Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua
Unan-león

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Carrera de FARMACIA

Correlación de suspensiones estandarizadas de microorganismos por el método turbidimetrico vs escala de Macfarland.

Monografía para optar al título de químico farmacéutico.

Elaborado por:

- *Dunieska Lucia Aviles Gonzales.*
- *Kenia Roxana Delgado Espinales.*
- *Ana Gabriela Gómez Valenzuela.*

× *Lic. Kelvin Nuñez*

León abril 2010

Aviles Delgado Gomez Nuñez

ÍNDICE

1. Objetivos…… 2
2. Introducción…….. 3
3. Marco teórico…….. 4
   3.1Cuantificación de microorganismos……4
   3.2 Medida del número de células…… 5
   3.3 Medida de la masa celular……7
   3.4 Escala Macfarland……8
   3.5 Turbidimetria…….. 13
   3.6 espectrofotometría……14
   3.7 Microorganismos de prueba……22
   3.8 Análisis de correlación……26
4. Material y métodos ……31
5. Resultados ……..36
6. Conclusiones……52
7. Recomendaciones……53
8. Bibliografía ……54
9. Anexos……55

Avilés Delgado Gomez Nuñez

TEMA

Correlación de suspensiones estandarizadas de microorganismos por el método turbidimetrico vs escala de Macfarland realizado en el periodo Nov. 2009- Mar 2010 en el área de microbiología de el departamento de análisis de tóxicos y medicamentos de la Facultad de Ciencias Químicas

Aviles Delgado Gomez Nuñez

OBJETIVO GENERAL

- Determinar mediante los métodos turbidimetrico vs escala de Macfarland a que valores se obtienen mejores resultados en el análisis (absorbancia y tramitancia)

OBJETIVOS ESPECÍFICO

- Conocer el comportamiento de las muestras ensayadas por la influencia de parámetros como longitud de onda y tamaño de partículas.

- Establecer diferencia entre equipos utilizados en el ensayo espectronic 20 y espectrofotómetro Uv a través de los resultados obtenidos

Aviles Delgado Gomez Nuñez

INTRODUCCION

Las suspensiones de microorganismos son utilizadas desde los años setenta, para la época eran utilizadas en pruebas de difusión por disco. Alexander Fleming fue el pionero en utilizar suspensiones de microorganismos cuando trabajaba con la penicilina en los años cincuenta. En ese tiempo, había tantos procedimientos diferentes en uso como microbiólogos.

Los doctores Bauer, Kirby, Sherris y Turck probaron minuciosamente todas las variables involucradas en el proceso, tales como los medios de cultivo, la temperatura y el espesor del agar. En 1966, ellos publicaron su estudio cimero describiendo la prueba que se usa en la actualidad.

Actualmente se consideran dos métodos para la preparación de inóculos: *suspensión directa de colonias y fase logarítmica de crecimiento* sin embargo sólo el método de suspensión directa de colonias provee resultados precisos para ciertos organismos. En ambos métodos, la turbidez de la suspensión debe ser estandarizada considerando la escala de McFarland

El presente estudio plantea la necesidad de definir los parámetros que influyen en la prepararación de suspensiones de microorganismo, considerando lo anterior que dichas suspensiones son utilizadas como material de referencia "Estándares" en cultivos para establecer la eficacia, pureza o potencia de medicamentos ensayados

Lo anterior se sustenta en el hecho que la suspensión de microorganismos es uno de los principales ítem de referencia para cuantificación en microbiologia , existen factores como motilidad de el microorganismo, tamaño de las partículas, calibración del equipo espectrofotométrico utilizado, índice de refracción de la solución utilizada para la preparación de la suspensión que deben ser tomadas en cuenta para establecer la exactitud de el numero de colonias UFC presentes en dichas suspensiones que permitan establecer un recuento lo más exacto posible a fin de considerar el mínimo margen de error en resultados reportados en ensayos de medicamentos

Aviles Delgado Gomez Nuñez

MARCO TEÓRICO

CUANTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

La metodología para la cuantificación de microorganismos en microbiología suele estar apoyada de métodos instrumentales, que permitan la veracidad del contenido de unidades de bacterias viables presentes para establecer la correlación con muestras para ensayos que así lo requieran.

Los métodos más frecuentemente utilizados son:

- **Medida de el número de individuos o células**

  - Métodos Directos

    a) Contador electrónico de partículas (contador de Coulter)

    b) Mediante microscopio (cámaras de recuento de Newbaver, cámara de recuento de Petroff- Hauser).

  - Métodos Indirectos

    a) Recuento de viables

    b) Recuento de totales.

- **Medida de la masa celular.**

  - Métodos Directos

    a) Determinación de el peso humedo

    b) Determinación de el tiempo seco

    c) Determinación del nitrógeno total

    d) Determinación de un componente característico

  - Métodos Indirectos

    a) Medida de consumo de nutrientes o de producción de algún metabolito por unidad de tiempo

    b) Turbidimetria (densidad óptica).

    bi) Espectrofotómetro

    bii) Nefelómetro

Aviles Delgado Gomez Nuñez

MEDIDA DE EL NÚMERO DE INDIVIDUOS O CÉLULAS

Métodos Directos:

Contador electrónico de partículas (contador de Coulter)

Se hace pasar una suspensión microbiana por un tubo capilar, entre los dos polos de una corriente eléctrica. Cada vez que por un orificio (30 μm diámetro) pasa una partícula (p. ej., bacteria) se interrumpe la corriente, lo cual es recogido por un dispositivo de registro electrónico, que detecta el número y el tamaño de las partículas que van pasando. (El tamaño detectado es función de la intensidad del pulso de voltaje al paso de la partícula), tiene como desventaja que hay que usar suspensiones absolutamente libres de partículas extrañas (las pequeñas serían contabilizadas erróneamente como bacterias, y las mayores pueden obturar el orificio del aparato).

Cámara de recuento de Petroff-Hauser:

Consiste en un portaobjetos especial con una graduación en superficie y unas medidas muy concretas:

- Excavación con 0.02 mm de profundidad;
- Área de 1 mm^2, dividida en un retículo de 25 cuadrados grandes;
- Cada cuadrado grande está subdividido a su vez en 4x4 = 16 cuadrados pequeños.
- La muestra se distribuye en 16 x 25 = 400 celdillas (cuadros pequeños).

La muestra, una vez dispensada entre el porta y el cubre, se deja reposar sobre la plataforma del microscopio durante unos minutos, y se cuenta el número de células en varias celdillas (normalmente en 16, equivalentes a uno de los cuadros grandes). Se anota el número **n** de células observadas en esas 16 celdillas. Entonces, la concentración celular es fácil de establecer:

$$n \times 25 \times 50 \times 1000 = \text{concentración en células/ml.}$$

La técnica tiene como ventaja es un método muy rápido su desventajas esta en ser aplicable únicamente a suspensiones relativamente concentradas (>$10x10^6$ céls./ml). Por debajo de este valor el número de células vistas en el campo del microscopio es muy pequeño y poco significativo estadísticamente. En bacterias móviles, hay que inmovilizarlas previamente, con una mezcla de alcohol y agua.

Aviles Delgado Gomez Nunez

Métodos Indirectos

Recuento de viables en placa:

Conviene contar las células vivas, (Una célula se define como viable cuando, colocada en un medio adecuado, es capaz de dividirse y dar descendencia). El método habitual de lograr esto es sembrar pequeñas alícuotas de diluciones adecuadas de un cultivo original sobre placas de Petri con medio sólido (con agar). Cada célula viable dará origen a una colonia visible después del tiempo adecuado de incubación. Contando las colonias visibles, teniendo en cuenta la dilución de la que proceden y el volumen de alícuota utilizado, es fácil deducir el número de células viables en la suspensión original.

Recuento sobre filtros:

Se usa para suspensiones diluidas de bacterias. Se hace pasar un gran volumen de suspensión a través de una membrana de nitrocelulosa o de nylon estériles (con un diámetro de poro que retiene las bacterias pero permite el tránsito de sustancias). Posteriormente, el filtro se deposita sobre la superficie de un medio de cultivo sólido. Las colonias se forman sobre el filtro a partir de las células retenidas. Dichas colonias se cuentan, deduciéndose la concentración original de viables en función del volumen de suspensión que se hizo pasar por el filtro.

MEDIDA DE LA MASA CELULAR

El recuento de microorganismos en función de la masa celular contenida de bacterias formadoras de colonias puede establecerse por:

- **Métodos Directos:** En estos métodos se requieren preparaciones limpias, sin partículas extrañas.

1) Determinación del peso húmedo:

El procedimiento consiste en tarar un tubo de centrífuga; se centrifuga el cultivo y se elimina el sobrenadante; se determina el peso del sedimento. Esta técnica muestra inconvenientes por el error que incluye debido al líquido intercelular retenido, cuya cuantía depende a su vez de la forma y tipo de agrupaciones de la cepa, intensidad del empaquetamiento

Aviles Delgado Gomez Nuñez

2) Determinación del peso seco:

Esta tecnia se basa igual que en la determinación de el peso húmedo, difiere en que el sedimento formado se seca antes de ser pesado (105ºC, al menos por 8 horas), hasta peso constante. Las medidas de peso seco suelen representar el 10-15% de los valores de peso húmedo.El método muestra inconvenientes puesto que requiere mayor tiempo, aproximadamente 1 mg de peso seco equivale a unas $5x10^9$ bacterias.

3) Determinación del nitrógeno total: técnica de micro-Kjeldahl.

4) Determinación de un componente característico: peptidoglucano, ADN, ARN, proteínas, ATP, clorofilas en organismos fotosintéticos, se suele usar en bacterias para las que otros métodos más fáciles dan errores debido a que forman grumos no dispersables, crecen en filamentos, etc. Se emplean en determinaciones de crecimientos en ambientes naturales.

