{g/ml}$) de:				
	1	2'5	5	10	> 10
GRUPO-A	19'3(6)	61'2(19)	83'8(26)		100 (31)
GRUPO-B	37'5(3)	62'5 (5)	87'5 (7)		100 (8)
GRUPO-C	72'8(8)	81'8 (9)	91 (10)		100 (11)
GRUPO-D	16'6(1)	33'3 (2)	50 (3)		100 (6)
GRUPO-E				33'6 (1)	100 (3)
GRUPO-F	37'5(3)	50' (4)			100 (8)
GRUPO-G	100 (3)				
GRUPO-H	33'3(1)	66'6 (2)			100 (3)
GRUPO-I	37'5(3)	50 (4)			100 (8)
GRUPO-J	53'3(8)		86'6 (13)	93'3(14)	100 (15)
GRUPO-K	44'4(4)	55'5 (5)	66'6 (6)	88'8 (8)	100 (9)
GRUPO-L					100 (3)

Entre paréntesis se expresa el número de cepas.

TABLA XXII
=====

"Sensibilidad de los 12 grupos de BGNNF a Colistina".

-	% de cepas inhibidas a CMI ($\mu\text{g/ml}$) de :					
	1	2	4	8	16	>16
GRUPO-A			19'3(6)	80'6(25)		100(31)
GRUPO-B			33'3(3)	55'5(5)	75 (6)	100 (8)
GRUPO-C		9 (1)	27'3(3)	91 (10)		100(11)
GRUPO-D			33'3(2)	83'3(5)		100(6)
GRUPO-E						100(3)
GRUPO-F			37'5(3)	50(4)	100 (8)	
GRUPO-G			33'3(1)	100 (3)		
GRUPO-H			35'3(1)	100 (3)		
GRUPO-I				50(4)		100 (8)
GRUPO-J	6'6(1)	13'3(2)	33'3(5)	80(2)		100(15)
GRUPO-K			62'5(5)	100 (8)		
GRUPO-L					33'3(1)	100(3)

-Entre paréntesis se expresa el número de cepas.

TABLA XXIII

=====

"Susceptibilidad de BGNNF a Trimetoprim-sulfametoxazol".

-	% de cepas inhibidas a CMI / ($\mu\text{g/ml}$ de :)		
	2/40	40/200	> 40/200
GRUPO-A	29 (9)	83'8(26)	100 (31)
GRUPO-B	86'5 (7)	100 (8)	
GRUPO-C	54'5 (6)		100 (11)
GRUPO-D	66'6 (4)	83'3(5)	100 (6)
GRUPO-E	66'6 (2)		100 (3)
GRUPO-F	83'3 (5)		100 (8)
GRUPO-G	100 (3)		
GRUPO-H	100 (3)		
GRUPO-I	86'5 (7)	100 (8)	
GRUPO-J	60 (9)	80 (12)	100 (5)
GRUPO-K	88'8(8)	100 (9)	
GRUPO-L	100 (3)		
Entre paréntesis se expresa el número de cepas.			

TABLA XXIV
=====

"Susceptibilidad de BGNNF a Ampicilina"

±	% de cepas inhibidas a CMI (µg/ml) de:					
	1	2'5	5	10	20	> 20
GRUPO-A						100 (31)
GRUPO-B						100 (8)
GRUPO-C				9 (1)		100 (11)
GRUPO-D			16'6(1)			100 (6)
GRUPO-E						100 (3)
GRUPO-F	16'6(1)					100 (8)
GRUPO-G	33'3(1)	100 (3)				
GRUPO-H	33'3(1)					100 (3)
GRUPO-I		12'5 (1)	25 (2)		37'5(3)	100 (8)
GRUPO-J	6'6(1)	13'3 (2)	26'6(4)	40 (6)	53'3(8)	100 (15)
GRUPO-K				11'1(1)		100 (9)
GRUPO-L						100 (3)

-Entre paréntesis se expresa el número de cepas.

TABLA XX

"Concentraciones límites de los distintos antibióticos que indican el 100% de inhibición y el 100% de persistencia del crecimiento de los distintos grupos de BGNNF."

-	-	GRUPO-G	GRUPO-E	GRUPO-L
ANTIBIOTICO	CONCENTRACION	<u>Ps. putrefaciens.</u>	<u>Ps. cepacia</u>	<u>Flavobacterium.</u>
AZLOCILINA.	5 µg/ml	S	R	R
TOBRAMICINA.	2'5 µg/ml	S	R	R
SISOMICINA.	2'5 µg/ml	S	R	R
COLISTINA.	8 µg/ml	S	R	R
T-SULFAMETOXAZOL.	2/40 µg/ml	S	V	R

S= Inhibición del 100% de las cepas.

R= Persistencia del 100% de las cepas.

V= Inhibición de un 66% de las cepas.

DISCUSSION

4.-DISCUSION:

4.1.-IDENTIFICACION BIOQUIMICA:

Ante la gran diversidad de criterios existentes a la hora de establecer un esquema de identificación de las "Bacterias Gram Negativas No Fermentadoras" (BGNNF), en la presente memoria, nos hemos planteado, hacer un esquema simplificado de identificación, basándonos en otros esquemas previamente establecidos; Manual de BERGEY (11), KING(52), HUGH y GILARDI (46), TATUM y cols (97) y Mc.FADDIN (28).

La elección de estos esquemas se ha hecho en base a que consideramos que estos autores estudian de forma exhaustiva este grupo heterogéneo de bacterias, si bien, podemos decir que ellos no lo han considerado como un grupo único, así el Manual

de BERGEY (11) estudia a cada género por separado, dado que según su clasificación, cada uno pertenece a un grupo distinto, es por ello, que para cada género e incluso a veces para cada especie aplica pruebas bioquímicas diferentes, aunque en todos los casos le dá gran importancia al contenido en guanina + citosina.

KING (52) considera el grupo como tal, y es importante destacar que, aunque hay pruebas que no ensaya para todos los género o especies, en general estudia al grupo de una forma bastante uniforme, hace una previa diferenciación basada en 3 pruebas y posteriormente aplica otras, constando en total su esquema de 39. pruebas.

HUGH y GILARDI (46) estudian en profundidad el género Pseudomonas, estableciendo para su identificación unas pruebas mínimas (13) que caracterizan al género y luego para diferenciar las diferentes especies consideran 24 pruebas más.

TATUM y cols (97) sin embargo, estudian al resto de las Bacterias Gram Negativas No Fermentadoras (excluyendo al género Pseudomonas) denominándolas "Bacilos Gram negativos Miscelaneos" su esquema consta de 27 pruebas.

Por último Mc FADDIN (28) a semejanza con KING (52) establece una diferenciación previa basada en 3 pruebas, estableciendo unos grupos a los que después aplica pruebas diferentes, en total son 59 pruebas.

Nosotros hemos seleccionado 25 pruebas comunes, si no a todos los esquemas, sí a la mayoría, aplicándolas todas ellas de forma uniforme a todo el grupo de BGNNF, pudiendo establecer

una diferenciación a nivel de género y especie, aunque ésta a veces radique en una única prueba bioquímica (Esquemas 1 y 2).

Así, hacemos una clasificación inicial basándonos en dos pruebas bioquímicas (OF glucosa y Oxidasa), lo que nos permite establecer cuatro grupos: a,b,c,d, (28,46,52).

GRUPO a.- En él incluimos a todos aquellos BGNNF cuya característica común es el ser capaz de actuar sobre la glucosa por vía oxidativa y el ser oxidasa positiva, aunque en algunas / especies de Pseudomonas (Ps.mallei y Ps.cepacia) esta característica puede ser variable (11,28,46,52). Dentro de este grupo, incluimos a varias especies de Pseudomonas así como al género / Flavobacterium del que hablaremos posteriormente.

Definimos al género Pseudomonas como a aquellos bacilos Gram negativos cuyo metabolismo nunca es fermentativo, aerobios estrictos y móviles en la mayoría de los casos, también son catalasa positivos e indol negativos (11,46).

Según nuestro esquema Ps. aeruginosa se diferencia de Ps. fluorescens por dos pruebas bioquímicas que son: la reducción de los nitratos a nitritos, hemos considerado esta prueba diferencial porque el Manual de BERGEY (11) Mc FADDIN (28) / HUGH y GILARDI (46) y KING (52) así lo consideran, aunque tres de ellos (11,28,52) hablan de la posibilidad de que Ps. fluorescens aunque no reduzca los nitratos a nitritos, si pueda realizar una denitrificación completa de nitrato a nitrógeno gas. La otra diferencia es la capacidad de crecimiento a 42°C (11,28,46,52).

La diferencia entre Ps.aeruginosa y Ps.putida radica en la capacidad de crecimiento a 42°C (11,28,46, 52), si bien el Manual de BERGEY (11) habla también de una diferenciación en la capacidad de denitrificación y en la hidrólisis de la gelatina, que otros autores (46), no la consideran como pruebas básicas de diferenciación.

Entre las especies Ps. aeruginosa y Ps. stutzeri, la diferencia es la arginina dehidrolasa (11,28,46,51), aunque el / Manual de BERGEY (11) también las diferencia por la hidrólisis de la gelatina, que es positiva para Ps. aeruginosa. HUGH y GILARDI (46) no consideran esta prueba básica para la diferenciación.

La diferencia entre Ps.aeruginosa y Ps.vesicularis / se basa en la arginina dehidrolasa, el citrato, y la reducción de los nitratos (11,28,52), HUGH y GILARDI (46) no estudian a Ps. vesicularis.

Ps.aeruginosa de Ps.pseudomallei sólo la diferenciamos por la capacidad de crecimiento sobre SS (28,46,52), el Manual de BERGEY (11) no ensaya esta prueba para esta especie.

Diferenciamos Ps. aeruginosa de Ps. mallei por la motilidad, el citrato y la capacidad de crecimiento a 42°C (11,28 46,52). Cabe destacar que el Manual de BERGEY (11) distingue estas dos especies, al igual que nosotros por la motilidad, pero también por otras pruebas basadas en la capacidad de crecimiento sobre distintos substratos como única fuente de carbono.

Ps. aeruginosa y Ps. cepacia se diferencian por la capacidad de crecimiento sobre SS y por la producción de ONPG (28, 46,52), estos autores utilizan otras pruebas diferenciales adicio

nales, pero diferentes para cada caso.

Entre Ps.aeruginosa y Ps. acidovorans, la diferencia estriba en la arginina dehidrolasa y en la capacidad de crecimiento a 42°C (28,46). KING (52) sólo las diferencia por la / arginina dehidrolasa por considerar el crecimiento a 42°C variable, mientras que el Manual de BERGEY (11), las diferencia por la hidrólisis de la gelatina, que nosotros no consideramos porque los demás autores (28,46,52) la consideran variable.

Ps.fluorescens se diferencia de Ps.putida por la / hidrólisis de la gelatina (11,28,46,52).

Entre Ps. fluorescens y Ps.stutzeri la diferencia la basamos en tres pruebas bioquímicas que son: Reducción de los nitratos, crecimiento a 42°C e hidrólisis de la gelatina (11,28, / 46,52). Cabe destacar que el Manual de BERGEY (11) no ensaya ni la reducción de los nitratos ni la hidrólisis de la gelatina, / aunque sí otras pruebas diferentes.

Ps.fluorescens y Ps. vesicularis las diferenciamos por la capacidad de crecimiento sobre SS, arginina dehidrolasa, citrato y reducción de los nitratos, (11,28,52). El Manual de BERGEY (11) basa su diferenciación además de en la hidrólisis de la gelatina, en la capacidad de utilizar diferentes substratos. HUGH y GILARDI (46) no estudian la especie Ps.vesicularis.

La diferencia entre Ps.fluorescens y Ps.pseudomallei radica en la capacidad de crecimiento a 42°C y sobre SS (28,46, / 52), si bien estos autores utilizan además otras pruebas que no son comunes para éstas dos especies y sin existir concordancia en / tre la positividad y negatividad de ellas. Por su parte el Manual

de BERGEY (11) ensaya estas dos especies diferenciándolas entre sí por pruebas muy diferentes a las usadas por los otros autores (28,46,52).

Podemos diferenciar Ps.fluorescens y Ps.mallei por la motilidad, crecimiento sobre SS y citrato (11,28,46,52), el Manual de BERGEY (11) considera sólo la motilidad como prueba común con los demás autores (28,46,52) aunque establece otras diferencias al igual que el resto (28,46,52) sin que dichas pruebas sean comunes entre ellos.

La deferenciación entre Ps.fluorescens y Ps.cepacia se basa en el crecimiento sobre SS, en la arginina dehidrolasa y en / la ONPG (28,46,52), en el Manual de BERGEY (11) al igual que nosotros y los demás autores diferencia a estas dos especies por la arginina dehidrolasa pero las pruebas restantes no son comunes a los otros autores (28,46,52).

Ps. fluorescens se diferencian de Ps.acidovorans en la hidrólisis de la gelatina y en la arginina dehidrolasa (11,28,46, 52), si bien estos autores al igual que en los casos anteriores, / hablan de otras pruebas diferenciales pero no comunes para todos ellos.

Ps.putida se diferencia de Ps.stutzeri por el creci-- miento de 42°C (28,46,52) y por la arginina dehidrolasa (11,28,46 52).