- **Métodos Indirectos:**

1) Medida de consumo de nutrientes o de producción de algún metabolito por unidad de tiempo. Ejemplos: consumo de oxígeno (QO_2) y consumo de carbónico (QCO_2), determinados por el respirómetro de Warburg. Permite establecer el recuento en función de la producción de ácidos por las bacterias.

2) Métodos turbidimétricos (ópticos). Son muy usados en la práctica cotidiana del laboratorio. La base común de estos métodos consiste en la medición de la cantidad de luz dispersada o transmitida a través de un cultivo bacteriano. Recordemos aquí que las suspensiones bacterianas dispersan la luz, al igual que cualquier partícula pequeña suspendida en agua (efecto Tyndall). La dispersión de la luz es, dentro de ciertos límites, proporcional a la masa del cultivo.

a) Espectrofotómetro: Este aparato es de uso habitual en cualquier laboratorio de Microbiología o Bioquímica. Mide la densidad óptica (D.O.), es decir la absorbancia (una medida de la luz transmitida a través de la suspensión). Por supuesto, hay que realizar una curva estándar para relacionar los valores de A con la masa bacteriana en una muestra problema;

Aviles Delgado Gomez Nuñez

La cantidad de luz dispersada es proporcional al cociente entre el tamaño de la partícula y la longitud de onda incidente; la sensibilidad de la técnica aumenta pues a longitudes de onda (λ) cortas. La proporcionalidad entre A y masa bacteriana sólo es válida para $>10^7$céls/ml.

b) Nefelómetro: Es un aparato similar al anterior, pero el dispositivo sensor está situado en ángulo recto respecto de la dirección de la luz incidente, y lo que se mide es pues, la luz dispersada directamente por la preparación. Posee mayor sensibilidad que el espectrofotómetro.

ESCALA DE MCFARLAND

En 1907 Both Macfarland introdujo el el primer estándar de turbidez para uso en bacteriología, utilizando una suspensión que contenía una mezcla de sulfato de bario preparado con una mezcla de acido sulfúrico, así mismo se expresaba que para un bacilo presente

En 1913-1914 – 1919.1920 Brown. Expreso que un número determinado de bacilos contenidos en una suspensión de diferentes especies de microorganismos tiene una densidad óptica diferente. En 1914-1915.Brown en colaboración con Kirwan ratificaron lo expresado

Posteriormente Macfarland y Brown refieren que los resultados de la determinación de la opacidad de una numero de bacilos pueden ser utilizados para un conteo, esta observación turbidimetrica permitió mejorar la tecnica que se utilizaba que establecía hacerlo a simple vista, cuando los métodos fueron introducidos en uso de rutina en bacteriología se describieron las leyes físicas de las luz para el traspaso de las suspensiones.

Mie en 1908 trabajo en la teoría que permitía establecer la luz de las partículas, algunos interesados consideraron una revisión de dicha teoría. Los diferentes laboratorios determinaron los valores de referencia de células en suspensiones de opacidad estándar empírica para establecer un conteo preliminar en suspensiones bacterianas teniendo una opacidad óptica y no a simple vista.

Aviles Delgado Gomez Nuñez

En 1953 la WHO, compuesta por los expertos del comité de estandarización bilógica , establecieron las preparaciones internacionales de referencia para la opacidad las que fueron recomendadas por Maaloe 1955, estas preparaciones de referencia fueron utilizadas para estimar la opacidad de las suspensiones bacterianas y no a simple vista.

Muchos laboratorios remplazaron la estimación a simple vista por varios instrumentos de tipo fotoeléctrico, algunos problemas que sucedieron permitieron el refinamiento de la técnica para introducir una conexión de algunas herramientas establecidos por la referencias internacionales de opacidad lo cual también necesito la discusión de resultados por errores que se presentaban al estimar o determinar la opacidad en función del tiempo,

Ciertos puntos fueron enfatizados cuando se considero que la luz transmitida a través de una suspensión reduce la intensidad en referencia a la concentración del material

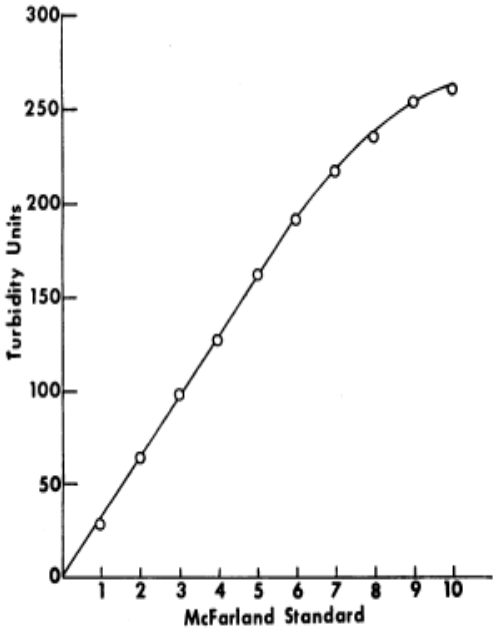


FIG. 1. *Relationship of McFarlands standard to Roessler-Brewer turbidity units.*

En trabajos microbiológicos e inmunológicos, las suspensiones son generalmente densas y en muchos los casos se deben diluir para la medida satisfactoria. En cambio, laboratorios del control en el alimento (azúcar, cerveza, vino, jugos de la fruta cítrica, etc.) y (las fibras sintéticas, los polímeros, las lacas, etc.) las industrias químicas se refieren a turbiedades muy

ado Gomez Nunez

débiles. Investigaciones en la contaminación atmosférica, el tratamiento del agua y de las aguas residuales, o pesos moleculares de proteínas y otras macromoléculas, implican generalmente el estudio de soluciones o suspensiones de relativamente turbiedad baja.

Varios compuestos iónicos tales como bario sulfato, carbonato de calcio, y cloruro de plata se han utilizado durante muchos años para la turbiedad de estándares. Las arcillas se han utilizado extensamente como la caolinita, bentonita, illite, y fuller estos compuestos son generalmente insatisfactorios porque las suspensiones deben ser sacudidas con frecuencia, el tamaño de partícula cambia con tiempo, o la turbiedad es afectada por la luz.

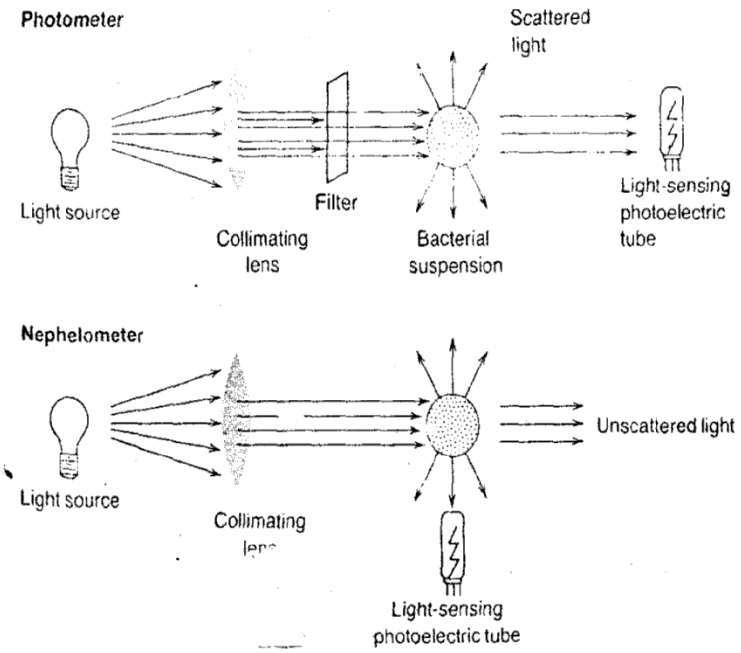


FIGURE 7.5
Comparison of arrangement of the optical components of a photometer and nephelometer. The greater sensitivity of the nephelometer depends on its measuring scattered light rather than residual unscattered light.

Anotaciones de Richards-Jahn del nefelómetro fotoeléctrico.

El nefelómetro fotoeléctrico descrito por richards-John en 1933 para estimar al densidad de población de M.O contenidos en suspensiones que presentaban muchos problemas de desviación y adaptación, sin embargo el principal problema que se presento fue la calibración del instrumento utilizando un M.O especifico en condiciones que pudieran determinarse seguido de los ciclos de crecimiento que no podían ser establecidos en el nefelómetro siendo

necesario mencionar las consideraciones acerca del tamaño y citología de las células durante estas fases.

El primer paso para determinar la calibración fue establecer una relación entre las suspensión y el numero de organismos que podían absorber la luz .

Richard y Janh establecieron que la luz absorbida (por las células en suspensión) es directamente proporcional al número de células aparentemente esto solamente fue una verdad parcial.