Ps.putida de Ps.vesicularis, se diferencia por el crecimiento sobre SS, la hidrólisis de la gelatina, el citrato (52)

y la arginina dehidrolasa (28,52) HUGH y GILARDI (46) no estudian la especie Ps. vesicularis.

La diferencia entre Ps. putida y Ps.pseudomallei se puede hacer por el crecimiento sobre SS (28,46,52).

Entre Ps.putida y Ps.mallei la diferencia radica en el crecimiento sobre SS, citrato (28,52), hidrólisis de la gelatina (11,28) y motilidad (11,28,52).

Ps.putida y Ps.cepacia pueden diferenciarse por el crecimiento sobre SS (28,46,52) y por la producción de β -Galactosidasa (28,46). El Manual de BERGEY (11) utiliza pruebas / para la diferenciación muy diferentes.

La diferencia entre Ps.putida y Ps.acidovorans podemos basarla en la arginina dehidrolasa (28,46). Los restantes autores (11,52) basan su diferenciación en pruebas diferentes.

Ps.stutzeri: la podemos diferenciar de Ps. vesicularis por el citrato (28,52) y por la reducción de los nitratos (28). HUGH y GILARDI (46) no estudian la especie Ps.vesicularis y el Manual de BERGEY (11) utiliza pruebas muy diferentes para ambas especies.

La diferenciación entre Ps.stutzeri y Ps.pseudomallei se basa en la arginina dehidrolasa (11,28,46,52).

Ps.stutzeri se diferencia de Ps.mallei en el citrato, motilidad (11,28,52) y el crecimiento a 42°C (28,52). HUGH Y GILARDI (46) no estudian la especie Ps.mallei.

La diferenciación entre Ps.stutzeri y Ps.cepacia se basa en la presencia de β -galactosidasa (28,46,). Ni el Manual de BERGEY ni KING (11,52) ensayan esta prueba para estas especies / de Pseudomonas.

La diferencia entre Ps.stutzeri y Ps.acidovorans radi ca en una sola prueba bioquímica que es la capacidad de crecimiento a 42°C (11,28) . El Manual de BERGEY y HUGH y GILARDI (11,46) basan la diferencia en otras pruebas bioquímicas.

Ps.vesicularis se diferencia de Ps.pseudomallei en / la reducción de los nitratos y en la arginina dehidrolasa (28,52).

Ps.vesicularis se puede diferenciar de Ps.mallei por la reducción de los nitratos, la motilidad y la arginina dehidrolasa (28,52).

La diferenciación de Ps.vesicularis y Ps.cepacia se basa en el citrato (28,52) y en la producción de β -galactosidasa (28).

Entre Ps.vesicularis y Ps.acidovorans la diferenciación se basa en la hidrólisis de la gelatina (52).

Ps.pseudomallei se diferencia de Ps.mallei por la motilidad y crecimiento a 42°C (28,52).

La diferencia entre Ps.pseudomallei y Ps.cepacia se basa en la β -galactosidasa (28).

Ps.pseudomallei se diferencia de Ps. acidovorans en la hidrólisis de la gelatina (28), crecimiento a 42°C y en la / arginina dehidrolasa (28,52).

La diferencia entre Ps. mallei y Ps. cepacia radica en la β -galactosidasa y la motilidad (28,52).

Ps.mallei se diferencia de Ps.acidovorans por la motilidad, hidrólisis de la gelatina, e hidrólisis de la arginina (28,52).

Ps.cepacia y Ps. acidovorans se pueden diferenciar por la β -galactosidasa (28,46).

GRUPO b.-El siguiente grupo que estudiamos es aquel / cuya característica común es el no metabolizar la glucosa, sobre OF glucosa, ni por vía oxidativa, ni fermentativa (11,28,46,52), esta característica según HUGH y GILARDI (46) Ps.pseudoalcaligenes no la cumple, por ser capaz de oxidar la glucosa aunque de forma débil, esto no coincide con los demás autores (11,28,52), y / la otra prueba común al grupo es el ser oxidasa positiva, con ésta al igual que ocurría con la anterior, en Ps. pseudoalcaligenes puede ser variable. Este grupo incluye además de las especies de Pseudomonas de las que vamos a hablar a continuación, al género

Alcalígenes del que hablaremos posteriormente.

La primera especie a considerar es la Ps.alcalígenes la cual se va a diferenciar de Ps. pseudoalcalígenes sólo por la capacidad de crecimiento a 42°C, KING (52), es la única de los / autores consultados que considera esta prueba diferencial. El / resto, (11,28,46) basan la diferencia en pruebas que no son coincidentes en cuanto a positividad y negatividad en los diferentes esquemas (11,28,46) es por ello que estas dos especies no quedan bien diferenciadas.

La diferencia entre Ps.alcalígenes y Ps. testosteroni, se basa, sólo en la arginina dehidrolasa (11,28), si bien, estos dos autores utilizan otras pruebas más, pero no hay concordancia en los resultados de ellas, ni con los otros dos autores consultados (46,52), quienes a pesar de utilizar en sus esquemas un gran número de pruebas no consiguen diferenciar estas dos especies.

Entre Ps.alcalígenes y Ps. diminuta la diferencia radica en la hidrólisis de la gelatina (11,28,46,52).

La diferencia entre Ps. alcalígenes y Ps. putrefac- la basamos en la producción de sulfhídrico (28,46,52) y en la arginina dehidrolasa (28). El Manual de BERGEY (11) no estudia a esta especie de Pseudomonas.

Para diferenciar Ps.pseudoalcalígenes de Ps. testosteroni nos basamos en la arginina dehidrolasa (11,28), los otros autores (46), basan esta diferencia en el OF fructosa prueba no ensayada por nosotros, mientras que KING (52) a pesar de las 39 pruebas que incluye su esquema, no consigue diferenciar estas especies.

Ps.pseudoalcaligenes y Ps. diminuta se diferencian, por la hidrólisis de la gelatina y reducción de los nitratos / (28,52).

La prueba básica de diferenciación de Ps.pseudoalcaligenes y Ps.putrefacciens es la producción de sulfhídrico sobre el TSI (28,46,52).

Ps.testosteroni y Ps.diminuta, se diferencian entre sí por la hidrólisis de la gelatina (28,46,52) mientras que el / Manual de BERGEY (11) se basa fundamentalmente en la capacidad de crecimiento sobre diferentes sustratos. para la diferenciación.

La diferencia entre Ps.diminuta y Ps. putrefacciens radica en la producción de sulfhídrico (28,46,52).

GRUPO c.- Este tercer grupo incluye a aquellas BGNNF cuya característica común es el ser capaz de oxidar la glucosa / sobre el OF glucosa y el ser oxidasa negativa, incluye a Ps.mallei y Ps.cepacia, especies de las que ya hemos hablado por tener la / característica de ser oxidasa variable, así como al género Acinetobacter variedad Herellea, del que posteriormente hablaremos.

GRUPO d.- El cuarto grupo por nosotros establecido in cluye a todas aquellas BGNNF que se caracterizan por no ser capaces de oxidar la glucosa sobre el medio OF y por ser oxidasa negativas. En él se incluyen las especies Ps.maltophilia y Ps.pseudoalcaligenes (variedades que son oxidasa negativas).

Estas especies se diferencian por la hidrólisis de la gelatina (11,28,46,52). También incluyen al género Acinetobacter /

variedad Mima del que también hablaremos posteriormente .

Respecto a los otros géneros incluidos en el grupo de Bacterias Gram Negativas No Fermentadoras, tenemos Flavobacterium, que por ser capaz de oxidar la glucosa (aunque algunos autores consideran que puede fermentar los azúcares, por lo que hablan de dicho género como dudosamente no fermentador)(28,44,52), el Manual / de BERGEY (11) lo define como microorganismo oxidativo, también es oxidasa positivo, por ello se incluye en el primer grupo (a) por / nosotros establecido, siendo por tanto necesario establecer una / diferenciación de dicho género con las especies de Pseudomonas incluidas en este mismo grupo. La prueba básica diferencial es el indol (11,28,52), por ser el único género del grupo de BGNNF que es indol positivo, otra prueba diferencial podría ser la motilidad / que es negativa. TATUM y cols (97) no estudian este género.

En el segundo grupo (b) quedaba incluido otro género de BGNNF, que es el género Alcaligenes, caracterizado por tener metabolismo respiratorio, no oxidar la glucosa sobre el medio OF y el ser oxidasa positivo (11,28,52,97). Este género ofrece serias dificultades a la hora de diferenciarlo de las especies de Pseudomonas que se incluyen en su mismo grupo, así para diferenciarlo de Ps.alcaligenes podemos hacerlo por la arginina dehidrolasa (28) / y el crecimiento a 42°C (52). Los demás autores consideran a cada género por separado y les aplican pruebas bioquímicas diferentes, concretamente HUGH y GILARDI (46) no estudian este género, pero sí lo hacen TATUM y cols (97).

La diferencia entre Alcaligenes y Ps.testosteroni radica en el citrato (28,52). HUGH Y GILARDI (46) no ensayan el citrato para Ps.testosteroni, pero sí lo hacen TATUM y cols (97), para

el género Alcalígenes coincidiendo sus resultados con los anteriores autores (28,52).

La diferenciación entre las distintas variedades de / la especie Alcalígenes faecalis, tampoco resulta fácil, tanto TATUM y cols (97) como KING (52) y McFADDIN (28) la cifran en la / distinta forma de utilizar los nitratos.

El Manual de BERGEY (11) no considera estas tres variedades (Alcalígenes faecalis, Alcalígenes faecalis variedad odorans y Alcalígenes faecalis variedad denitrificans), sino que considera una sola especie con varias posibilidades de utilizar los nitratos.

El último género incluido por nosotros es el género / Acinetobacter, cuya característica más destacable es ser un coco / Gram Negativo, morfología que mantiene en la fase logarítmica de crecimiento, mientras que en la fase estacionaria aparece como cobacilo (92), suele agruparse en parejas, inmóvil y oxidasa negativo (11,28,52,97), si bien hay que diferenciar dentro de la especie Acinetobacter calcoaceticus dos variedades según oxide la glucosa sobre el OF glucosa (Acinetobacter calcoaceticus variedad Harellea), o no actuen sobre la glucosa (Acinetobacter calcoaceticus variedad Mima) (11,52,97). McFADDIN(28) no hace la diferenciación en dos variedades, sino que considera una especie con la prueba / bioquímica OF glucosa variable. Es por estas características por lo que la variedad Mima queda incluida en el cuarto grupo (d), por lo que hay que diferenciarla de Ps. maltophilia, esto se puede hacer por la morfología, la motilidad y la hidrólisis de la gelatina (11,28,52,97). También hay que diferenciar esta variedad de Ps. pseudoalcalígenes esta diferenciación la basamos en la motilidad y en la reducción de los nitratos (11,28,46,52,97).

La variedad Herellea hay que diferenciarla de Ps.mallei y puede hacerse por la morfología y por la capacidad de crecimiento a 42°C (28,52), ambas especies son inmóviles.

Acinetobacter calcoaceticus variedad Herellea, se diferencian de Ps.cepacia por la morfología y la β -galactosidasa / (28). TATUM y cols (97) no ensayan esta prueba para Acinetobacter, ni tampoco el Manual de BERGEY (11).

A la vista de nuestros resultados, observamos que aplicando este esquema de identificación simplificado, nos quedan identificadas el 96'6% de las cepas ensayadas, mientras que SHAYEGANI y cols (91) utilizando más pruebas que nosotros (34), sólo identifican el 93'6% y además no unifican a todo el grupo, igual ocurre a KING y PHILLIPS (53) quienes obtienen una identificación con su esquema del 96'5% de las cepas, si bien utilizan más pruebas que / nosotros y no consideran al grupo de forma uniforme, por otro lado OBERHOFER y cols(74) establecen un esquema basado en 46 pruebas bioquímicas y no hacen una evaluación de sus resultados, igual ocurre con GILARDI (37) quien aplica 37 pruebas sin hacer una evaluación .

A la hora de estudiar los resultados de porcentajes de positividad de las distintas pruebas bioquímicas ensayadas en nuestro esquema, vamos a establecer una comparación con aquellos autores que expresen sus resultados también en tantos por cientos (37, 46,74), pero no con aquellos que sólo hablan de una positividad o negatividad de las pruebas (11,28,52,53,91).

Así pues podemos hablar dentro del grupo A (Ps.aeruginosa) que los porcentajes de positividad de las diferentes pruebas ensayadas coinciden con OBERHOFER y cols (74), HUGH y GILARDI (46)

y GILARDI (37).

En el grupo B (Ps.fluorescens) obtenemos unos resultados comparables a los obtenidos por los autores consultados (37, 46,74), sin bien observamos una discrepancia en la utilización de OF maltosa que GILARDI (37) y HUGH Y GILARDI (46) hablan de un / porcentaje alto de cepas que oxidan, mientras que los nosotros al igual que OBERHOFER y cols(74) observamos un 0% de positividad de la prueba.

Dentro del grupo C (Ps.putida) los resultados son comparables a los obtenidos por otros autores (37,46,74).

El grupo D (Ps.alcaligenes) presenta unos resultados superponibles a los obtenidos por los distintos autores consultados (37,46,74), aunque cabe destacar algunas excepciones como ocurre con la reducción de los nitratos, que nuestros resultados, junto con los obtenidos por OBERHOFER y cols(74) y GILARDI (37) están en discordancia con los obtenidos por HUGH y GILARDI (46). / Igual ocurre con la arginina dehidrolasa que nuestros resultados coinciden con los de OBERHOFER y cols (74) y discrepan con los / otros autores (37,46).

Los resultados obtenidos para el grupo E (Ps.cepacia) están en concordancia con los de otros autores (37,46,74), aunque existen discrepancias como la oxidación OF lactosa, manitol y sacarosa, ya que mientras que a nosotros nos da un 0% de positividad el resto de los autores obtienen un 100% de positividad, igual ocurre con la ornitina descarboxilasa coincidiendo nuestros resultados con los obtenidos por GILARDI (37) y no por los obtenidos por

OBERHOFER y cols (74) y HUGH y GILARDI (46).

En el grupo F (Ps. maltophilia) hay concordancia entre nosotros y los otros autores (37,46,74), si bien hay alguna discrepancia en cuanto a la oxidación de los diferentes azúcares sobre el medio OF, ya que mientras que nosotros al igual que OBERHOFER y cols (74) encontramos un porcentaje bajo de positividad, los autores restantes (37,46) encuentran un porcentaje próximo / al 100%.

Dentro del grupo G (Ps. putrefaciens) encontramos concordancia con todos los autores a excepción de la ornitina descarboxilasa, prueba ésta que GILARDI (37) y HUGH Y GILARDI (46) encuentran un porcentaje de positividad bastante alto mientras que el nuestro es del 0%.

Los resultados obtenidos dentro del grupo H (Ps. stutzeri) concuerdan con los de todos los autores (37,46,74), aunque / hay que destacar algunas discrepancias, concretamente en el OF maltosa, que nosotros obtenemos un 0% de positividad mientras que los otros autores obtienen un porcentaje bastante alto de positividad. Igual ocurre con la arginina dehidrolasa que nuestros datos no / coinciden con los obtenidos por OBERHOFER y cols(74) y con la fenilalanina desaminasa que nosotros detectamos un 0% de positividad mientras que los otros (37,74) encuentran un alto porcentaje. HUGH y GILARDI (46) no ensayan esta última prueba.

Dentro del grupo I (Ps. pseudoalcaligenes), encontramos concordancia entre nuestros resultados y los de los autores consultados (37,46,74); a excepción del OF glucosa que nosotros al igual que OBERHOFER y cols (74) obtenemos un 0% de positividad de dicha

prueba, mientras que GILARDI (37) y HUGH y GILARDI (46) encuentran una positividad de casi el 100%.

En el grupo J (Acinetobacter calcoaceticus variedad Mi-ma) obtenemos unos resultados en total concordancia con los encontrados por otros autores (37,74,97), si bien hay que hacer notar que / éstos no ensayan muchas de las pruebas por nosotros ensayadas.

Los resultados obtenidos dentro del grupo K (Acinetobacter calcoaceticus variedad Herellea) son bastantes similares a los encontrados por GILARDI (37) OBERHOFER y cols (74) y TATUM y cols (97), aunque existen algunas discordancia en cuanto a la positividad del OF lactosa, ya que mientras OBERHOFER y cols (74) encuentran un 100% de positividad, nosotros detectamos un 0%. Lo contrario ocurre con el OF manitol. Otra pequeña discrepancia encontramos en la hidrólisis de la gelatina, en la que nosotros al igual que / GILARDI (37) y OBERHOFER y cols(74) encontramos un 0% de positividad mientras que TATUM y cols (97) encuentran un 50%

En el grupo L (Flavobacterium) obtenemos unos resultados que concuerdan con los encontrados por otros autores (74,97) / a excepción del OF lactosa, OF manitol y OF maltosa.

Del resto de las especies incluidas en el grupo de Bacterias Gram Negativas No Fermentadoras no podemos hablar de porcentaje de positividad, ya que sólo hemos estudiado una cepa que se corresponde con una cepa patrón (Ps.testosteroni, ATCC 11996, Ps.vesicularis NCTC 1945, Ps.acidovorans ATCC 15568 y Ps.diminuta ATCC 11568) sólo podemos decir que por nuestro esquema quedan identificadas como tales.

4.2.-IDENTIFICACION POR CROMATOGRAFIA LIQUIDO GASEOSA:

Otra de las posibilidades de identificación bacteriana, como ya apuntábamos en la introducción, es la basada en la composición química estructural de la célula. Las bacterias Gram negativas tienen una estructura química de su pared bastante compleja / (25), de la que cabe destacar la fracción lipídica. El conocimiento de la naturaleza de los lípidos bacterianos y sus ácidos grasos ha tenido gran expansión y existen muchos trabajos encaminados a este fin (17). De todos estos estudios, se ha llegado a concluir que / los lípidos celulares están localizados en las bacterias Gram positivas en los sistemas de membranas, mientras que en las bacterias Gram negativas se encuentran en la pared celular o en la membrana externa (17).

Por tanto, esta identificación tendría un primer paso de extracción de los lípidos de las células y posteriormente de / los ácidos grasos de estos lípidos, que son los que definirían la composición bacteriana siendo utilizados como taxones.

Ya en 1.963 ABEL y cols (1) apuntaron esta posibilidad y que uno de los métodos más sensibles para detectar estos ácidos / grasos era la Cromatografía Líquido Gaseosa (CLG), esto fue corrobo rado posteriormente por otros autores (16,62), quienes definen esta técnica como de gran sensibilidad, por detectar sustancias en el rango del microgramo e incluso inferiores.

Por todo ello, en la presente memoria, hacemos un estu dio de la composición celular en ácidos grasos de este grupo heterogéneo de Bacterias Gram Negativas No Fermentadora (BGNNF), realiz ando una extracción de los lípidos y una posterior separación e / identificación.

La elección del método se hizo basándonos en un trabajo de MOSS y cols (68), en el que hace un estudio comparativo de varios métodos, con el fin de elegir el que fuera más reproducible y rápido. Ellos concluyen que uno de los mejores es una adaptación del descrito por METCALF (59); que consiste en hacer una saponificación, / luego una hidrólisis (acidificando con ClH) y posteriormente una esterificación con trifluoruro de boro - metanol. Con la hidrólisis / observan estos autores, que se favorece la posterior detección de hidroxiácidos. MOSS y cols(68) observan que la utilización del trifluoruro de boro - metanol no disminuye la sensibilidad de detección de los ácidos grasos denominados ciclopropanos, como apuntaban otros autores (32,55). La explicación estaba en que este agente esterificante destruía los ácidos ciclopropanoy disminuía la sensibilidad de detección de hidroxiácidos, sólo si se utilizaba directamente /

sobre el material bacteriano (transesterificación), pero que no ocurría así si se realizaba una previa saponificación y después la esterificación (68). Posteriormente MOSS y DEES (64) adoptan este método que es el seguido por nosotros y por otros autores / (21,49,65,66) aunque con algunas modificaciones, ya que la última extracción la realizamos con hexano y no con la mezcla cloroformo-hexano (1:4). Esta modificación la adoptamos tras un estudio realizado simultáneamente con ambos disolventes y en el que obtuvimos los mismos resultados.

La elección de la columna se hizo en base a detectar los ácidos grasos de cadena normal, de cadena ramificada, ciclopropanos e hidroxiácidos por ello escogimos la OV-17 metil silico-na que era poco polar, condición necesaria para poder detectar los hidroxiácidos.

De los resultados obtenidos, podemos hablar de la posibilidad de establecer una diferenciación cualitativa entre las BGNNF, en base a sus perfiles cromatográficos siguiendo una clasificación adansoniana y estableciendo 23 grupos de los cuales / 18 están encabezados por cepas patrones y el resto quedan excluidos de estos 18.

Así observamos, que el perfil cromatográfico del subgrupo I-1 encabezado por Ps. aeruginosa ATCC 25619 está definido por 9 ácidos grasos que coinciden en su mayoría con los detectados por otros autores (23,26,29,42,64,65,70) aunque hay discrepancias en cuanto a que ellos detectan el 3-hidroxidecanóico (3 OH 10:0) y los ácidos monoinsaturados (16:1 y 18:1) mientras que / nosotros no; el caso de la no detección de estos ácidos monoinsaturados es por la solapación en nuestras condiciones de estos ácidos con sus homólogos saturados, esta discrepancia la vamos a te

ner en todos los grupos y con todos los autores, es por ello que no vamos a volver a comentarlo. Esta solapación no interfiere al pretender establecer una diferenciación por ser los ácidos monoinsaturados (16:1 y 18:1) comunes a todas las cepas.

Otra de las discordancias es que nosotros detectamos el ácido pentadecanoico (15:0) mientras que MOSS y cols (70) y DE WRY y cols (23) no lo detectan, pero sí el resto de los autores / (26,29,42,64,65).

STEINHAEUER y cols (96), también estudian a esta especie por cromatografía líquido gaseosa, pero obtienen sólo cuatro ácidos grasos de los cuales, sólo uno coincide por los detectados por nosotros y por los otros autores (23,26,29,42,64,65,70). A pesar de estas discrepancias podemos decir que este perfil cromatográfico se define por la presencia del ácido ciclopropano de 19 átomos de carbono (19: Δ trans) e hidroxiaácidos (2 ó 3 OH 12:0) datos éstos coincidentes con otros autores (29,41,64,65,70) y la ausencia de ácidos de cadena ramificada (29,42,64,70).

Al estudiar los resultados obtenidos en el grupo I-2 encabezado por Ps. fluorescens ATCC 13525, observamos un perfil cromatográfico definido por la presencia de un ácido graso de cadena ramificada (anteiso 17:0) (diferencia fundamental con el grupo anterior), así como la ausencia del ácido ciclopropano (19: Δ trans). Al constatar estos resultados con otros autores nos encontramos que STEINHAEUER y cols (96) aunque estudian esta especie, sólo detectan cinco ácidos grasos, dos de ellos distintos al grupo anterior, aunque no son datos superponibles con los nuestros, ni con el resto de los autores consultados (8,65,68) BRIAN Y GARDNER (8) estudian por CLG el patrón cromatográfico de esta especie bacteriana, junto con otros bacilos gram negativos, encuentran los mismos ácidos grasos,

aunque discrepamos con ellos en cuanto a que detectamos ácidos no observados por ellos: docecanóico (12:0), hidroxidodecanóico (2 ó 3 OH:12:0) y anteiso heptadecanoico (a-17:0), mientras que hay / otros ácidos, el ciclopropano (19: Δ trans) que ellos detectan y nosotros no. La no detección de hidroxiácidos de éstos autores po dría explicarse porque el método seguido carece de hidrólisis con clorhídrico antes de la esterificación, paso necesario para obtener una mayor sensibilidad en la detección de hidroxiácidos (68), Estos autores sólo estudian esta especie por lo que, no establecen diferenciación con el resto de las especies de Pseudomonas.

MOSS y DEES (65) estudian Ps. aeruginosa y Ps. fluorescens, obteniendo para ambos, perfiles cromatográficos superponibles por lo que no los diferencian, al comparar sus resultados con los / nuestros, observamos correspondencias con algunos ácidos y discrepancias en el hidroxidecanóico y el ciclopropano de 19 átomos de / carbono (2 OH 10:0 y 19: Δ trans) ácidos no detectados por nosotros, y con el isómero de 17 átomos de carbono (a-17:0) ocurre lo contra rio, que nosotros lo detectamos y ellos no.

En el subgrupo I-3, representado por Ps.putida ATCC, / 12633, obtenemos un perfil cromatográfico, muy característico, per fectamente diferenciable de los grupos anteriores, MOSS y cols (70) no observan según sus resultados tanta diferencia, ya que sólo dis tinguen la composición estructural en ácidos grasos de Ps.putida y Ps.aeruginosa por el Ciclopropano de 19 átomos de carbono (19: Δ / trans), ausente en Ps.putida, la especie Ps.fluorescens no la estu dian estos autores. Nosotros caracterizamos este perfil cromatográ fico por la presencia del decanóico (10:0) undecanóico (11:0), dos ácidos no identificados (NI) con tiempos de retención 4 y 4'7 res pectivamente; hidroxitetradecanóico (2 ó 3 OH 14:0) y ciclopropano

isomero cis de 19 átomos de carbono (19: Δ cis) ausentes todos ellos en los grupos anteriores. Este grupo carece del dodecanóica (presente en los anteriores grupos). Tampoco encontramos concordancia con los resultados encontrados por MOSS y DEES (65) / quienes, no diferencian esta especie de las 2 anteriores, y además detectan ácidos (3 OH 10:0) que nosotros no encontramos.

En lo que respecta al subgrupo I-4, encabezado por / Ps. alcalígenes ATCC 14909, nuestro perfil diferencia perfectamente, a este grupo de los anteriores, así, la presencia del ácido / decanóico (10:0) y tridecanóico (13:0) lo diferencia de los subgrupos I-1 y I-2, mientras que la ausencia de hidróxiácidos lo / diferencia del subgrupo I-3 y de ciclopropano de 19 átomos de carbono (19: Δ trans) del grupo I-1. Al contrastar estos datos con / otros autores, observamos que MOSS y cols (70) y KEY y cols (51) obtienen un perfil cromatográfico para esta especie, con ácidos grasos comunes a los nuestros, pero otros no lo son (3 OH 10:0 y 3 OH 12:0), por el contrario, hay algunos picos encontrados en nuestro cromatograma (10:0; 13:0, 15:0 y 17: Δ) que ellos (70) no detectan. DEES y MOSS (20) obtienen unos resultados por CLG que se aproximan más a los nuestros, aunque no podemos decir que sean superponibles, ya que difieren de nosotros por la detección del hidroxidecanóico (3 OH 10:0), hidroxidodecanóico (3 OH 12:0), heptadecanóico (17:0) y del isómero del ácido heptadecanóico / (i-17:0). Ellos, al igual que nosotros, no detectan el isómero / trans del ácido ciclopropano de 19 átomos de carbono (19: Δ), / además no hacen un estudio comparativo con las otras especies de Pseudomonas (I-1, I-2, y I-3) por lo que no podemos discutir sus bases de diferenciación con las muestras.