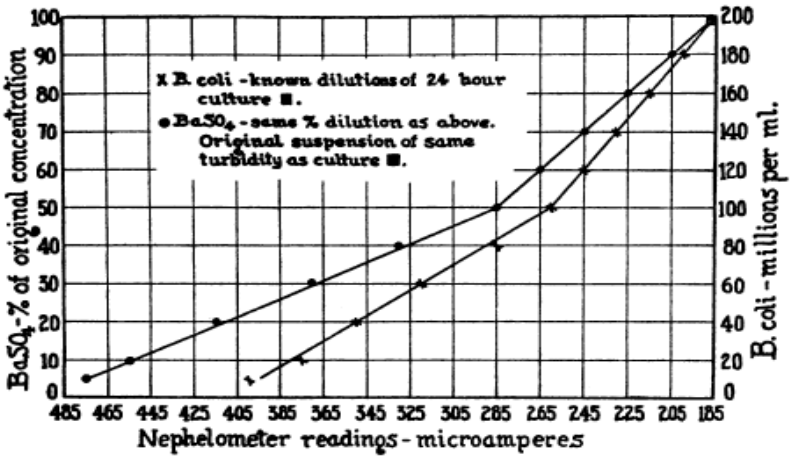


FIG. 1. RELATION BETWEEN LIGHT ABSORBED AND CONCENTRATION OF CELLS (OR PARTICLES) IN VARIOUS DILUTIONS OF STANDARD SUSPENSIONS OF B. COLI AND OF BARIUM SULFATE

En la calibración del primer modelo nefelometrico fue necesario establecer el rango de concentraciones utilizando suspensiones bacterianas y de sulfato de bario estableciendo puntos críticos de relaciones para establecer un numero de relación total lineal estrictamente en función del volumen o de las células en función de las partículas, cuando la luz absorbida cambia en un punto equivalente cerca de cien millones de bacterias de E. coli por ml y en el cual el ángulo entre estas líneas es el mismo para muchas bacterias y sulfato de vario.

Estas condiciones pueden ser ilustradas como se muestra para obtener la relación entre una suspensión de bacteria E.coli y sulfato de bario, la suspensión bacteriana después de 24 horas contenido en un caldo de cultivo contiene aproximadamente 200 millo de células por ml determinadas por conteo en placas. La relación entre la absorción y la refracción de la luz de las partículas como un fenómeno físico fueron descritas por Smith 1932-1932.

Aviles Delgadez Nuñez

En la microbiología, las normas de McFarland se utilizan como referencia para ajustar la turbidez de las suspensiones de bacterias de modo que el número de bacterias será dentro de un rango determinado.

Estabilidad de estándar de sulfato de bario

Un kit de estándares de McFarland de sulfato de bario (No. 2 y 3) preparados y posteriormente sellados los tubos de vidrio en caliente en Mayo de 1952 se compararon espectrofotométricamente en un espectronic20 a 530 nm con estándares recientemente e idénticamente preparados en 1972. Ambos fueron agitados a fondo en un mezclador del vórtice para determinar posteriormente los porcentajes de valores de la transmitancia y de absorbencia en la cual se determino que eran casi idénticos. Aunque los estándares últimos mostraron mayor turbiedad en comparación espectrofotométrica

Los datos sugieren la estabilidad prolongada de la solución dentro de tubos de cristal en los cuales se sueldan en caliente y se almacenan a temperatura ambiente en la obscuridad

TABLE 1. *Spectrophotometric comparison of barium sulfate standards prepared in 1952 and 1972*

Year prepared	Barium sulfate standard			
	McFarland no. 2		McFarland no. 3	
	Percent transmission	Absorbance	Percent transmission	Absorbance
1952	36.6	0.43	29.3	0.52
1972	38.1	0.42	26.0	0.58

Tabla 2

La frecuencia con qué un estándar fresco debe ser preparado no se ha establecido. Según reglas propuesta por la Agencia de Medicamentos y Alimentos de los E.E.U.U., el estándar del sulfato de bario recomendado para pruebas de difusión en disco deben ser recién preparado mientras que se deja tentativamente para estándares de susceptibilidad antimicrobiana de disco las que fueron recomendadas por el comité nacional para laboratorios clínicos de estándares que especifican que un estándar fresco de turbiedad puede ser preparados en intervalos de seis meses

TURBIDIMETRIA.

Cuando se hace incidir una fuente de radiación electromagnética, como por ejemplo la luz de una bombilla, la energía radiada a la suspensión es disipada en parte por absorción, y en parte por reflexión y refracción, mientras que la restante es transmitida.

Mediante la aplicación de la ley de Lambert – Beer es posible determinar el valor de la concentración de una solución en base a la relación entre la energía emitida por una fuente y la absorbida por un cuerpo. Es posible medir así con la ayuda de un espectrofotómetro la relación entre la energía emitida y la energía absorbida por la muestra mediante la medición de los valores de transmitancia y absorbancia.

La ley de Lambert – Beer establece que:

A = - log (T) = K.b.c

Donde:

A : Valor de la absorbancia.

T : Valor de la transmitancia.

k : Constante de absortividad.

b : Ancho de la cubeta donde se encuentra

C : concentración de la muestra.

De esta forma, como k y b son constantes para diferentes muestras de una misma sustancia a concentraciones diferentes, es posible establecer que la absorbancia en función de la concentración debe ser una línea recta que pasa por el origen. Utilizando este principio es posible con ayuda de un espectrofotómetro determinar el valor de la concentración de una muestra desconocida a partir de una curva de calibración de absorbancia en función de la concentración.

En el caso de una suspensión, realizar un análisis de la concentración con ayuda de un espectrofotómetro implica el control de ciertas variables que pueden alterar los valores de lectura.

Aviles Delgado Gomez Nuñez

Cuando bajo ciertos ángulos se hace incidir una radiación electromagnética, debido a las partículas en suspensión se producen reflexiones de radiación que afectan y hacen perder un porcentaje de radiación, y por lo tanto se altera la lectura de transmitancia y absorbancia.

La energía dispersada por la fase dispersa de una suspensión es la base del análisis nefelométrico. De igual forma la relación de la energía transmitida a través de la fase dispersa como función de la concentración de esta fase es función del análisis turbidimétrico.

Es posible de esta forma aplicando la ley de Lambert – Beer determinar la concentración de la fase dispersa de una suspensión. Un ejemplo de la aplicación de este análisis es la determinación de la concentración de suspensiones diluidas de sulfato de bario.

ESPECTROFOTOMETRIA

Los usos analíticos de la espectrofotometría en la zona del visible ultravioleta son muchos y muy variados.

Cuando un compuesto o ion capaz de absorber luz es colocado en una celda en un espectrofotómetro, cierta cantidad de luz monocromática será absorbida por dicho compuesto y el resto saldrá de la celda para ir a incidir sobre el fototubo que la detectará. Este comportamiento es aprovechado para conocer la concentración de los compuestos. La *transmitancia, T,* de una disolución se define como la fracción de la intensidad o de la fuerza de la luz incidente, *Po,* que se transmite verdaderamente a través de la disolución. En donde *P* es la intensidad de la luz que sale de la muestra.

T = — o T = 100

Po \Po)

La *absorbancia, A,* de una disolución es la luz que absorbe, no la que se transmite, y se define como:

A = - logT = log —

La ley de Beer (también conocida como la ley de Bouguer-Beer o de Lambert y Beer) establece que: a una longitud de onda dada, la absorbencia es proporcional a la concentración de la especie absorbente en una disolución, como lo indica la siguiente ecuación.

A = *zbc*

Aviles Delgado Gomez Nuñez

En donde ***b*** es el recorrido del haz de luz en la celda, ***c*** es la concentración (moles/1) y la constante de proporcionalidad es la absortividad molar, Su valor numérico depende de las unidades que se usen para expresar *b* y c. Si *b* está dada en cm y *c* en moles por litro, se le denomina coeficiente de extinción molar o absortividad molar y recibe el símbolo de e. Si la concentración se da en g/1, solamente se llama coeficiente de extinción o absortividad y su símbolo es "a" Desviaciones de la ley de Beer. Una gran cantidad de compuestos absorbentes siguen bastante bien la ley de Beer en soluciones diluidas, pero en algunas sustancias las absorbancias varían en forma no lineal respecto de la concentración. Este comportamiento se conoce como "desviación de la ley de Beer". Para trabajar estos sistemas se requiere una curva de calibración, trazada con valores de muestras de concentración conocida, de este modo se puede conocer el intervalo de concentraciones en el cual la relación es lineal.

Se debe tomar en cuenta que las desviaciones con respecto a esta ley pueden tener causas diversas: por muestras muy concentradas o muy diluidas, por variación del equilibrio químico de la sustancia que absorbe y por limitaciones del instrumento utilizado. Para tener el mínimo de problemas con las desviaciones, se recomienda trabajar en el intervalo de concentraciones de 10'2 M a 10'6 M. Si se utiliza una técnica poco reconocida, hay que cuidar el equilibrio químico poniendo especial atención en la fuerza iónica y en el pH del sistema, ya que hay muchos compuestos cromóforos o quelatos que presentan equilibrios parciales, en estos casos hay que agregar un exceso de ligando para desplazar el equilibrio hasta la formación del complejo con mayor número de coordinación. También existen problemas causados por los equipos, como las radiaciones reflejadas dentro del aparato que llegan al detector, los cambios de sensibilidad del detector y las fluctuaciones en la corriente eléctrica que provocan cambios en la intensidad de la radiación y por ende modificaciones en la lectura registrada.

Un dato *muy importante* es que las mediciones espectrofotométricas sólo son confiables con valores intermedios de absorbancia, aproximadamente entre 0.187 y 0.824; o en % de *T*, entre 15 y 65; si se requiere, se puede ampliar esta escala hasta 80% de 7, pero entonces se aumenta el error fotométrico (valores de absorbancia para un espectro de un solo haz, utilizando la gráfica de Ringbom. Servicios Centrales de Instrumentación, 1983.

Aviles Delgado Gomez Nuñez

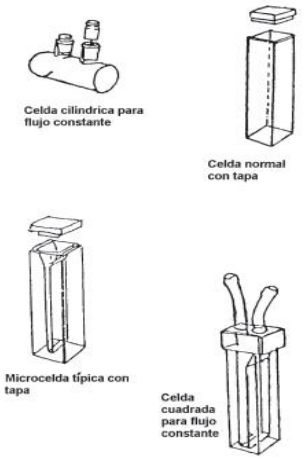
CELDAS

La celda es un depósito transparente especialmente diseñado para contener la disolución de prueba o el disolvente de referencia (blanco) durante los estudios espectrofotométricos. Existen celdas o cubetas de diversos tamaños y formas apropiadas para los diferentes tipos de espectros comerciales

Las celdas más comunes para medir espectros en la región del visible-ultravioleta están fabricadas con cuarzo y tienen un paso de luz de 1.0 cm. Las celdas de vidrio óptico son apropiadas sólo para mediciones en la región del visible, ya que absorben la radiación ultravioleta. Generalmente las celdas son cuadradas con dos lados esmerilados, pero las hay cilindricas en forma de tubo de ensayo para ser utilizadas en el Spectronic 20.