El subgrupo I-5 encabezado por Ps.cepacia ATCC 17759 se caracteriza por tener una composición en ácidos grasos perfectamente diferenciable de los grupos anteriores.

Esta composición queda definida por la ausencia de / hidroxiácidos (diferencia con los grupos I-1, I-2, y I-3), de ácidos de cadena ramificada (diferencia con I-2 y I-3) y la presencia del isómero trans del ciclopropano de 19 átomos de carbono / (19: trans) (diferencia con el grupo I-4). Al comparar nuestros resultados con otros autores, nos encontramos que MOSS y cols / (70) estudian esta especie bajo el nombre de Ps.multivorans y describen un perfil cromatográfico diferenciable de Ps.aeruginosa, / Ps.putida y Ps.alcaligenes por la ausencia del ácido dodecanóico (12:0) presente en estas tres especies, estos datos podrían coincidir con los nuestros, porque aunque nosotros en este grupo detectamos el 12:0 lo hacemos en concentraciones ínfimas (trazas). Estos autores no estudian Ps.fluorescens. Discrepamos de ellos en que basan la diferenciación en otros ácidos que no son detectados por nosotros (3 OH 14:0 y 2 OH 16:0), hidroxiácidos estos detectados también por otros autores (64,70). Por el contrario / el ácido pentadecanóico (15:0) está presente en nuestro cromatograma y no en el de ellos (64,70). En los resultados de estos autores hay discrepancias entre ellos.

MOSS y DEES(65) obtienen unos resultados similares a los anteriores (64,70) existiendo por tanto las mismas discrepancias y concordancias con nosotros como en los casos anteriores, ellos diferencian a esta especie de las otras a excepción de Ps.alcaligenes que no la estudian. Con todos coincidimos en la de--tección del ácido ciclopropano (19: Δ trans).

Ps.maltophilia ATCC 13637, representa al subgrupo / I-6 y su perfil cromatográfico es característico, aunque podría confundirse con el de Ps. putida (subgrupo I-3), la única diferencia estaría en el 19: Δ trans ausente en Ps. putida, y presente en Ps.maltophilia, pero al encontrarse en concentración tan pequeña, es por lo que habría que recurrir a alguna otra prueba adicional, que podría ser una prueba bioquímica, como la oxidasa que Ps.putida va a ser positiva en el 100% de los casos, mientras que Ps.maltophilia lo va a ser en el 0% de los casos. (45). Nuestros datos, están en discordancia con los encontrados por otros autores ya que ellos sí diferencian estas dos especies por su composición en ácidos grasos, así MOSS y cols (70) las diferencia por los ácidos dodecanóico e hidroxidecanóico (OH 10:0) presentes en Ps.putida y no en Ps. maltophilia y por otros ácidos de cadena ramificada (i-11:0 e i-15:0) presentes en Ps.maltophilia y no en Ps.putida no detectados por nosotros. MOSS y DEES (65) hablan de la existencia en Ps. maltophilia de ácidos grasos de cadena ramificada (i-11:0, i-14:0, i-15:0, i-16:0, i-17:0 e i-17:1), además de 3 ácidos que no quedan identificados y que por sus tiempos de retención podrían corresponderse con dos no identificados detectados por / nosotros, estos datos tampoco concuerdan con los obtenidos por / MOSS y cols (70).

Nosotros aunque no detectamos estos isómeros, sí detectamos otros ácidos diferentes a ellos (15:0, 14:0 y 17: Δ) . MOSS Y DEES (65) definen la composición en ácidos grasos de esta especie por la ausencia de 12:0 datos coincidentes con los nuestros, aunque ellos al igual que los anteriores autores encuentran muchos ácidos de cadena ramificada, entre ellos isómeros de los hidroxiacidos, estos resultados están en concordancia con los encontrados

MOSS y cols (68,71).

Ps. putrefaciens NCTC 10735, que encabeza el subgrupo I-7, presenta un cromatograma muy característico, y perfectamente diferenciable de los grupos anteriores, así destaca la presencia del hidroxitetradecanóico (2 ó 3 OH 14:0) (ausente en los subgrupos: I-1; I-2, I-4, I-5), anteiso-heptadecanóico (a-17:0) / (ausente también en I-1, I-4, y I-5) y tridecanóico (13:0) (diferencia con I-1, I-2, I-5, y I-6) y la ausencia del ciclopropano de 19 átomos de carbono (19: Δ trans) (diferencia con I-1, I-3 y I-5).

MOSS y DEES (65) diferencian por su composición en / ácidos grasos a esta especie de las anteriores, a excepción de / Ps. maltophilia, por la presencia de una serie de ácidos grasos de cadena ramificada (i-13:0, i-14:0 e i-15:0) ausentes en el resto de las especies, estos datos no coinciden con los nuestros, ya que nosotros no detectamos estos ácidos, si bien, encontramos uno no identificado (NI) con un tiempo de retención de 4'7 que podría ser el isómero del tridecanóico (i-13:0). Estos autores (65) cifran la diferencia entre esta especie y Ps. maltophilia, en la ausencia en esta última, de los ácidos tridecanóico (13:0) y dodecanóico (12:0) datos éstos coincidentes con los nuestros, aunque ellos hablen también de que Ps. maltophilia tiene hidroxidodecanóico (3 OH 12:0) y Ps. putrefaciens no, aunque nosotros detectamos este ácido en los 2 coincidimos también en ellos en la ausencia del 19: Δ trans.

MOSS Y DEES (64) estudian la composición en ácidos grasos de esta especie bacteriana, pero no la comparan con las otras especies, sólo con Ps. alcaligenes y la diferencia la establecen /

en el 17:1 no detectado por nosotros en ningún caso y por la ausencia del hidroxidecanóico (2 OH 10:0) dato coincidente con nosotros y la ausencia del (20H 12:0) que nosotros lo detectamos.

El Subgrupo I-8 encabezado por Acinetobacter calcoaceticus var. Mima NCIB 9019 está caracterizado por un perfil cromatográfico que podría confundirse con el de Ps. aeruginosa, pero se diferencia de ella, en que carece de 19: Δ , así como por la presencia de trazas de 2 ácidos grasos, uno de ellos no identificado y el otro se corresponde con el tridecanóico (13:0) ausentes en Ps. aeruginosa. Ninguno de los autores que han estudiado la composición de ácidos grasos de las anteriores cepas de las que hemos hablado, han estudiado el género Acinetobacter. Sin embargo han sido numerosos los estudios realizados sobre la composición de la pared celular en ácidos grasos de estas bacterias, aunque sólo con fin de saber la composición de los lípidos de esta pared celular. Así tenemos que THORNLEY y cols (99) separan las membranas externas de Acinetobacter sp. y observan que la estructura lipídica es semejante a la de la mayoría de los bacilos Gram negativos y tanto la membrana externa como la pared celular tiene una composición distinta a las Enterobacterias, pero no estudian la composición en ácidos grasos de dichos lípidos.

Por otro lado THORNE y cols (98), hacen un análisis químico de la membrana externa y otras capas de la cubierta celular de Acinetobacter sp. encuentran que el lipopolisacárido de la membrana externa está constituido por ácidos grasos que coinciden con nuestros resultados, exceptuando el 12:0 y el 2 OH 14:0 que nosotros no los detectamos. Nosotros encontramos el 13:0, /

15:0 y el ácido con tiempo de retención 5 que no queda identificado.

Los resultados obtenidos en el subgrupo I-9 representado por Alcalígenes faecalis ATCC 21400 definen a esta especie / por su perfil cromatográfico, el cual podría confundirse con Ps. aeruginosa, ya que tiene los mismos ácidos grasos, y aunque las concentraciones de estos ácidos son distintos en cada caso, al / no utilizar un método cuantitativo, no vamos a considerarlo, es por ello, que en este caso, al igual que ocurría con Ps. putida y Ps. maltophilia hay que recurrir a una prueba bioquímica adicional que puede ser la oxidación del OF glucosa que la dá positividad / Ps. aeruginosa en el 100% de los casos, dato coincidente con todos los autores (11,28,46,51) mientras que Alcalígenes faecalis es negativa en todos los casos, dato también coincidente con todos los autores (11,28,51,97). Por otro lado, podría confundirse por su / composición química en ácidos grasos con Acinetobacter si bien, / la diferencia entre estos 2 géneros va a ser la misma que la existente entre Acinetobacter y Ps. aeruginosa, la ausencia en Acinetobacter del ácido ciclopropano de 19 átomos de carbono (19: Δ / trans) presente en Ps. aeruginosa y en Alcalígenes faecalis.

Al comparar nuestros resultados con los obtenidos por otros autores observamos que DEES y MOSS (20) aplicando el mismo método que nosotros estudian el perfil cromatográfico de Alcalígenes faecalis obteniendo unos resultados que coinciden con los / nuestros en cuanto a la presencia de los ácidos dodecanóico (12:0) e hidroxidodecanóico (2 ó 3 OH 12:0) en pequeñas concentraciones, mientras que en el ciclopropano de 17 átomos de carbono (17: Δ) hay discrepancia en cuanto a concentración, ya que, mientras que

ellos encuentran una concentración alta, nosotros lo detectamos en unas concentraciones no demasiado altas, si bien hay que decir que estos autores estudian 11 cepas de las cuales 3 tienen el 17: Δ en concentraciones similares a las nuestras. Otra discrepancia con estos autores es que nosotros detectamos el 19: Δ trans y ellos no, mientras que ocurre lo contrario con el hidroxitetradecanóico (3 OH 14:0) (20,35).

GHANEKER y NEIR (35) estudian la composición estructural en ácidos grasos de Alcalígenes faecalis obteniendo unos datos similares a los nuestros y discrepan al igual que nosotros con DEES Y MOSS (20) en la detección del 19: Δ trans.

La especie Alcalígenes faecalis var odorans ATCC / representa el subgrupo I-10, el perfil cromatográfico es interesante porque nos permite diferenciar ésta especie del grupo anterior con el que estaba íntimamente relacionado, así observamos que la diferencia fundamental es la ausencia del ciclopropano de 19 átomos de carbono (19: Δ trans) presente en el grupo anterior, nuestros resultados difieren con DEES y MOSS (20) quienes no diferencian estas dos especies por CLG; sin embargo coincidimos con ellos en la detección de 17: Δ en altas concentraciones.

El subgrupo I-11 se encuentra representado por la especie Alcalígenes faecalis var denitrificans ATCC 15554 está caracterizado por un perfil cromatográfico muy similar al grupo anterior, del que es difícil diferenciar, aunque se podrían diferenciar por las concentraciones del hidroxidodecanóico (2 ó 3 OH 12:0) respecto al ácido tetradecanóico (14:0), ya que en Alcalígenes faecalis var odorans la concentración del hidroxidodecanóico es / mayor que la del ácido tetradecanóico mientras que en Alcalígenes

faecalis var denitrificans ocurre al revés.

DEES y MOSS (20) no diferencian tampoco esta variedad de las anteriores, y los resultados por ellos obtenidos difieren con los nuestros en los mismos puntos que con los subgrupos I-9 y I-10 a excepción del ácido 19: Δ trans que tanto en este caso como en el subgrupo anterior coincidimos con estos / autores en la no detección de él.

El subgrupo I-12 encabezado por Flavobacterium meningosepticum ATCC 13253 está caracterizado por un perfil cromatográfico muy típico perfectamente diferenciable de los grupos anteriores. En él observamos un ácido graso con tiempo de retención igual a 4'7 que no queda identificado por los patrones standard, otro que se corresponde con un tiempo de retención de 9'5 se detecta en alta concentración y podría corresponderse con el i-15:0 detectado por MOSS Y DEES (66), al igual, el de tiempo de retención 14'7 podría corresponderse con un hidroxiaácido de cadena ramificada (i 2 OH 15:0) (66), y los otros dos restantes se podrían corresponder con el iso 17:1 y con el iso-3 OH 17:0 (79).

Coincidimos con ellos (66) en la ausencia del 17: Δ y de los ácidos hexadecanóico (16:0) y octadecanóico (18:0) y en la presencia de 2 OH 16:0.

DEES y cols (21), estudian también la composición en ácidos grasos de este género encontrando los mismos resultados que los anteriores autores (66) por lo que las concordancias y discrepancias con ellos son las mismas que con los anteriores.

Observamos que este subgrupo carece de tres ácidos / grasos (16:0, 18:0 y 17 Δ) que están presentes en todos los cro^omatogramas de los restantes subgrupos estudiados, lo que quizás / explique el que diversos autores (28,44,52) consideren al género Flavobacterium dudosamente no fermentador.