Existen celdas de flujo que permiten la circulación continua de una disolución a través de la cubeta son útiles para medir la absorbancia de disoluciones que fluyen de una columna cromatográfica , celdas térmicas con recirculación de agua o algún líquido que fluye en una camisa para mantener el contenido de la celda a la temperatura deseada.

Las características de transmisión de las celdas en varias longitudes de onda son en función de los materiales de fabricación. Por ejemplo, el vidrio pyrex transmite en el intervalo de los 320 a los 500 nm.



lgado Gomez Nuñez

SUSPENSIONES NORMALIZADAS O ESTANDARIZADAS

La estandarización de las suspensiones de microorganismos proporciona una metodología de trabajo que facilita la obtención de los resultados esperados. Normalmente, la farmacopea para ensayos de recuperación microbiana en presencia de productos (validación de la esterilidad o grado de contaminación) indica que se siembre un número determinado de microorganismo de cultivos recientes.

PREPARACIÓN DEL INOCULO.

Un inóculo corresponde a una cantidad suficiente y representativa de m. o problema. Si la muestra no es pura se aplicarán distintos métodos para el aislamiento, si el problema está en la cantidad de microorganismo será necesario preparar un inóculo con el fin de obtener una cantidad microbiana suficiente y representativa para obtener resultados fiables.

MÉTODOS DE INOCULACIÓN O SIEMBRA

El paso de una muestra microbiana a un medio de cultivo se denomina Siembra o Inoculación. El paso de una muestra de un medio a otro se denomina resiembra.

Siembra de inoculo en medio líquido:

- Con asa de siembra se adiciona al medio agitándola.
- Con pipeta se vierte agitándose hasta su homogeneización.
- Con hisopo o escobillón igual que con el asa de siembra.

Siembra de inóculo en medio sólido:

Siembra de Inóculo en Placa

Técnica de Barry: Para ello en el medio se cultiva previamente fundido en tubo se le añade el inóculo, se homogeniza, se vierte en la placa Petri y se deja solidificar. Se utiliza para la determinación de CMI.

Siembra de Muestra Líquida en Placa con Asa de Digralsky: Consiste en distribuir la muestra de manera uniforme por la superficie del medio de cultivo contenido en la placa. Para ello adicionamos al medio sólido un inóculo líquido con la pipeta graduada, y posteriormente se extiende con el asa de Digralsky. Se utiliza para el recuento de viables y antibiogramas.

Aviles Delgado Gomez Nuñez

Siembra por Agotamiento o Aislamiento en Estría: Se tomará con el asa de siembra una cantidad adecuada depositando el inóculo en uno de los extremos superiores de la placa, se realizarán movimientos en zig-zag sin levantar el asa hasta concluir la siembra en toda la placa. Ver anexo 1

Siembra por Agotamiento:

Aislamiento en estría múltiple. Se toma el inóculo y se deposita en el extremo superior, extendiéndose en la parte superior solamente. Flameamos y giramos ligeramente la placa continuando con el proceso anterior. Repetimos la operación 4 o 5 veces. El resultado son colonias cada vez más separadas como consecuencia de que cada vez se van arrastrando y separando más la muestra.

Técnica de los Cuatro Cuadrantes: Con un rotulador dividimos la placa en 4 cuadrantes iguales. Con el asa extendemos por cada cuadrante el inóculo haciendo zig-zag sin flamear. Finalmente observaremos como en el último cuadrante las colonias se encuentran aisladas o separadas.

Técnica de los 3 Giros: Se rotula la placa de forma análoga con el asa de platino y se siembra por estría la mitad superior de la placa. Sin flamear giramos 90º y volvemos a sembrar (así hasta 3 veces). Esta técnica no es muy utilizada. Ver anexo 2

Técnica de Siembra por Dilución:

Se dispondrá de una batería de tubos y se adicionará una cantidad de muestra conocida en el primer tuvo, homogeneizamos diluimos en los siguientes tubos hasta obtener la dilución deseada. Una vez realizada la dilución (ej. 10-3 y 10-4) inoculamos en placas de cultivo y extendemos con el asa de Digralsky. Incubamos a la temperatura precisa durante 24 horas y recontamos.

Siembra del Inóculo en Tubo:

Siembra por estría en tubos con medio sólido inclinado: Con el asa de siembra se añade al tubo una cantidad de muestra realizando movimientos ascendentes en zig-zag. Este método es utilizado para conservar cepas durante largos periodos, así como para la realización de ciertas pruebas bioquímicas.

Siembra por Picadura:

Aviles Delgado Gomez Nuñez

Con hilo de siembra introducir el asa en el medio de cultivo hasta el fondo en la zona central de este. Se utiliza en la siembra de cultivos semisólidos.

MEDIOS DE CULTIVO.

El medio de cultivo es la combinación sólida o liquida de nutrientes y agua, usualmente incluye sales inorgánicas, carbohidratos, vitaminas y aminoácidos. A menudo se denomina medio basal y puede ser suplementado con algún regulador de crecimiento y ocasionalmente con otras sustancias varias.

Los nutrientes son esenciales para el crecimiento y desarrollo de la planta. sin agua y nutrientes minerales una planta no puede vivir ni *in Vi*tro ni *in vivo*. También se debe añadir azucares al medio de cultivo, ya que las plantas (o sus fragmentos) no son completamente autotróficas cuando se desarrollan en estas condiciones.

MEDIOS SÓLIDOS

Medio sólido es todo aquel que contiene un agente gelificante. La dureza del medio depende principalmente de dos factores:

1. Agar: es una mezcla de polisacáridos extraídos de un alga marina. Tiene una elevada masa molecular, tiene la capacidad de hidratarse y formar una red. El agar interactúa con los componentes nutritivos del medio. El agar se funde a altas temperaturas (100 ^{0}C), Solidifica alrededor de los 40 ^{0}C y no se degrada con la luz .Generalmente se utiliza a una concentración de 0,6 – 1% .El principal problema con este gelificante es su elevado costo.

2. Gelrita: es un heteropolisacarido aniónico natural producido por una bacteria, que forma geles semejantes al agar .se puede usar a una concentración de 0,15 – 0,30 %. Los geles de gelrita son notablemente mas claros que los de agar, y también cuajan más rápidamente .El coste de la gelrita es menor que el del agar.

Aviles Delgado Gomez Nuñez

Medios Naturales o Complejos:

Constituidos por sustancias complejas de origen animal o vegetal, las que son usualmente complementadas por la adición de minerales y otras sustancias. En ellos no se conocen todos los componentes ni las cantidades exactas presentes de cada uno de ellos.

- **Medios Enriquecidos:**
  Algunos microorganismos no son capaces de desarrollarse en medios de cultivo normales. Para cultivarlos necesitamos añadir sustancias altamente nutritivas como sangre, suero, extractos de tejidos animales. Estos medios son los medios enriquecidos, y los microorganismos que crecen en ellos son microorganismos exigentes o fastidiosos. Ejemplo: agar-sangre.

- **Medios Selectivos:**
  Contienen uno o varios compuestos que inhiben el crecimiento de un determinado tipo de microorganismos y no afectan a otros tipos. Ej.: El cristal violeta inhibe las gram +. Otra manera es modificar la fuente de carbono; si sustituimos la glucosa por maltosa, seleccionamos aquellos microorganismos capaces de digerirla.

- **Medios Diferenciales:**
  Contienen distintos compuestos químicos o indicadores sobre los que determinados microorganismos adquiere coloraciones específicas o reaccionan de una manera determinada.

  Ejemplo: Agar levine tiene colorantes especiales (eosina y azul de metileno) que nos permiten diferenciar a las colonias que viven en el medio. Escherichia coli forma colonias de color verde claro, mientras que enterobacter forma colonias de color rosa salmón.

- **Medios Selectivos y Diferenciales:**
  Ejemplo: Agar Mac-conkey tiene cristal violeta y sales biliares. Es un medio específico para enterobacterias. Cristal violeta inhibe a las gram +. Las sales biliares hace que sólo se desarrollen las gram - que puedan tolerar estas sales; las enterobacterias. El indicador es el rojo neutro, que es rojo a pH ácido e incoloro a pH básico. Como fuente de carbono se utilizan peptona y lactosa.

Aviles Delgado Gomez Nunez

Se usa para detectar E. Coli y Salmonella. E. Coli es tolerante a la lactosa. Al digerirla, libera ácidos, por lo que se crea un medio ácido y el indicador se pone rojo. Salmonella no tolera la lactosa, por lo que no formará ácidos y formará colonias incoloras.

COMPOSICIÓN Y PH DEL MEDIO DE CULTIVO

Existen varios métodos para valorar la actividad antimicrobiana, pero en todos se mide la inhibición del crecimiento del microorganismo estudiado cuando se añade el antimicrobiano químico al medio de cultivo. En estos casos, la composición y el pH del medio pueden influir en los resultados. El medio puede contener sustancias que se opongan a la acción del compuesto en estudio; por ejemplo, la timidina o el ácido para-aminobenzoico en concentraciones elevadas interfieren con la actividad de las sulfamidas.

Muchos antimicrobianos químicos son ácidos o bases débiles y su solubilidad en los lípidos aumenta cuando se encuentran de forma ionizada. El pH influye sobre el grado de ionización y, por tanto, en su solubilidad en los lípidos y, en último termino, en su efecto antimicrobiano. Por el contrario, las bases débiles como los antibióticos aminoglucósidos, por ejemplo estreptomicina, neomicina o gentamicina, son más activos a los pH ligeramente alcalinos

MEDIOS DE CULTIVO

Almacenamiento de los Medios de Cultivos: Los medios de cultivo deshidratados se deben almacenar en envases sellados bajo las condiciones que señale el fabricante. Generalmente se almacenan en un lugar fresco (entre 15 y 25 °C), con poca humedad y protegidos de la luz solar directa. Nunca se deben almacenar cerca de autoclaves, hornos, ni otra fuente de calor o vapor.

Los medios de cultivo deshidratados se deben descartar cuando se hidraten o decoloren.

Una vez que el medio de cultivo ha sido preparado y esterilizado se debe almacenar entre 2 y 8°C, a menos que el medio requiera alguna condición diferente. Se deben mantener en recipientes bien cerrados para evitar su deshidratación. Cuando se usa tapón de algodón se debe colocar por encima una envoltura de papel (Craft).

Aviles Delgado Gomez Nuñez

Precauciones en el manejo de medios de cultivo:

- Evitar la apertura de los medios de cultivo, sólo cuando sea estrictamente necesario.
- Controlar la temperatura de las estufas de cultivo
- Verificar las condiciones adecuadas de oxígeno y/o dióxido de carbono
- Rotular adecuadamente los medios, el día y hora

Preparación de Medios de Cultivos: Los medios de cultivo son una mezcla de nutrientes que en concentraciones adecuadas y en condiciones físicas óptimas, permiten el crecimiento de los microorganismos. Estos medios son esenciales en el Laboratorio de Microbiología por lo que un control en su fabricación, preparación, conservación y uso, asegura la exactitud, confiabilidad y reproducibilidad de los resultados obtenidos

Método de Esterilización:

La esterilización es un proceso a través del que se puede lograr la destrucción total de los microorganismos viables presentes en un determinado material. El acondicionamiento del material (pipetas, tubos de ensayo, placas petri, pinzas etc. Que serán utilizados en los laboratorios de microbiología.

La preparación de los medios de cultivos que serán empleados con diferentes propósitos (cultivos de microorganismo, control de ambiente, equipo o personal. La autoclave es un instrumento que permite la esterilización por calor tanto de sólidos como de líquidos. La esterilización se realiza habitualmente a 121 °C, 1 atmósfera de sobre presión durante un tiempo superior a 15 min.

MICROORGANISMOS DE PRUEBA

Escherichia coli

Reino: Bacteria

Filo: Proteobacteria

Clase: Gamma Proteobacteria

Orden: Enterobacteriales

Familia: Enterobacteriaceae

Género: Escherichia

Especie: *E.coli*

Aviles Delgado Gomez Nuñez

Escherichia coli (***coli***) es quizás el organismo procarionte más estudiado por el ser humano, se trata de una bacteria que se encuentra generalmente en los intestinos animales y por ende en las aguas negras. Fue descrita por primera vez en 1885 por Theodore von Escherich, bacteriólogo alemán, quién la denominó *Bacterium coli*. Posteriormente la taxonomía le adjudicó el nombre de *Escherichia coli*, en honor a su descubridor. Ésta y otras bacterias son necesarias para el funcionamiento correcto del proceso digestivo. Además produce vitaminas B y K.

Las células de E.coli tienen forma de varilla, con aproximadamente 2µm de longitud y 0,8µm de diámetro. El volumen de un cilindro es de $\pi r^2 h$, donde h es la altura del cilindro. La densidad media de E.coli (principalmente formada por agua) es de $1{,}1 \times 10^3$ g/l. La pared celular protectora de E.coli tiene un grosor de 10nm. E.coli crece y se multiplicar rápidamente gracias a la presencia de unos 15.000 ribosomas esféricos (diámetro 18nm) en cada célula, que llevan a cabo la síntesis de proteínas.

E.coli, se trata de una bacteria Gram-negativo, catalasa-positiva, oxidasa-negativa, anaerobia facultativa, móvil por flagelos peritricos (que rodean su cuerpo), no forma esporas, es capaz de fermentar la glucosa y la lactosa y su prueba de IMVIC es ++--.

Shiguella disenteriae

Reino: Bacteria

Filo: Proteobacteria

Clase: Gamma Proteobacteria

Orden: Enterobacteriales

Familia: Enterobacteriaceae

Género: *Shigella*

Fueron descubiertas hace 100 años por el científico japonés Kiyoshi Shiga, de quien tomó su nombre, son bastones gram negativos, de 0.3 a 1 µm de diámetro y de 1 a 6 µm de longitud, que pueden estar solos, en cadenas o de a pares. Son no móviles, no esporulados, anaerobios facultativos, oxidasa negativo, fermentan la glucosa y otros azúcares sin producción de gas, Voges-Proskauer negativo y rojo de metilo positivo. No utilizan citrato de Simmons, no

Aviles Delgado G Ñuñez

producen SH2 y son lisina descarboxilasa, arginina dehidrolasa y ureasa negativos . La temperatura de crecimiento óptima es 37º C.

El género está formado por *Shigella dysenteriae* es una bacteria con forma de bacilo del género *Shigella*,[1] habitante normal del tracto gastrointestinal humano y que puede causar shigellosis (disentería bacteriana). *S. dysenteriae* se propaga contaminando el agua y los alimentos, causando las más severas disenterías debido a su potente y mortal toxina Shiga, aunque otras especies también pueden ser agentes de disentería. Shigella es un género de bacterias con forma de bastoncillo Gram negativas, no móviles, no formadoras de esporas e incapaces de fermentar la lactosa, que puede ocasionar diarrea en los seres humanos..

Staphylococcus aureus

Reino: Bacteria

Filo: Firmicutes

Clase: Bacilli

Orden: Bacillales

Familia: Staphylococcaceae

Género: *Staphylococcus*

Especie: *S. aureus*

Es un coco que crece agrupado en racimos (de ahí su raíz "Staphylo"), que responde positivamente a la tinción de Gram, es aerobio y anaerobio facultativo por lo que puede crecer tanto en una atmósfera con oxígeno y también sin el mismo, no presenta movilidad ni forma cápsula. Es catalasa positivo y coagulasa positivo.

El *S. aureus* es un coco inmóvil, de 0.8 a 1 micrómetro de diámetro, que se divide en tres planos para formar grupos de células irregulares semejantes a racimos de uvas. En extendidos de pus los cocos aparecen solos, en pares, en racimos o en cadenas cortas. Los racimos irregulares son característicos de extendidos tomados de cultivos que se desarrollan en medios sólidos, mientras que en otros cultivos son frecuentes las formas de diplococos y en cadenas cortas. Unas pocas cepas producen una capsula o capa de baba que incrementa la virulencia del microorganismo.

Aviles Delgado Gomez Nuñez

El S. aureus es un microorganismos grampositivo, pero las células viejas y los microorganismos fagocitados se tiñen como gram negativos.

NORMAS DE BIOSEGURIDAD EN CONTROL MICROBIOLÓGICO

Durante el trabajo diario de la sección de microbiología, se dan situaciones de potenciales riesgos que varían según el agente infeccioso y los procedimientos utilizados. Las Normas de Bioseguridad pretenden reducir a un nivel aceptable el riesgo inherente a la manipulación de material peligroso.

El trabajo en el laboratorio de microbiología es, como en la mayoría de las otras secciones del Laboratorio Clínico, un trabajo de grupo. La actitud ante las practicas seguras de cada uno de los integrantes del equipo, determinan su propia seguridad, así como la de sus compañeros y la de la colectividad del Laboratorio.

Sin embargo, las características especiales del trabajo en la sección de Microbiología, hacen imperante un Manual que sirva de guía a los microbiologos en su trabajo diario. La formación es pues clave en la eficacia de los programas de seguridad y ésta debe ser facilitada a todas las personas que están expuestas a los riesgos del laboratorio.

Un programa de seguridad gestionado por profesionales bien entrenados, con un alto grado de participación por parte de los trabajadores, puede llevar no sólo a una disminución del número de lesiones y enfermedades, sino también a un incremento de la satisfacción del trabajador y de su productividad.

NORMAS GENERALES DE BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA :

La peligrosidad de un agente está directamente relacionada con el tipo de microorganismo y la manipulación a la que es sometido. Por ello es básico:

1. Conocer los agentes, sustancias y productos peligrosos que existen en el laboratorio.
2. Conocer la metodología de trabajo del laboratorio.
3. Conocer el equipamiento del laboratorio.
4. Conocer las medidas a tomar en caso de Emergencia.
5. Conocer las leyes relacionadas con la Seguridad Biológica.
6. Respetar y hacer cumplir todo lo anterior.

Aviles Delgado Gomez Nuñez

7. Para que se produzca un accidente por agente biológico deben concurrir básicamente cuatro elementos:

a) Un huésped susceptible
b) Un agente infeccioso
c) Una concentración suficiente de éste
d) Una ruta de transmisión apropiada

8. De todos ellos, el que mejor se puede controlar en el laboratorio es la ruta de transmisión.
9. Las rutas de transmisión más comunes en el laboratorio son la aérea y la inoculación directa, muy por encima de todas las demás, aunque la oral, la percutanea y el contacto directo con la piel o las mucosas también son posibles.

TRATAMIENTO PREVIO DEL LUGAR DE TRABAJO Y DE LOS INSTRUMENTOS A UTILIZAR:

- El análisis microbiológico debe realizarse siguiendo estrictas normas de higiene por lo que antes de empezar dicho análisis se limpian cuidadosamente los mesones y la campana microbiológica con una toalla limpia empapada de cloro, y posteriormente con alcohol al 70%.
- Además la campana microbiológica se esteriliza con una lámpara de luz ultravioleta, la cual se deja encendida durante 2 horas.
- Asegurarse que todas las puertas y ventanas estén bien cerradas y no permitir el acceso a personas ajenas al laboratorio.
- El analista debe vestir su vestimenta adecuada (gabacha, gorro, boquilla, guantes, guantes, tenis) y estrictamente limpia.