Al estudiar el grupo II, desglosar los subgrupos y comparar nuestros resultados nos encontramos que dentro del subgrupo II-1 representado por Ps. testoteroni ATCC 11996 el perfil cromatográ^ofico queda perfectamente definido por la presencia del hidroxihexadecanóico (2 OH 16:0) ausente en los grupos anteriores menos en Ps. pseudoalcaligenes y Flavobacterium y por la ausencia del 19: cis y trans. Los resultados obtenidos por MOSS y cols (70) difie^oren de los nuestros en el hidroxidecanóico (2 OH 10:0) detectados por ellos y no por nosotros y en el hidroxidodecanóico (2 ó 3 OH 12:0) y hidroxihexadecanóico (2 OH 16:0) que están ausentes en el cromatograma encontrado por estos autores (70). Sin embargo MOSS y DEES (65) obtienen de esta especie bacteriana, unos resul^otados más similares a los nuestros aunque discrepan en algunos / ácidos grasos no detectados por ellos (13:0, 2 OH 12:0 y 2 OH / 16:0) pero sí por nosotros.

Ps. vesicularis NCTC 1945 encabeza el subgrupo II-2 cu^oyo perfil cromatográfico se caracteriza por la ausencia total de hidroxia^ocidos y de ácidos de cadena ramificada y de ciclopropanos de 19 átomos de carbono. Al intentar comparar nuestros resul^otados con otros autores observamos que discrepamos con KALTEN--BACH y cols (49) en que nosotros detectamos el ácido dodecanóico (12:0 y 17: Δ) y ellos no, mientras que ocurre lo contrario con los hidroxia^ocidos.(2 ó 3 OH 12:0). Por otro lado MOSS y DEES /

(65) obtienen unos resultados similares a KALTENBACH y cols (49) discrepando con ellos en que detectan el 17: Δ , al igual que / nosotros.

El subgrupo II-3 representado por Ps. acidovorans / ATCC 15568 está caracterizado por un perfil cromatográfico muy similar al grupo anterior, sólo hay deferencia en cuanto a las concentraciones de los distintos ácidos grasos encontrados en am**bo**s cromatogramas. La más notable es en el ácido octadecanóico / (18:0), cuya concentración es menor en este grupo que en el ante**rior**. Otra característica de dicho cromatograma es la ausencia total de hidroxia**ci**dos, ácidos de cadena ramificadas y ciclopro**pano**s de 19 átomos de carbono (19: Δ).

MOSS y cols (70) sólo difieren de nosotros, al igual que / MOSS y DEES (65) en que ellos detectan el ácido hidroxidecanóico (2 OH 10:0).

La diferenciación entre Ps. acidovorans y Ps. vesicu- laris, MOSS y DEES (65) la basan en la ausencia del 12:0 en Ps.- vesicularis y en la presencia del hidroxia**ci**do (3 OH 10:0) en / Ps. acidovorans. Coincidimos con estos autores en la diferencia / en concentración del 'ácido 18:0. Es por ello que tendríamos que recurrir a algún método convencional adicional que podría ser una prueba bioquímica que nos permitiera marcar esta diferenciación. En este caso se podría aplicar la hidrólisis de la gelatina que / la dá positiva Ps. vesicularis mientras que Ps. acidovorans la dá negativa (52).

Ps. diminuta ATCC 11568 representa al subgrupo II-4 cuya composición en ácidos grasos queda definida y bien diferenciada de los grupos anteriores por la presencia del ácido undecanóico (11:0) y del ciclopropano (19: Δ trans) ausentes en los subgrupos anteriores (II-1, II-2, II-3). Nuestros datos concuerdan con los autores consultados (49,65) en la mayoría de los ácidos grasos, salvo en el undecanóico y docecanóico (11:0,12:0) que estos autores no los detectan mientras que lo contrario ocurre con el hidroxidodecanóico (2 OH 12:0) que es detectado por ellos y no por nosotros MOSS y KALTENBACH (67) al igual que nosotros, detectan un pico que no identifican por los patrones estandar y que por el tiempo de retención podría ser el mismo en ambos casos.

El subgrupo II-5 representado por Ps. stutzeri ATCC 11607 se caracteriza por un perfil cromatográfico perfectamente definido por la presencia de los tres ácidos ciclopropanos (17: Δ , 19: Δ cis y 19: Δ trans). Nuestros datos concuerdan sólo en parte con los encontrados por MOSS y cols (65,70) ya que / ellos detectan hidroxiácidos y nosotros no. Lo contrario ocurre con los ciclopropanos (17: Δ y 19: Δ) y con (a-17:0 y 10:0).

Ps. pseudoalcaligenes ATCC 17440 especie que representa al subgrupo II-6 y cuyo perfil se define por la presencia de hidroxiácidos (2 ó 3 OH 14:0 y 2 OH 16:0) de anteiso de 17 / átomos de carbono (a-17:0) y por la ausencia de (19: Δ cis y - / 19: Δ trans). Nuestros datos discrepan de los otros autores / (20) en que ellos encuentran hidroxiácidos pero distintos a los nuestros, así como un isómero de ácido heptadecanóico, pero no el a-17:0 que es el encontrado por nosotros. Coincidimos en

la no detección de 19: Δ trans. Por otro lado, MOSS y DEES (65) obtienen un perfil superponible a los obtenidos por los anteriores autores, sólo difieren de ellos en que no detectan el i-17:0

Una vez que hemos estudiado los grupos I y II de / BGNNF por cromatografía líquido gaseosa, nos planteamos la diferenciación de aquellos BGNNF que bioquímicamente están íntimamente relacionados (Ps.alcalígenes, Ps.pseudoalcalígenes, Ps.testosteroni y Alcalígenes faecalis). Todas estas especies difícilmente se pueden diferenciar por pruebas bioquímicas. Es por ello que basándonos en la composición estructural en ácidos grasos vamos a intentar diferenciarlos. Así Ps. alcalígenes se va a diferenciar de Ps. pseudoalcalígenes por la presencia del ácido decanóico y de un ácido no identificado con tiempo de retención 9, así como por la ausencia de hidroxitetradecanóico, hidroxihexadecanóico (2 ó 3 OH 14:0, 2 OH 16:0) y del a-17:0. Nuestros resultados los comparamos con MOSS Y DEES (65) quienes establecen patrones cromatográficos de estos dos grupos pero sin que existan diferencia alguna entre ellos.(Tabla XXVI.).

Ps.alcalígenes la vamos a diferenciar de Ps.testosteroni por la presencia del ácido decanóico (10:0) y de un ácido no identificado con tiempo de retención 9 y por la ausencia de 2 ó 3 OH 12:0, y 2 OH 16:0 y del ácido no identificado con tiempo de retención 9,5. MOSS Y DEES (65) no estudian esta especie pero en un trabajo anterior sí lo hacen (64), y basan la diferencia entre / estas dos especies en otros ácidos distintos a los nuestros, como son el 3 OH 12:0 y el i-17:0 (Tabla XXVI)

La diferencia entre Ps.alcalígenes y Alcalígenes / faecalis la basamos en el ácido decanóico (10:0) presente en Ps. alcalígenes y en la ausencia de 2 ó 3 OH 12:0, diferencia éstas no coincidentes con las obtenidas por MOSS Y DEES (65) quienes hablan de la presencia dehidroxitetradecanóico (OH 14:0) en la especie Alcalígenes faecalis, basando la diferenciación en este ácido (Tabla XXVI)

Ps.pseudoalcalígenes y Ps.testosteroni se diferencian por la presencia del 2 ó 3 OH 14:0 y del a-17:0, así como por la ausencia del 2 ó 3 OH 12:0, datos éstos no coincidentes con MOSS y DEES (65) quienes cifran las diferencias en otros ácidos grasos, los mismo que diferenciaban Ps. alcalígenes de Ps.testosteroni ya que ellos no diferencian entre Ps. alcalígenes y Ps.pseudoalcalígenes. (Tabla XXVI).

Para distinguir Ps.pseudoalcalígenes de Alcalígenes faecalis podemos hacerlo por la presencia de 13:0, 2 ó 3 OH 14:0, a-17:0 y de 2 OH 16:0, así como por la ausencia del 3 OH 12:0, datos éstos que tampoco concuerdan por los obtenidos por MOSS y / DEES (65), (Tabla XXVI)

Ps. testosteroni se puede distinguir del género Alcalígenes, por la presencia del 2 OH 16:0 a diferencia de MOSS y DEES (65) quienes basan la diferencia en el hidroxitetradecanóico / (OH 14:0)

El grupo III incluye a aquellos subgrupos cuyos perfiles cromatográficos no se corresponden con ninguno de los grupos estudiados anteriormente. Así distinguimos cinco subgrupos:

El subgrupo III-1, incluye a 7 cepas bacterianas con un perfil cromatográfico común, que se caracteriza por la presencia de los ácidos decanóico, undecanóico, tridecanóico (10:0,11:0 13:0), y uno no identificado con tiempo de retención 5, y anteiso 17:0 y por la ausencia de 19: Δ trans. Al subgrupo que más se / aproxima es el I-8 encabezado por Acinetobacter calcoaceticus var. Mima aunque difiere de él por la presencia del anteiso 17:0 es / por ello, que el subgrupo I-8 y el III-1 podemos definirlos por un perfil cromatográfico común con o sin el ácido anteiso heptadecanóico (a-17:0).

En este grupo III-1 todas las cepas que incluía se caracterizaron bioquímicamente como Acinetobacter calcoaceticus var. Hellea.

El subgrupo III-2 incluye 14 cepas con un perfil cromatográfico común, este perfil se aproxima mucho al del subgrupo I-1 (Ps.aeruginosa) con la diferencia de que carece de 19: Δ / trans, ácido presente en este subgrupo. Cabe decir que el 86'6% de las cepas incluidas en este grupo fueron clasificadas bioquímicamente dentro de un grupo íntimamente relacionado, así, 3 / (20%) fueron Ps. fluorescens, 5 (40%) Ps.aeruginosa y 4 (20%) / Ps.putida; y cepas con las características común de oxidar el OF glucosa y el ser oxidasa positivas, y las diferencias entre / ellas es por una sola reacción bioquímica.

Dentro del subgrupo III-3 el perfil cromatográfico se caracteriza por la presencia de los ácidos; 10:0,11:0 y 13:0 y 2 ó 3 OH 12:0. Cabe destacar que todas las cepas incluidas en este subgrupo entran bioquímicamente dentro de un grupo taxonómicamente muy relacionado (Ps.maltophilia, Acinotobacter calcoaceticus var Mima y Ps. pseudoalcaligenes) diferenciándose entre ellas por una ó dos pruebas bioquímicas.

El subgrupo III-4 incluyen a dos cepas que se identificaron bioquímicamente como Ps. aeruginosa y Ps. cepacia, / presentando un perfil cromatográfico común caracterizado por la presencia del hidroxidodecanóico y del a-17:0, ácidos fundamentales en el perfil cromatográfico de Ps.fluorescens siendo éste el perfil al que dicho grupo se aproxima más.

El grupo III-5 incluye a 3 cepas con un perfil cromatográfico común y muy típico ya que presentan un ácido graso que no aparecía en ninguno de los cromatogramas estudiados anteriormente. Es este el a-15:0. Estas tres cepas aunque bioquímicamente se han tipado como especies distintas las tres pertenecen al mismo grupo por ser oxidasa negativas y no actuar sobre la glucosa por vía oxidativa.

El último grupo está caracterizado por aquellas cepas (5) cuyos perfiles cromatográficos no quedan incluidos dentro de los 23 grupos anteriores. Cada una de estas cepas presentaba un cromatograma muy diferente. Así, la primera se caracteriza por carecer del 17: Δ , ácido éste presente en todos los grupos anteriores estudiados excepto en el grupo I-12 (Flavobacterium), así como por la presencia de tres ácidos no identificados que por sus tiempos de retención podrían coincidir /

con tres de los no identificados en este grupo, pero a diferencia de él, carecen del 2 OH 16:0 y de 19:Δ cis. La segunda cepa, al grupo que más se aproxima por su cromatograma es al II-2 y al II-3, aunque difiere de ellos en la presencia de un ácido no identificado de tiempo de retención 5. La tercera no se aproxima a ninguno de los subgrupos previamente establecidos. La cuarta, al subgrupo que más se aproxima es al I-1, pero con ácido decanoico y sin 19:Δ trans. La quinta se aproxima al cromatograma de Ps. fluorescens, pero con 19:Δ trans, esta cepa, bioquímicamente se identificó como Ps. aeruginosa, mientras que las 4 anteriores incluidas en este último grupo no pudieron identificarse bioquímicamente por los esquemas por nosotros establecidos (Esquemas 1 y 2)

TABLA XXVI

"Diferenciación por CLG del género Alcaligenes y especies de Pseudomonas relacionadas"

<u>ácido graso</u>	<u>Tº de retención</u>	<u>Ps. alcaligenes</u>	<u>Ps. pseudoalcaligenes</u>	<u>Ps. testosteroni</u>	<u>Alc. faecalis</u>	<u>Alc. faecalis var odorans</u>	<u>Alc. faecalis var denitrificans.</u>
10:0	1'9	+	-	-	-	-	-
13:0	5'6	+	+	+	-	+	-
2 ó 3 OH 12:0	6'9	-	-	+	+	+	+
NI	9	+	-	-	+	+	+
NI	9'5	-	+	+	-	-	-
2 ó 3 OH 14:0	12'7	-	+	-	-	-	-
a-17:0	16'7	-	+	-	-	-	-
2 OH 16:0	20	-	+	+	-	-	-
19: Δ trans	27	-	-	-	+	-	-

+ = Presencia.