ANÁLISIS DE CORRELACIÓN

Es frecuente que estudiemos sobre una misma población los valores de dos o más variables estadísticas distintas, con el fin de ver si existe alguna relación entre ellas, es decir, si los cambios en una o varias de ellas influyen en los valores de la variable dependiente. Si ocurre esto decimos que las variables están correlacionadas o bien que hay correlación entre ellas. Este tipo de análisis funcione relativamente bien cuando las variables estudiadas son continuas, sin embargo no es adecuado hacer análisis de correlación con variables nominales.

Aviles Delgado Gomez Nuñez

El análisis de correlación es el conjunto de técnicas estadísticas empleado para medir la intensidad de la asociación entre dos variables. El principal objetivo del análisis de correlación consiste en determinar que tan intensa es la relación entre dos variables, estas pueden ser.

- *Variable Dependiente*.- es la variable que se predice o calcula. Cuya representación es "Y"
- *Variable Independiente*.- es la o las variables que proporcionan las bases para el calculo. Cuya representación es: "X". Esta o estas variables suelen ocurrir antes en el tiempo que la variable dependiente.

Coeficiente Correlación Fórmula por Covarianzas y Desviaciones Típicas

$$r = \frac{S_{XY}}{S_X S_Y}$$

Siendo: "S_{XY}" la covarianza de (X,Y) y "S_X, S_Y" las desviaciones típicas de las distribuciones de las variables independiente y dependiente respectivamente.

Coeficiente Correlación Fórmula Clásica. Poco usada para cálculo.

$$r = \frac{\left[\sum (X - \bar{X})(Y - \bar{Y})\right]}{\sqrt{\left[\sum (X - \bar{X})^2 \sum (Y - \bar{Y})^2\right]}}$$

Coeficiente Correlación, Fórmula por suma de cuadrados. Se usa cuando se dispone de calculadoras de mano que hacen sumatorias y no correlación.

$$r = \frac{\left[\sum XY - \frac{\sum X \sum Y}{n}\right]}{\sqrt{\left[\left(\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n}\right)\left(\sum Y^2 - \frac{(\sum Y)^2}{n}\right)\right]}}$$

Aviles Delgado Gomez Nuñez

Dispersión de puntos. Es un diagrama de dispersión de punto X Y, el cual es una representación gráfica de la relación entre dos variables, muy utilizada en las fases de comprobación de teorías e identificación de causas raíz y en el diseño de soluciones y mantenimiento de los resultados obtenidos. Tres conceptos especialmente son destacables: que el descubrimiento de las verdaderas relaciones de causa-efecto es la clave de la resolución eficaz de un problema, que las relaciones de causa-efecto casi siempre muestran variaciones, y que es más fácil ver la relación en un diagrama de dispersión que en una simple tabla de números.

Según sea la dispersión de los datos (nube de puntos) en el plano cartesiano, pueden darse alguna de las siguientes relaciones, Lineal, Logarítmica, Exponencial, Cuadrática, entre otras. Estas nubes de puntos pueden generar polígonos a partir de ecuaciones de regresión que permitan predecir el comportamiento de la variable dependiente.

El coeficiente de correlación de Pearson

Es un índice estadístico que mide la relación lineal entre dos variables cuantitativas. A diferencia de la covarianza, la correlación de Pearson es independiente de la escala de medida de las variables.

El cálculo del coeficiente de correlación lineal se realiza dividiendo la covarianza por el producto de las desviaciones estándar de ambas variables:

$$r = \frac{\sigma_{XY}}{\sigma_X \cdot \sigma_Y}$$

Siendo:

σ_{XY} la covarianza de (X,Y)

σ_X y σ_Y las desviaciones típicas de las distribuciones marginales.

Avis Delgado Gomez Nuñez

El valor del índice de correlación varía en el intervalo [-1, +1]:

- Si r = 0, no existe relación lineal. Pero esto no necesariamente implica una independencia total entre las dos variables, es decir, que la variación de una de ellas puede influir en el valor que pueda tomar la otra. Pudiendo haber relaciones no lineales entre las dos variables. Estas pueden calcularse con la razón de correlación.
- Si r = 1, existe una correlación positiva perfecta. El índice indica una dependencia total entre las dos variables denominada *relación directa*: cuando una de ellas aumenta, la otra también lo hace en idéntica proporción.
- Si 0 < r < 1, existe una correlación positiva.
- Si r = -1, existe una correlación negativa perfecta. El índice indica una dependencia total entre las dos variables llamada *relación inversa*: cuando una de ellas aumenta, la otra disminuye en idéntica proporción.
- Si -1 < r < 0, existe una correlación negativa.

Coeficiente de correlación de Spearman

En estadística, el **coeficiente de correlación de Spearman**, ρ (rho), es una medida de la correlación (la asociación o interdependencia) entre dos variables aleatorias continuas. Para calcular ρ, los datos son ordenados y reemplazados por su respectivo orden.

El estadístico ρ viene dado por la expresión:

$$\rho = 1 - \frac{6\sum D^2}{N(N^2-1)}$$

donde *D* es la diferencia entre los correspondientes valores de *x* - *y*. *N* es el número de parejas.

Para muestras mayores de 20 observaciones, podemos utilizar la siguiente aproximación a la distribución t de Student

$$t = \frac{\rho}{\sqrt{(1-\rho^2)/(n-2)}}$$

Avilés Delgado Gomez Nuñez

La interpretación de coeficiente de Spearman es igual que la del coeficiente de correlación de Pearson. Oscila entre -1 y +1, indicándonos asociaciones negativas o positivas respectivamente, 0 cero, significa no correlación pero no independencia. La tau de Kendall es un coeficiente de correlación por rangos, inversiones entre dos ordenaciones de una distribución normal bivariante.

Determinando la significación estadística

La aproximación moderna al problema de averiguar si un valor observado de ρ es significativamente diferente de cero (siempre tendremos $1 \geq \rho \geq -1$)

Una aproximación alternativa para tamaños de muestra suficientemente grandes es una aproximación a la distribución t de Student. Para tamaños de muestra más grandes que unos 20 individuos, la variable

$$t = \frac{\rho}{\sqrt{(1-\rho^2)/(n-2)}}$$

Una generalización del coeficiente de Spearman es útil en la situación en la cual hay tres o más condiciones, varios individuos son observados en cada una de ellas, y predecimos que las observaciones tendrán un orden en particular.

Aviles Delgado Gomez Nuñez

MATERIAL Y METODO

Tipo de Estudio:

El presente estudio es de tipo experimental y comparativo

Área de Estudio:

Los ensayos realizados se llevaron a cabo en el área de microbiológica del departamento de análisis de drogas tóxicos y medicamentos de la facultad de ciencias químicas. El trabajo Monográfico se inicio en el mes de Mayo 2009 , finalizando en marzo de el 2010

Universo:

Especies de microorganismos referidos para ensayos microbiológicos (preparación de suspensiones) en las farmacopeas USP. Británica, Francesa, Española

Muestra:

- *.coli.*
- *Estafilcoco aureus*
- Shiguella disenteriae

Unidad de Análisis:

Suspensiones de microorganismos de estudio , soluciones de Macfarland

PROCEDIMIENTO:

Para la realización del presente ensayo se procedió en el orden siguiente

LIMPIEZA DE AMBIENTES

1. Se utiliza el método de esterilización por vapor, que consiste en inmersión permanganato de potasio en formaldehido dándose la reacción de desprendimiento de vapores.

2. Se utilizo fenol al 1 %, hipoclorito de sodio 2 % y mezcla hidroalcoholica al 70 % principalmente para la limpieza de las mezas, incluyendo también las paredes y el piso.

LAVADO CRISTALERIA

Aviles Delgado Gomez Nuñez

Una vez descontaminados en el autoclave la cristalería utilizada, luego depositamos en una tina que contiene agua con cloro y jabón líquido dejándolos por 24 horas, después se pastean y enjuagan con abundante agua para quitarles completamente el jabón y se dejan secar a temperatura ambiente.

ESTERILZACION DE MATERIALES Y CRISTALERIA

Se empaca las cajas o plato petri y pipetas , se colocan en el horno por 2 horas a 180ºC (vía seca).

En la esterilización de vestimenta para introducirse al área de siembra o de ensayo se envuelven en papel aluminio las gabachas, gorro, boquillas y guantes para llevarlos al autoclave a una temperatura de 121ºc por 15minutos.

ESTRILIZAR MEDIOS DE CULTIVO

Se distribuye en cada elenmeyer el medio en volúmenes de 200ml, colocándole una tapa de algodón envuelta en aluminio, luego se le coloca una retapa de aluminio para ser esterilizados en el autoclave a una temperatura de 121ºC por 15 minutos. Al finalizar la esterilización se lleva a baño maría a 45ºC para evitar su solidificación.