- = Ausencia.

4.3.- ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD

Un criterio adicional a la identificación de / los BGNNF es el estudio de la sensibilidad de estos microorganismos frente a diferentes drogas antimicrobianas (36,38 / 73), es por ello que, en la presente memoria, estudiamos el comportamiento de las 120 cepas frente a 16 antibióticos con el fin de establecer patrones de sensibilidad que aporten más datos al estudio de este grupo bacteriano (36,53,73).

De nuestros resultados podemos decir que de todos los antibióticos ensayados, los que muestran una mayor actividad han sido Cefoperazona y Azlocilina, ya que aunque en general los valores de CMI obtenidos fueron muy similares para todos los grupos, hay algunos como el D(Ps.alcaligenes), y G(Ps.-putrefaciens) que mostraron los valores más bajos de CMI mien-

tras que el grupo L (Flavobacterium) muestran los valores de CMI más altos. Al contrastar nuestros datos con los de otros autores, nos encontramos que los valores de CMI obtenidos para el grupo A (Ps.aeruginosa) frente a Cefoperazona son muy / similares a los encontrados por ellos (60,79,86) mientras que para el grupo (Acinetobacter) obtenemos unos valores de CMI in termedios a los obtenidos por otros autores (86,108).

Igual ocurre con Azlocilina, que los valores de CMI por nosotros obtenidos son superponibles para el grupo A / (Ps.aeruginosa) a los obtenidos por DAMASO y cols (19) y PEREA y cols. (80). Los otros grupos de BGNNF no son estudiados por / ellos (19,80).

Los valores de CMI obtenidos para los aminoglicósid^os (Gentamicina, Tobramicina, Amicacina y Sisomicina) fueron muy similares para todos los grupos ensayados excepto para el grupo E (Ps.cepacia) que mostró valores muy altos para todos / los amiglicósidos, menos para la Gentamicina que muestra unos / valores relativamente bajos. Nuestros datos para el grupo A (Ps. aeruginosa) están en correlación a los obtenidos por PEREA y / cols(80), el resto de los grupos no son estudiados por ellos.

Los restantes autores consultados estudian la sensibilidad frente a aminoglicósidos por el método de difusión en agar (38,53,74), por lo que ellos hablan sólo de sensibili--dad o resistencia, el único aminoglicósido común a los estudia--dos por nosotros es la Gentamicina, así tenemos que KING y PHI LIPS (53) al igual que GILARDI (37) hablan de que Ps.cepacia /

es resistente a este aminoglicósido, datos éstos no coinciden en su totalidad con los nuestros que obtenemos un 66'6% / de inhibición de crecimiento a la menor concentración ensayada .

Por otra parte, RUDELL y cols (87), estudian la sensibilidad de tres especies de BGNNF (Acinetobacter, Ps.maltophilia, y Ps.aeruginosa) frente a Gentamicina, nuestros resultados concuerdan con los suyos para Ps. maltophilia y Acinetobacter pero no para Ps.aeruginosa, OBERHOFER y cols (74) / coinciden con nuestros resultados, si bien ellos al igual que RUDELL y cols (74,87) no hacen determinación de CMI.

Todos los grupos ensayados mostraron valores relativamente bajos de CMI frente a Colistina,, a excepción de / los grupos E. (Ps.cepacia) y L (Flavobacterium), datos éstos coincidentes con los obtenidos por OBERHOFER y cols(74), y por GILARDI (37). Nuestros datos también concuerdan con otros autores (6,53,73,87). El género Acinetobacter se muestra bastante susceptible a colistina (6,22)también tenemos que hacer notar que la determinación de sensibilidad lo hacen por un método / distinto al nuestro.

La actividad de Trimetoprim-Sulfametoxazol frente a los diferentes grupos de BGNNF fué similar para todos ellos, mostrando los valores más bajos de CMI los grupos G (Ps.putrefaciens), H (Ps.stutzeri) y L (Flavobacterium), nuestros resultados podemos compararlos con los de OBERHOFER (74) que hace un estudio de sensibilidad del grupo de Pseudomonas resistente a / colistina, frente a una sulfamida (Sulfametoxazol), entre ellas

destaca la Ps.cepacia, obteniendo unos valores de actividad de éste antibiótico frente a Ps.cepacia superior a los nuestros, aunque próximos.

Según estos resultados, sólo hemos establecido / patrones de sensibilidad a 5 antibióticos para 3 grupos de BGNNF (G,E y L) de todos los ensayados (Tabla XXV), ya que, observamos que el grupo G (Ps.putrefaciens) muestra un patrón de sensibilidad muy típico, al igual que el grupo E (Ps.cepacia) y L (Flavobacterium) Podemos decir que el grupo G (Ps.putrefaciens) muestra los valores de CMI más bajos de todos los grupos ensayados y / frente a todos los antibióticos. Esta especie no es estudiada por OBERHOFER y cols(74). Mientras que el grupo E (Ps.cepacia) y el L (Flavobacterium) presenta los valores más altos, datos éstos coincidentes con los obtenidos por OBERHOFER y cols(74) para los antibióticos ensayados comunes a los nuestros (Colistinaa). Es destacable añadir que si bien, al igual que KING y PHILIPS (53) y GILARDI (38) reconocemos las dificultades que entraña la determinación de la sensibilidad frente a distintos antibióticos, con / fines taxonómicos, hemos podido establecer unos patrones de sensibilidad para estos 3 grupos, que no aportan ningún criterio / taxonómico adicional a los ya empleados.

CONCLUSIONES

- 1.- La aplicación de 25 pruebas bioquímicas nos ha permitido unificar los esquemas de identificación existentes de las Bacterias Gram Negativas No Fermentadoras (BGNNF),
- 2.- No se han observado diferencias significativas en los resultados obtenidos con la lectura de / las pruebas bioquímicas a las 48 y 96 horas.
- 3.- Las 25 pruebas bioquímicas utilizadas, han permitido la identificación del 96'6% de las cepas en sayadas.
- 4.- En método seguido para la Cromatografía Líquido Gaseosa (CLG) nos ha llevado en un periodo corto de tiempo a detectar los ácidos grasos estructurales de estas bacterias.

- 5.- La hidrólisis previa a la esterificación ha permitido una mejor detección de los hidroxiácidos
- 6.- La esterificación con trifluoruro de boro-metanol no ha interferido en la detección de los ácidos / grasos ciclopropanos, constituyentes de muchas / BGNNF.
- 7.- La extracción de los esteres metílicos con hexano, en sustitución de la mezcla cloroformo-hexano, ha simplificado el método.
- 8.- El uso de la columna ligeramente polar OV-17/fenil metil silicona, ha permitido la detección de hidroxiácidos, así como de otros ácidos constituyentes de las BGNNF.
- 9.- La elección de la temperatura programada ha hecho posible, en 20 minutos, la separación de los ácidos grasos de 10 a 20 átomos de carbono.
- 10.- El tiempo medio necesario total para la determinación de los ácidos grasos estructurales de una / BGNNF ya aislada, ha sido de 2 horas.
- 11.- No ha habido interferencia, determinada por CLG, entre la composición del medio de cultivo agar / tripticasa soja y la de las Bacterias Gram Negativas No Fermentadoras.
- 12.- Por CLG se han identificado el 95'6% de las cepas ensayadas.

- 13.- Los ácidos grasos comunes a todas las BGNNF encontrados son: tetradecanóico (14:0), pentadecanóico (15:0), hexadecanóico (16:0), ácido ciclopropano de 17/átomos de carbono (17: Δ) y octadecanóico / (18:0).
- 14.- En el género Flavobacterium no se han detectado los ácidos grasos: hexadecanóico (16:0), ácido ciclopropano de 17/átomos de carbono (17: Δ) y octadecanóico (18:0).
- 15.- Hemos establecido 12 grupos (A-L) según características bioquímicas y 23 subgrupos (I-1 a I-12; II-1 a II-6 y III-1 a III-5) atendiendo a los perfiles cromatográficos.
- 16.- Los subgrupos que han presentado una correlación / total entre la identificación cromatográfica y la / bioquímica han sido: I-5 (Ps. cepacia), I-6 (Ps. maltophilia), I-7 (Ps. putrefaciens) y I-12 (Flavobacterium).
- 17.- Las dos variedades de Acinetobacter calcoaceticus, Mima y Herellea, podemos considerarlas como un sólo género por sus ácidos grasos y reactividad bioquímica.
- 18.- Alcaligenes faecalis, Ps. alcaligenes y Ps. pseudoalcaligenes, especies difícilmente diferenciables por sus características bioquímicas, pueden ser diferenciadas entre sí por su composición estructural en /

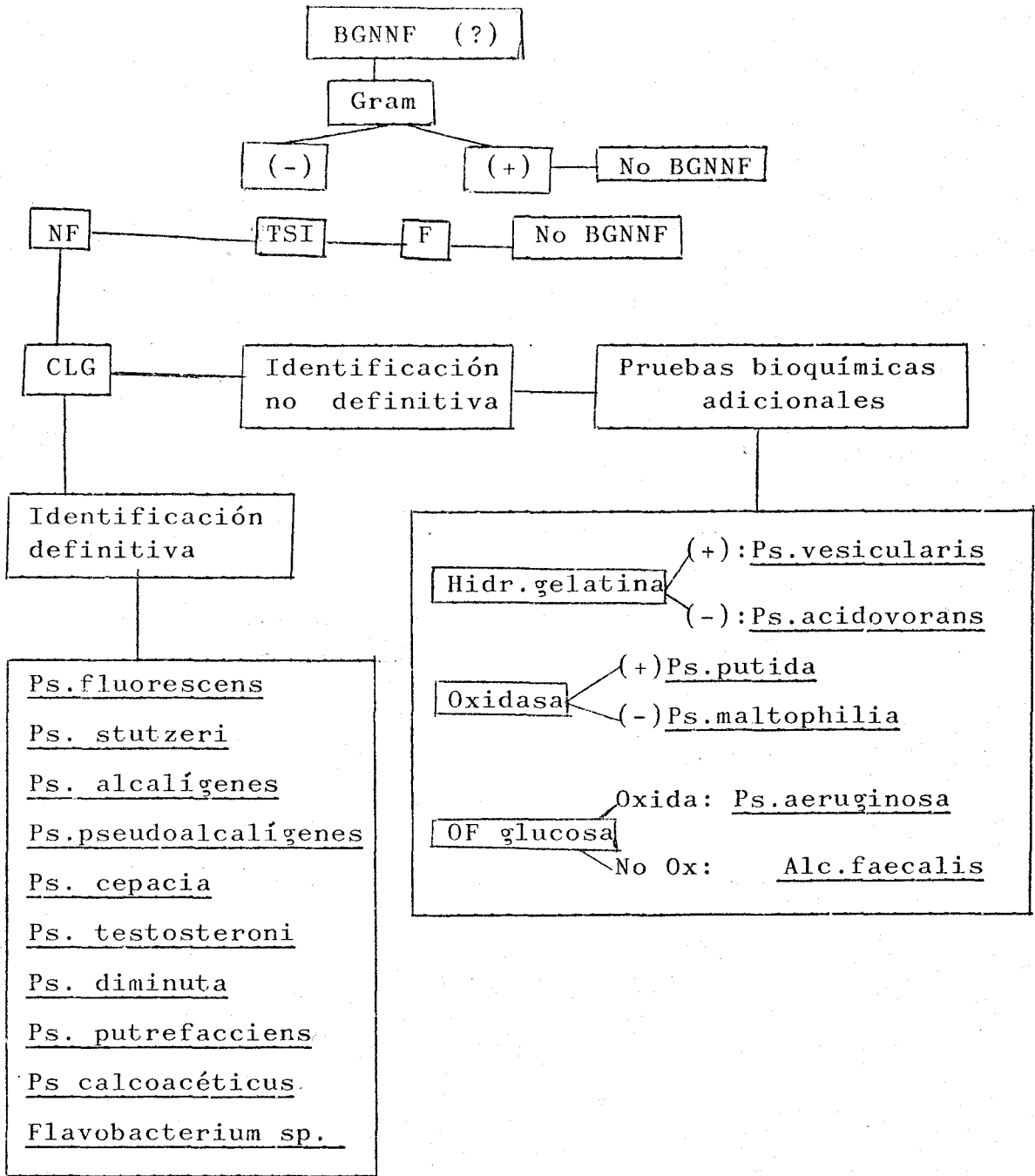
ácidos grasos, determinada por CLG.

- 19.- La sensibilidad a antibióticos de las BGNNF no es un criterio taxonómico que permita su clasificación, por tener todas ellas un comportamiento muy similar frente a los antibióticos ensayados

- 20.- Sólo los grupos E (Ps. cepacia), G (Ps. putrefaciens) y L (Flavobacterium) han presentado unos patrones típicos de sensibilidad frente a los antibióticos ensayados.