PREPACION DE MEDIOS CULTIVO PARA EL ENSAYO Y ELABORACION DE CUÑAS

1. Tomamos el medio selectivo para cada microorganismo de prueba
2. Verifica fecha de vencimiento, su pH optimo y numero de lote,
3. Verificamos la cantidad de gramos por litro a preparar, sacando los cálculos correctos, para
4. Pesarlo en gramos llevándolo al volumen deseado,
5. Ponemos agua destilada a ebullición adicionándolo con una probeta al volumen deseado agitamos vigorosamente hasta lograr la disolución completa del medio.
6. Se preparo agar Triptica caseína soja para el stock de cepas en forma de cuñas, esto para las bacterias,
7. Se deja reposando sobre una base inclinada a temperatura ambiente

Aviles Delgado Gomez Nuñez

8. Al solidificarse se toma una asada del microorganismos a prueba ATCC (centro de cultivo tipo americano) cultivándolo en las cuña, luego las que contienen bacteria se incuban a una temperatura de 35 a 37ºC durante 24hrs,

PREPARACION DE SOLUCION SALINA

1. Para la preparación de solución salina
2. Se pesan 8.5g de NaCl para 1000 ml de solución salina,
3. Se ajusta el pH a 7
4. Se distribuye en tubos de ensayos con 9ml de solución,
5. Se les coloca una tapas de algodón
6. Se meten al autoclave para su esterilización a una temperatura de 121ºC por 15 minutos,

ELABORACION DE SUSPENCIONES

Para la realización de las suspensiones se realiza primero

1. La calibración o ajuste del espectrofotómetro utilizando solución salina estéril a 0.9%, pH 7 Se colocá en una celda para que actué como blanco,
2. Se calibra o ajusta considerando la longitud de onda a ensayar (580nm y 640 nm)
3. Partiendo de la cuñas de microorganismos se toma varias asadas a un tubo de ensayo con 9ml de solución salina hasta lograr una turbidez deseada (en absorbancia o trasmitancia), luego se agita en el bortex
4. Se adiciona a otra celda para las mediciones en espectrofotómetro, tomando varias medidas hasta lograr que la suspensiones obtengan la absrobancia o trasmitancia deseada.

Aviles Delgado Gomez Nuñez

PROCEDIMIENTO MICROBIOLOGICO PREPARACIÓN DE LA TURBIDEZ ESTÁNDAR DE MC FARLAND

La turbidez estándar de la escala de McFarland preparada comercialmente, se preparara según tabla siguiente

TUBO	Cl_2Ba 1%	SO_4H_2 1%
1	0,1	9,9
2	0,2	9,8
3	0,3	9,7
4	0,4	9,6
5	0,5	9,5
6	0,6	9,4
7	0,7	9,3
8	0,8	9,2
9	0,9	9,1
10	1,0	9,0

Tabla 3.

PROCEDIMIENTO DEL RECUENTO DE COLONIAS DE LAS SUSPENSIÓN.

Una vez que teníamos preparado todos los materiales a utilizar y la vestimenta correcta nos dispusimos a entrar al cuarto de siembra, donde empezamos con la limpieza de las mesas y paredes para asegurar la limpieza total del ambiente, seguidamente encendimos el mechero y empezamos a trabajar en el ensayo donde realizamos los siguientes pasos:

1. Rotulación de los tubos de ensayos marcada con el número de la disolución que le correspondía y así mismo a las placas que tendrían una muestra de esa disolución.

2. Agitamos la suspensión madre en el bortex para después tomar con una pipeta estéril 1ml de esta y transferirlo a un tubo de ensayo que contiene solución salina correspondiente la dilución 10^{-2}, agitandolo para después tomar 1 ml de este y llevarlo a otro tubo de ensayo siendo este la dilución 10^{-3} repitiendo este mismo proceso hasta llegar a la dilución 10^{-11}.

3. Al terminar las diluciones tomamos 1ml de cada dilución desde 10^{-1} hasta 10^{-7} para transferirlo en placas petri por duplicado cada dilución

Aviles Delgado Gomez Nuñez

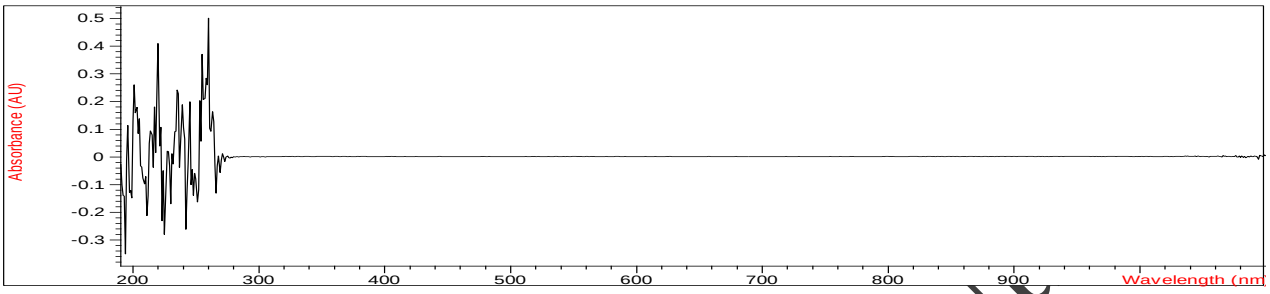
4. Luego se procedió a agregarle aproximadamente de 15 ml de agar TCS a las placas que contienen bacterias
5. También se agrego agar a placas estériles para realizar el control de ambiente y el control de los medios.
6. Se cubrieron las placas petri, rotando suavemente para su homogenización, y dejar que el contenido se solidifique a una temperatura ambiente.
7. Se Invirtieron las placas para incubarse durante 24 horas a una temperatura 35 a 37ºC
8. Una vez finalizada la incubación, se examinaron las palcas en el contador coulter para verificar el crecimiento de microorganismos, se considero el promedio para el numero de colonias contenidas en las placas.

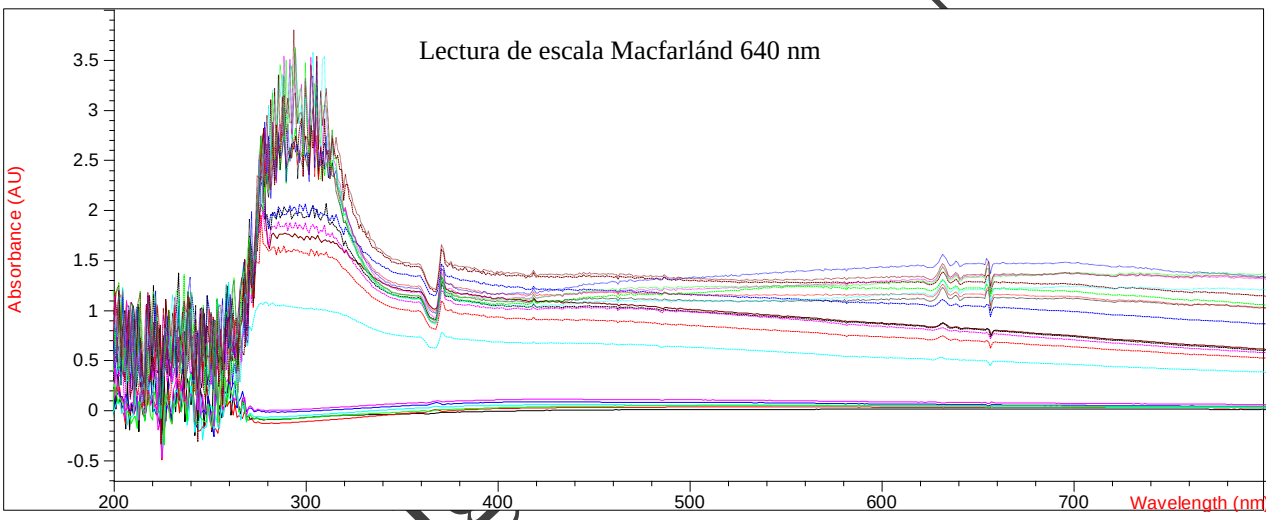
Aviles Delgado Gomez Nuñez

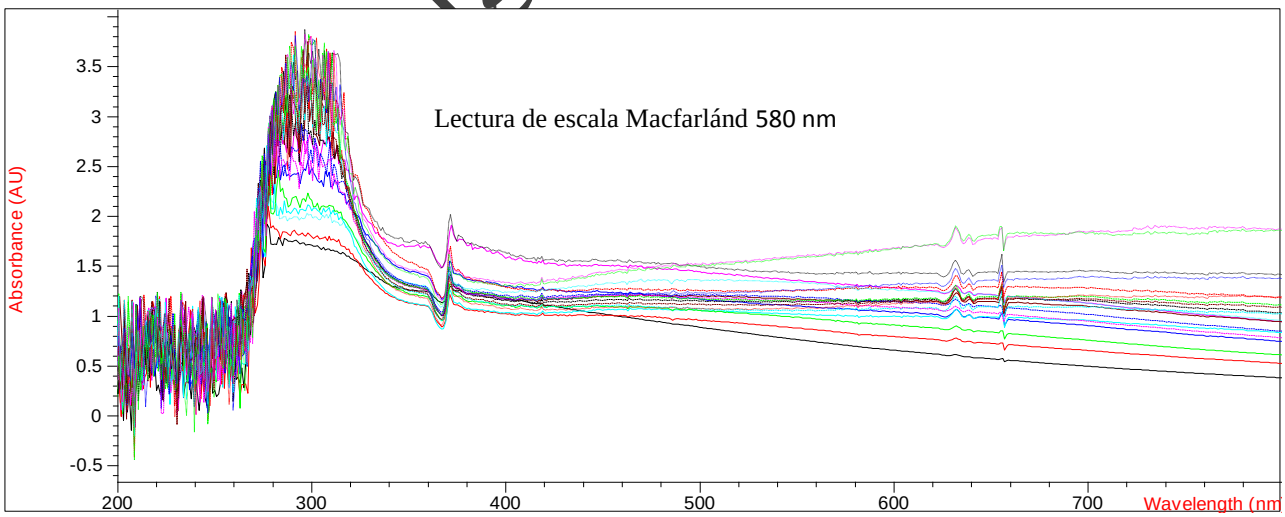
Resultados

Aviles Delgado Gomez Nuñez

RESULTADOS DEL ENSAYO (ESPECTOFOTOMETRO):