- 21.- De acuerdo con lo anterior, los pasos a seguir para la identificación de una posible Bacteria Gram Negativa No Fermentadora serían: (Tabla XXVII)

TABLA XXVII
=====



BGNNF = Bacteria Gram Negativa No Fermentadora

NF = No Fermenta

F = Fermenta

TSI = Triple azúcar e hierro

CLG = Cromatografía Líquido Gaseosa

Hidr. = Hidrólisis

Ox. = Oxida.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- ABEL, K, SCHMERTZING, H de AND PETERSON, J.I. 1.963
"Classification of Microorganisms by Analysis of Chemical Composition I. Feasibility of Utilizing Gas / Chromatography".
J. Bacteriol 85:1.039

- 2.- AJELLO, G.W and HOADLEY, A.W. 1.976
"Fluorescent Pseudomonads Capable of Growth at 41°C but Distinct from Pseudomonas aeruginosa".
J. Clin. Microbiol 4:443

- 3.- APPELBAUM, P.C, STAVITZ, J. BENTZ, M.S. and KUSTER, L (1.980)
"Four Methods for Identification of Gram Negative / Nonfermenting Rods. Organisms More Commonly Encountered in Clinical Specimens".
J. Clin. Microbiol 12:271

- 4.- BALLARD,R.W., DOUDOROFF,M, STANIER,R.Y and MANDEL,M
1.968.
"Taxonomy of the Aerobic Pseudomonads. Pseudomonas diminuta and Pseudomonas vesicularis".
J. Gen. Microbiol. 53: 349.
- 5.- BALLARD,R.W, PALLERONI,N.J.,DOUDOROFF,M,STANIER,R.Y
and MANDEL, M. 1.970
"Taxonomy of the Aerobic Pseudomonads: Pseudomonas cepacia, P.marginata, P. alluacada, and P.cerophilii".
J. Gen. Microbiol. 60: 199.
- 6.- BERGOGNE-BEREZIN,E. et LAMBERT-ZECHOYSKY N. 1.976
"Sensibilité des Acinetobacter (Moraxella du Groupe II) aux Antibiotiques de la Famille des Polymixines".
Méd. et. Mal. Infect. 6: 315.
- 7.- BLAZEVIC,D.J. and EDERER,G.M. 1.975
"Principles of Biochemical Test in Diagnostic Microbiology".
John Wiley and Sons. New York
- 8.- BRIAN,B,L. and GARDER,E.W. 1.968
"A simple Procedure for Detecting the Presence of / Cyclopropane Fatty Acids in Bacterial lipids".
Appl. Microbiol. 16: 549.
- 9.- BRODEY,M.V. GRAIG,W.A. and KUNIN,C.M., 1.980
"Ly 127935 and Cefoperazone Sodium (T-1551),two lactam Antibiotics with Anti-Pseudomonas Activity".p-74
En Current Chemotherapy, Proceedings of the 11 th International Congress of Chemotherapy. American / Society for Microbiology, Washington.D.C.

- 10.- BROOKS, J.B., WEAVER, R.E., TATUM, H.W. and BILLINGSLEY, S.A. 1.972
"Differentiation between Ps. testosteroni and Ps. / acidovorans by Gas Chromatography".
Can. J. Microbiol. 18: 1.477.
- 11.- BUCHANAN, R.E. and GIBBONS, N.E. 1.974
"Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" /
8^a Ed. The Williams and Wilkins Co. Baltimore.
- 12.- CLARKE, P.H. and RICHMOND, M.H. 1.975
"Genetics and Biochemistry of Pseudomonas".
John Wiley and Sons. New York
- 13.- CLESKEY, F.K. Mc., and ADANS, E.D. 1.980
"Isolation of Oxidase-Negative Pseudomonas aerugino-
sa from Urine Culture".
J. of Clin. Microbiol. 12: 624.
- 14.- CORCOS, A. 1.972
"Mort du Foetus "in Utero" par Infection Placentaire
a "Moraxella Lwoffii".
Sem. Hôp. Paris 48:511.
- 15.- CHEN, M.G. and CHEN P.M.S. 1.980
"Identification of Non-fermentative Gram-negative Ba
cilli by Gas Chromatography".
Natl. Sci. Counc. Repub. Chine. 4(4): 405
- 16.- CHERRIL, W.B. and MOSS, C.W. 1.969
"The role of Gas Chromatography in the Clinical Micro-
biology Laboratory".
J. Infect. Dis: 119: 658

- 17.- CHO,K.Y and SALTON.M.R.J. 1.966
"Fatty Acid Composition of Bacterial Membrana and Wall Lipids".
Biochim. Biophys. Acta: 116: 73
- 18.- DAILEY,R.H. and BENNER,E.J. 1.968
"Necrotizing Pneumonitis due to the Pseudomonad".
"Eugonic Oxidizer- Group I".
N.Engl. J. Med.
- 19.- DAMASO,D.,ORDEN,B.ROYO,G.,DAZA, R.M. and MORENO LOPEZ,M
1.980.
"Activity of Cefsoludin, Cefotaxime,Azlocillin, Mezlocillin, Ticarcillin, Carbenicilin, and Cefoperazone / Against Pseudomonas aeruginosa".p 192
En Current Chemotheraphy, Proceedings of the 11 th / International Congress of Chemotherapy. American Society for Microbiology. Washington D.C.
- 20.- DEES,S.B. and MOSS,C.W. 1.975
"Cellular Fatty Acids of Alcaligenes and Pseudomonas Species Isolates from Clinical Specimens".
J. Clin. Microbiol. 1: 414.
- 21.- DEES,S.B., MOSS,C.W.,WEAVER,R.E and HOLLIS,D. 1.979
"Cellular Fatty Acid Composition of Pseudomonas paucimobilis and groups II-K-2, Ve-1 and Ve-2
J. Clin. Microbiol. 10: 206.
- 22.- DENIS,F. and BEAREZ,M.C. 1.972
"Importance en pathologie humaine et sensibilité aux antibiotiques des Acinetobacter (Moraxella Oxydase negative).
Méd. Mal. Inf. 2: 219

- 23.- DEWRY, D.T., LOMAX, J.A., GRAY, G.W. and WILKINSON, S.G. 1.973
"Studies of Lipid A Fractions from the lipopolysaccharides of Pseudomonas aeruginosa and Pseudomonas alcaligenes".
Biochem. J. 133:563
- 24.- DHAWAN, V.K., RAJASHEKARAI AH, K.R., METZGER, W.I. RICE, T.W. and KALLICK, C.A. 1.980
"Spontaneous Bacterial Peritonitis Due to Group II-K-2 strain".
J. Clin. Microbiol. 11:492.
- 25.- DIEDRICH, D.L. and COTA-ROBLES, E.H. 1.974
"Heterogeneity in Lipid Composition of the Outer Membrane and Cytoplasmic Membrane of Pseudomonas BAL-31
J. Bacteriol. 119:1.006
- 26.- EDMONS, P. and COONEY, J.J. 1.969
"Lipids of Pseudomonas aeruginosa Cells Grown on Hydrocarbons and on Trypticase Soy Broth".
J. Bacteriol. 98:16.
- 27.- ELLIOT, T.B., GILARDI, G., HUGH, R. and WEAVER, R.E. 1.975
"Identification of Glucose Non-Fermenting Gram Negative Rods".
75 th. Annual Meeting of the American Society for Microbiology New York
- 28.- FADDIN, J.F. Mac. 1.980
"Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria".
Williams and Wilkins. Baltimore.

- 29.- FEMSOM,. A.H. and GRAY,G.W. 1.969
"The Chemical Composition of the Lipoolysaccharide of Pseudomonas aeruginosa".
Biochen J. 114:185.
- 30.- FISCHER,R.A. DOERN,G.V and CHEESEMAN,S.H. 1.981
"Pseudomonas denitrificans, Meningitis"
J.Clin. Microbiol. 13:1.004.
- 31.- FUJITA,S.YOSHIDA,T. and MATSUBARA,F. 1.981
"Pseudomonas pickettii, Bacteriemia"
J.Clin. Microbiol 13:781
- 32.- FULK,W. and SMORB,M.S. 1.970
"Production of an Artifact during Methanolysis of Lipids by Boron Trifluoride-Methanol."
J. Lipid. Res. 11:276.
- 33.- GARDNER,P.GRIFFIN.W.B.,SWARTZ,M.N. and KUNZ,L.J. 1.970
"Non fermentative Gram Negative Bacilli of Nosocomial Interest". Noticias Medicas 48:735.
- 34.- GHANEKER,A.S. and NAIR,P.M. 1.973.
"Evidence for the existence of an Aerobic pathway for synthesis of Monounsaturated".
Fatty Acids by Alcaligenes faecalis".
J. Bacteriol. 114:618
- 35.- GHANEKER,A.S and NAIR,P.M. 1.974
"Lipids of Alcalíges faecalis"
Indian. J. Biochem Biophys. 11 (3): 233.

- 36.- GILARDI, G.L. 1.971
"Antimicrobial Susceptibility as a Diagnostic aid in the Identification of Non-fermenting Gram-Negative Bacteria".
Appl. Microbiol. 22:821.
- 37.- GILARDI, G.L. 1.972
"Practical Schema for the Identification of Non fermentative Gram Negative Bacteria encountered in Medical Bacteriology".
Am. J. Med. Techn. 38: 65.
- 38.- GILARDI, G.L. 1.975
"Identification of Glucose Non fermentative Gram Negative Rods".
75 th Annual Meeting of the American Society for /
Microbioly. New York.
- 39.- GIRARD, A.E. 1.971
"A Comparative study of the Fatty Acids of some Micrococcus".
Can. J. Microbiol 17: 1.503
- 40.- HAMPTON, R.D. and WASILAUSKAS, B.L. 1.979
"Isolation of Oxidasa-Negative Pseudomonas aeruginosa from Sputum Culture".
J. Clin. Microbiol. 9:632.
- 41.- HANCOCK, I.C. HUMPHREYS, G.O. and MEADOW, P.M. 1.970
"Characterization of the hydroxyacids of Pseudomonas aeruginosa 8602".
Biochem. Biophys. Acta 202:521.

- 42.- HANCKOCK, I.C and MEADOW, P.M. 1.969
"The extractable Lipids of Pseudomonas aeruginosa"
Biochem. Biophys. Acta 187:366
- 43.- HENIS, Y. GOULD, J.R. and ALEXANDER, M. 1.966
"Detection and Identification of Bacteria by Gas Chromatography".
Appl. Microbiol. 14:513
- 44.- HOLMES, B. and OWEN, R.J. 1.979
"Proposal that Flavobacterium breve be Sustituted as the Type Species of the Genus in Place of Flavobacterium aquatile and Emended Description of the Genus Flavobacterium: Status of the Named Species of Flavobacterium".
Int. J. Syst. Bacteriol 29:416
- 45.- HOLMES, B. OWEN, R.J. and WEAVER, R.E. 1.981
"Flavobacterium multivorum, a New Species Isolated from Human Clinical Specimens" and Previously Known as Group II-K biotype 2".
Int. J. Syst. Bacteriol. 31:21
- 46.- HUGH, R. and GILARDI, G.L. 1.974
"Pseudomonas" p 250 En E.H. LENNETTE, E.H. SPAULDING and J.P. TRUANT (eds) p 250
Manual of Clinical Microbiology 2nd Ed. American Society for Microbiology. Washington D.C.
- 47.- HUGH, R. and LEIFSON, E. 1.953
"The Taxonomic Significance of Fermentative versus Oxidative Metabolism of Carbohydrates by various Gram Negative Bacteria".
J. Bacteriol. 66:24

- 48.- JOGERSEN, J.H., CRAWFORD, S.A. and ALEXANDER G.A. 1.980
"In vitro Activities of Cefotaxime (HR-756) and Ly 127935 Against Pseudomonas aeruginosa and other Non-fermentative or Oxidase Positive Bacilli." p. 78
En Current Chemotherapy, Proceedings of the 11 th International Congress of Chemotherapy American Society for Microbiology. Washington D.C.
- 49.- KALTENBACH, C.M. MOSS, W.C. and WEAVER, R.C. 1.975
"Cultural and Biochemical Characteristics and Fatty Acid Composition of Pseudomonas diminuta and Pseudomonas vesiculare".
J. Clin. Microbiol. 1: 339
- 50.- KANEDA, T. 1.967
"Fatty Acids in the Genus Bacillus".
J. Bacteriol 93:894.
- 51.- KEY, B.A. GRAY, G.W. and WILKINSON, S.G. 1.970
"The Purification and Chemical Composition of the Lipopolysaccharide of Pseudomonas alcaligenes".
Biochem. J. 120: 559.
- 52.- KING, E.O. 1.964
"The identification of Unusual Pathogenic Gram Negative Bacteria".
Us. Dept. Hlth, Educ. Welf. Center for Disease Control. Atlanta, Georgia.
- 53.- KING, A. and PHILLIPS, I. 1.978
"The Identification of Pseudomonads and Related Bacteria in a Clinical Laboratory".
J. Med. Microbiol. 11:165

- 54.- LAMBERT, M.A. and ARMFIELD, A.Y. 1.979
"Differentiation of Peptococcus and Peptostreptococcus
by Gas-Liquid Chromatography of Cellula".
J. Clin. Microbiol. 10:464.
- 55.- LAMBERT, M.S. and MOSS, C.W. 1.977
"Degradation of Bacterial Cyclopropane Acids with
boron-trihalide reagents"
Microbios 18:51
- 56.- LEWIS, V.J., MOSS, C.W. and JONES, W.L. 1.967
"Determination of Volatile Acid Production of Clostridium
by gas Chromatography".
Can. J. of Microbiol. 13:1.033.
- 57.- LOUGH, A.K. 1.964
"The Production of Methoxy-substituted Acids as Artifacts
during the Esterification of unsaturated Fatty Acids /
with Methane containing Boron-Trifluoride",
Biochem J. 90: 46
- 58.- MANDEL, M. 1.966
"Deoxyribonucleic Acid Composition in the Genus Pseudo-
monas".
J. Gen. Microbiol. 43:273.
- 59.- METCALF, L.D. SCHMETS, A.A., and PELKA, J.R. 1966
"Rapid Preparation of Fatty Acids Esters from lipids
for Gas Chromatographic Analysis".
Anal. Chem. 38: 514.

- 60.- MITCHELL,V.B., GRAIG,W.A and KUNIN,C.M. 1.980
"Ly 127925 and Cefoperazone sodium (T-1551),two
 β -lactam Antibiotics with Anti-Pseudomonas Ac
tivity". p 74
Current. Chemotherapy, Proceedings of the 11 th In
ternational Congress of Chemotherapy. American Socie
ty for Microbiology Washington,D.C
- 61.- MITRUKA,B.M. 1.975
"Gas Chromatographic Applications in Microbiology /
and Medicine".
Ed. Soh Wiley and Sons...New York
- 62.- MITRUKA,B.M. and ALEXANDER,M. 1.967
"Ultrasensitive Detection.of Certain Microbial Me-
tabolite by Gas Chromatography".
Annal. Biochem. 20:548.
- 63.- MOORE,W.E.C. 1.970
"Relationship of Metabolic Products to Taxonomy of
Anaerobic Bacteria".
Int. J. Sys. Bacteriol. 20:535
- 64.- MOSS,C.W. and DEES,S.B. 1.975
"Identification of Microorganisms by Gas Chromatogra-
phyc-mass Spectrometric Analysis of Cellular Fatty /
Acids".
J. Chromatogr. 112: 595.

- 65.- MOSS,C.W. and DEES,S.B. 1.976
"Cellular Fatty Acids and Metabolic Products of Pseudomonas Species Obtained from Clinical Specimens".
J. Clin. Microbiol. 4:492
- 66.- MOSS,C.W. and DEES,S.B 1.978
"Cellular Fatty Acids of Flavobacterium meningosepticum Species Group II b".
J. Clin. Microbiol. 8: 772.
- 67.- MOSS,C.W and KALTENBACH,C.M. 1.974
"Production of Glutaric Acid a Useful Criterion for Differentiating Pseudomonas diminuta from Pseudomonas vesicularis."
Appl. Microbiol. 27 (2): 437
- 68.- MOSS,C.W. LAMBERT,M.A. and MERWIN,W.H. 1.974
"Comparison of Rapid Methods for Analysis of Bacterial Fatty Acids".
Appl. Microbiol. 28:80.
- 69.- MOSS,C.W. and LEWIS,V.J. 1.966
"Characterization of Clostridia by Gas Chromatography -I. Differentiation of Species by cellular Fatty Acids".
Appl. Microbiol 15:390.
- 70.- MOSS,C.W. SAMUELS,S.B. and WEAVER,R.E. 1.972
"Cellular Fatty Acid Composition of Selected Pseudomonas Species".
Appl. Microbiol. 24:596.

- 71.- MOSS,C.W. SAMUEL,S.B. LIDDLE,J. and MCKINNEY,R.M.
(1.973).
"Ocurrence of Branched-chain Hidroxy Fatty Acids
in Pseudomonas maltophilia"
J. Bacteriol 114:1.018
- 72.- OBERHOFER,T.R. 1.979
"Growth of Nonfermentative Bacteria at 42°C".
J. Clin. Microbiol. 10:800
- 73.- OBERHOFER,T.R. 1.980
"Cultural and Biochemical characteristics of Clinical Isolates of Unusual Colistin -Resistant Pseudomonads".
J. Clin. Microbiol. 12:156
- 74.- OBERHOFER,T.R. ROWEN,S.W. and CUNNINGHAN,G.F. 1.977
"Characterization and Identification of Gram Negative Nonfermentative Bacteria".
J. Clin. Microbiol 5:208
- 75.- OTTO,L.A and PICKETT, M.J. 1.976
"Rapid Method for Identification of Gram Negative Nonfermentative Bacilli".
J. Clin. Microbiol: 3:566
- 76.- OYAMA,U.I. 1.963
"Use of Gas Chromatography for the Detection of Life on Mars"
Nature 200:1.058

- 77.- PALLERONI, N.J., BALLARD, R.W., RALSTON, E. and DOUDOROFF, M. 1.972
"Deoxyribonucleic Acid Homologies Among some Pseudomonas Species".
J. Bacteriol. 110:1
- 78.- PALLERONI, N.J., KUNISAWA, R., CONTOPOULOU, R. and DOUDOROFF, M. 1.973
"Nucleic Acid Homologies in the Genus Pseudomonas".
Int. J. Syst. Bacteriol. 23:333.
- 79.- PEDERSEN, M.M. MARSO, E. and PICKETT, M.J. 1.970
"Nonfermentative Bacilli Associated With Man. III. Pathogenicity and Antibiotic Susceptibility".
Am. J. Clin. Path. 54:178.
- 80.- PEREA, E.J. NOGALES, M.C., AZNAR, J., MARTIN, E. y GARCIA IGLESIAS, M.C. 1.980
"Sinergy between Cefotaxime, Cefsulodin, Azlocillin, Mezlocillin and Aminoglycosides Against Carbenicillin-Resistant or Susceptible Pseudomonas aeruginosa p.157.
En Current Chemotherapy, Proceedings of the 11 th International Congress of Chemotherapy. / American Society for Microbiology Washington D.C.
- 81.- PICKETT, M.J. and PEDERSEN, M.M. 1.970
"Nonfermentative Bacilli Associated with Man. II. Detection and Identification".
Am. J. Clin. Path. 54:164.
- 82.- PICKETT, M.J. and PEDERSEN, M.M. 1.968
"Screening Procedure for Partial Identification / of Non-Fermentative Bacilli Associated with Man".
Appl. Microbiol. 16:1.631.

- 83.- REDFEAN, M.S., PALLERONI, N.J. and STANIER, R.Y. 1.966
"A Comparative Study of Pseudomonas pseudomallei and Bacillus mallei".
J. Gen. Microbiol. 43:293
- 84.- RILEY, P.S. TATUM, H.W. and WEAVER, R.E. 1.972
"Pseudomonas putrefaciens Isolated from Clinical /
Specimens".
Appl. Microbiol. 24:798.
- 85.- RUBIN, S.J. GRANATO, P.A. and WASILAUSKAS, B.L. 1.980
"Glucose -Nonfermenting Gram-Negative Bacteria" p.263
En LENNETTE, E.H. BALOWS, A. HAUSLER, W.J. and TRUANT,
J.P. Manual of Clinical Microbiology 3^a Ed.
American Society for Microbiology. Washington. D.C.
- 86.- RUBIO-CALVO, M.C. y GOMEZ-LUS, R. 1.980
"In vitro Antibacterial Activity of Cefoperazone and
Ly 127935 against Aerobic Isolates" p. 67.
In Current Chemotherapy, Proceedings of the 11 th /
International Congress of Chemotherapy
American Society for Microbiology, Washington D.C.
- 87.- RUDELL, K.A and ANSELMO, C.R. 1.975
"Antibiotics Susceptibility Testing of Gram-Negative
Non-fermentative Bacilli".
Antimicrob. Agents. Chemother. 7:400
- 88.- SAMUELS, S.B., MOSS, C.W. and WEAVER, R.E. 1.973
"The Fatty Acids of Pseudomonas multivorans (Pseudo-
monas cepacia) and Pseudomonas Kingii".
J.Gen. Microbiol 74:275.

- 89.- SANDERS,C.C. SANDERS,W.E., DYKSTRA,M.A. and PREHEIM,
L.C. 1.980
"Ly 127935 (6059-S) a Novel β -lactam Antibiotic"/
p.69
In Current Chemotherapy, Proceedings of the 11 th
International Congress of Chemotherapy .
American Society for Microbiology. Washington D.C.
- 90.- SCHMIDT,V. KAPILA,R., KAMINSKI,Z., and LOURIA,D. /
1.979
"Pseudomonas putrefaciens" as a Cause of Septicaemia
in Humans".
J. Clin. Microbiol. 10:385
- 91.- SHAYEGANI,M., LEE,M.L. and PARSONS,L.M. 1.977
"A Scheme for Identification of Nonfermentative Gram
Negative Bacteria".
H.L.S. 14:83
- 92.- SNELL,J.J.S. 1.973
"The Distribution and Identification of Non-fermenta-
ting Bacteria".
Her Mayestic's Stationery Office -London-
- 93.- SPINO,D.F. and GELDREICH,E.E. 1.981
"Acinetobacter spp: Distinct Morfology on Eosin Me
thylene Blue Agar as an Aid to Identification in Drin
king water".
Appl. Envir. Microbiol. 41:1.063
- 94.- STANIER,R. PALLERONI,N.J. and DOUDOROFF,M. 1.966
"The Aerobics Pseudomonads a Taxonomic Study".
J. Gen. Microbiol. 43:159.

- 95.- STEERS, E.E., FOLTZ, F.L., GRAVES, B.S. and RIDER, J. 1.959
"An Inocula Replicating Apparatus for Routine Testing of Bacterial Susceptibility of Antibiotics".
Antibiot. Chemother 9:307
- 96.- STEINHAUER, J.E., FLENTGE, R.L. and LECHOVICH, R.V. 1.967.
"Lipid Patterns of selected Microorganisms as Determined by Gas-Liquid Chromatography".
Appl. Microbiol. 15:826
- 97.- TATUM, H.W. EWING, W.H. and WEAVER, R.E. 1.974
"Miscellaneous Gram Negative Bacteria".
En LENNETTE E.H. SPAULDING, E.H. and TRUANT, J.P. /
(eds). Manual of Clinical Microbiology 2^a Ed. -/
American Society for Microbiology Washington D.C.
- 98.- THORNE, K.J.I., THORNLEY, M.J. and GLAVERT, A.M. 1.973
"Chemical Analysis of the Outer Membrane and Other Layers of the Cell Envelope of Acinetobacter sp.".
J. Bacteriol. 116:410.
- 99.- THORNLEY, M.J., GLAVERT, A.M. and SLEYTR, U.B. 1.973
"Isolation of Outer Membranes with an Ordered Array of Surface Subunits from Acinetobacter sp.".
J. Bacteriol. 114:1.301
- 100.- TIESDAL, P.A. ROBERT, G.D. and ANHALT, J.P. 1.979
"Identification of Clinical Isolates of Micobacteria with Gas-Liquid Chromatography "Alone".
J. Clin. Microbiol. 10:506.

- 101.- VANDEPITTE, J., and DEBOIS, J. 1.978
"Pseudomonas putrefaciens as Cause of Bacteriemia
in Human"
J. Clin. Microbiol. 7:70
- 102.- WADE, T.J. and MANDLE, R.J. 1.974
"New Gas-Chromatographic Characterization Procedure-
Preliminary Studies on some Pseudomonads Species".
Appl. Microbiol. 27:303
- 103.- WASHINGTON, II, J.R. and BARRY, A.L. 1.974
"Dilution Test Procedures".
En LENNETTE, E.H., SPAULDING, E.H. and TRUANT, J.P. /
(eds). Manual of Clinical Microbiology
American Society for Microbiology. Washintong D.C.
- 104.- WAYNE, M.C. SAMUELS, S.B. and WEAVER, R.E. 1.972
"Cellular Fatty Acid Composition of Selected Pseu-
domonas Species".
Appl. Microbiol. 24:596.
- 105.- WILKINSON, S.G. 1.969
"Lipids of Pseudomonas diminuta".
Biochen. Biophys. Acta 187: 492.
- 106.- WILKINSON, S.G. and BELL, M.E. 1.971
"The Phosphoglucolipid from Pseudomonas diminuta".
Biochen. Biophys. Acta. 248:293.
- 107.- WILKINSON, S.G. and CAUDWELL, P.F. 1.980
"Lipid Composition and Chemotaxonomy of Pseudomo-
nas putrefaciens".
J. Gen. Microbiol. 118: 329.

- 108.- WILLIAMS,R.J. and WILLIAMS,J.D. 1.980
"Activity of three Cephalosporins and an Oxa- β
Lactam Compound Against *Pseudomonas aeruginosa*" p.87
En Current Chemotherapy, Proceedings of the 11 th
International Congress of Chemotherapy.
American Society for Microbiology, Washington D.C.
- 109.- YAMAKAWA,T, and UETA,N. 1.964
"Components.I. Carbohydrate and Fatty Acid Consti-
tution of Neisseria".
Japan J. Exp. Med. 34:361.

FACULTAD DE FARMACIA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes
en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de
Dña Estrella Martín Mazuelos
titulada "Identificación de Bacterias Gram Negativas
no fermentadas por Cromatografía
Líquido Gaseosa"

acordó otorgarle la calificación de
SOBRESALIENTE CON LAUDE

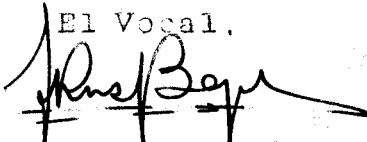
Sevilla, 18 de Diciembre de 1.982

El Vocal.



El Presidente.

El Vocal.



El Secretario.

El Vocal



El Doctorado.