				Valores trasmitancia 580 nm Uv						
	tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6	Tubo 7	Tubo 8	Tubo 9	Tubo 10
	53.74	34.29	18.16	12.22	7.85	5.4	4.6	2.6	2.5	2.8
	51.11	34.99	19.2	13.11	9.8	7.4	5.8	3.4	4.6	2.7
	31.5	33.78	21.39	16.1	7.3	3.3	3.6	5	4	2.6
Σ	136.35	103.06	58.75	41.43	24.95	16.1	14	11	11.1	8.1
X	45.45	34.3533	19.5833	13.8100	8.3167	5.3667	4.6667	3.6667	3.7000	2.7000
VARP	98.454	0.246	1.812	2.754	1.151	2.802	0.809	0.996	0.780	0.007
				Valores de trasmitancia 640 nm. Uv						
	tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6	Tubo 7	Tubo 8	Tubo 9	Tubo 10
	58.13	39.65	22.5	14.26	9.78	6	4.4	2.5	2.4	2.4
	55.73	38.96	22.88	14.49	11.2	7.8	6	2.9	3.9	2.5
	48.58	36.75	24.93	16.89	10.99	7.6	9	5.7	3.9	2
	162.44	115.36	70.31	45.64	31.97	21.4	19.4	11.1	10.2	6.9
	54.1467	38.4533	23.4367	15.2133	10.6567	7.1333	6.4667	3.7	3.4	2.3
VARP	16.454	1.530	1.139	1.414	0.392	0.649	3.636	2.027	0.500	0.047
R	0.9908	0.6647	0.9847	0.9900	0.4351	-0.6531	-0.6013	0.9762	0.9608	0.7559
R_2	0.9817	0.4418	0.9697	0.9801	0.1893	0.0076	0.3615	0.9530	0.9231	0.5714
Prueba t	0.3442	0.0293	0.0363	0.3913	0.0705	0.2748	0.3179	0.9798	0.7276	0.1064

Tabla 4: Valores de trasmitancia obtenidos a 580 nm y 640 nm, utilizando equipo 1 (espectrofotómetro Uv)

Aviles Delga

Análisis 1

El análisis de la tabla muestra los valores de R Pearson entre diferentes longitudes de onda (580, 640 nm) en % de trasmitancia, para soluciones en igual concentraciones (soluciones de Macfarländ) y utilizando el mismo equipo para lo cual los resultados de correlación son:

- Entre los tubos 6 y 7 de 580 y 640 nm , muestran una r; $-1 < r < 0$, para lo cual existe una correlación negativa media y no existe correlación lineal entre ellos
- Entre los tubos 1, 3, 4,8 y 9 de 580 y 640 nm muestran una tendencia r = 1, para lo cual existe una correlación positiva perfecta. El índice indica una dependencia total entre las dos variables denominada *relación directa*: cuando una de ellas aumenta, la otra también lo hace en idéntica proporción,

- Entre los tubos 2 de 580 y 640 nm muestran una tendencia $0 < r < 1$, para lo cual existe una correlación positiva media y existe correlación lineal entre ellos
- Entre los tubos 10 de 580 y 640 nm muestran una tendencia $0 < r < 1$, para lo cual existe una correlación positiva considerable y existe correlación lineal entre ellos

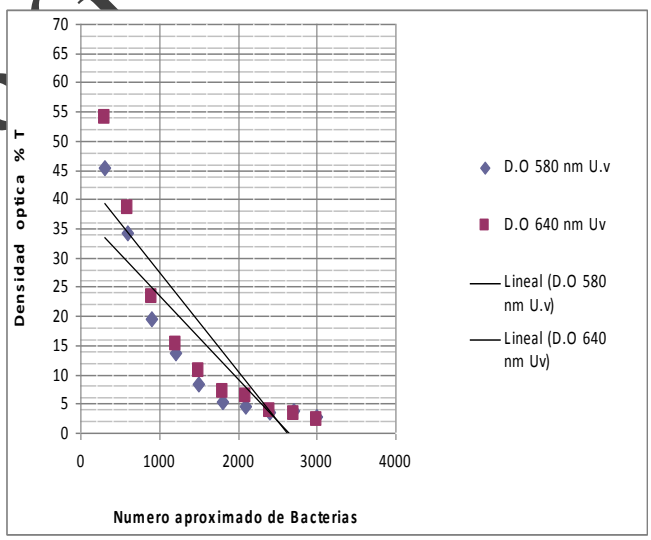
En cuanto al coeficiente de determinación R_2 que nos permite conocer la variación entre las variables la tabla nos indica que:

- No existe varianza significativa entre las muestras 1, 3, 4,8 y 9 de 580 y 640 nm ya que demuestran su correlación
- Existe variación entre la muestras 2, 5, 6 , 7 y 10 lo anterior considerando que muestran correlación débil.

De la tabla 4 se deriva la tabla 5que establece la relación para las densidades ópticas ensayadas y el numero aproximado de bacterias que corresponde a dicha densidad óptica

Muestras	No. Aproximado de bacterias	D.O 580 nm U.v	D.O 640 nm Uv
1	300	45.45	54.14
2	600	34.35	38.45
3	900	19.58	23.43
4	1200	13.81	15.21
5	1500	8.31	10.65
6	1800	5.36	7.13
7	2100	4.66	6.46
8	2400	3.66	3.7
9	2700	3.7	3.4
10	3000	2.7	2.3

Tabla 5. Número aproximado de bacteria Macfarland 580 nm UV 640 nm Uv



Graf 4 Grado de Dispersión y sesgo entre densidades ópticas 580 , 640 nm

En el analisis de la tabla 5 muestra que existe una variación óptica moderada para los % de T para los tubo 1 a 7. Mientras que para los tubos 8 al 10 no hay variación significativa, en el grafico se observa que la nube de puntos dispersos tanto para 580 como para 640nm obtenidos a partir de las densidades ópticas en función de el numero teórico de bacterias tienden a aproximarse a la ecuación y= ax+b, esto se sustenta considerando que la tabla 4 muestra que el rango de correlación es de -0.6 a 1

Av. Gomez Nunez

	Valores de absorbancia 580 nm Uv									
	tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6	Tubo 7	Tubo 8	Tubo 9	Tubo 10
	0.26965	0.46485	0.74092	0.9129	1.1049	1.2643	1.3303	1.5689	1.5965	1.5512
	0.29151	0.45607	0.71666	0.88215	1.0076	1.1278	1.2317	1.4658	1.3372	1.5536
	0.33853	0.5043	0.67276	0.81966	1.0245	1.2248	1.0385	1.2141	1.4101	1.6148
Σ	0.89969	1.42522	2.13034	2.61471	3.137	3.6169	3.6005	4.2488	4.3438	4.7196
X	0.2998967	0.4751	0.7101	0.8716	1.0457	1.2056	1.2002	1.4163	1.4479	1.5732
VARP	0.0008	0.0004	0.0008	0.0015	0.0018	0.0033	0.0147	0.0222	0.0119	0.0009
	Valores de absorbancia 640 Uv									
	tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6	Tubo 7	Tubo 8	Tubo 9	Tubo 10
	0.2356	0.49181	0.64774	0.84575	1.0095	1.2179	1.3517	1.6031	1.6251	1.6287
	0.25388	0.40941	0.64061	0.83882	0.95069	1.1097	1.2181	1.5233	1.4101	1.6068
	0.31353	0.43471	0.60332	0.77224	0.95863	1.1174	1.0441	1.2373	1.4018	1.6781
Σ	0.4634	0.43041	0.6284	0.74429	1.0819	1.4457	1.375	1.3262	1.4527	1.639
X	0.3166025	0.441585	0.6300175	0.800275	1.00018	1.222675	1.247225	1.422475	1.472425	1.63815
VARP	0.0011	0.0012	0.0004	0.0011	0.0007	0.0024	0.0159	0.0247	0.0107	0.0009
R	0.9960	-0.0475	0.9783	0.9704	0.9993	0.7659	0.9940	0.9970	0.9527	0.9435
R_2	0.9920	0.0023	0.9571	0.9416	0.9985	0.5866	0.9881	0.9940	0.9076	0.8902
Prueba t	0.3596	0.3671	0.0362	0.2200	0.1221	0.3455	0.9729	0.8148	0.7847	0.0945

Tabla 6: Valores de absorbancia obtenidos a 580 nm y 640 nm, utilizando equipo 1 (Espectrofotómetro Uv)

Aviles Delga

Análisis

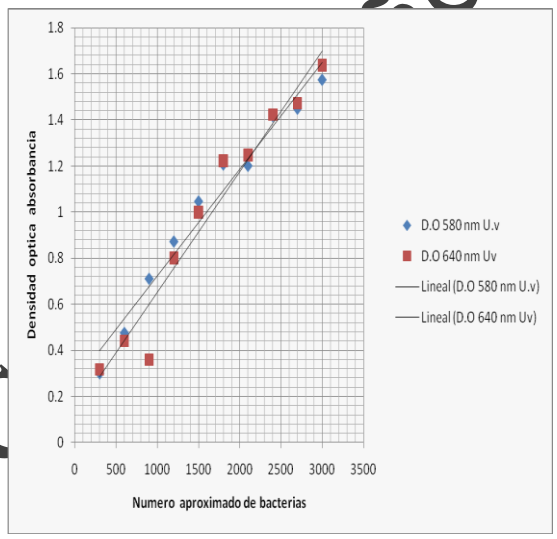
El análisis de la tabla muestra los valores de R de Pearson entre valores de diferentes longitudes de onda (580, 640 nm) en absorbancia, para soluciones en igual concentraciones (soluciones de Macfarländ) y utilizando el mismo equipo para lo cual los resultados de correlación son:

- Entre los tubos 2 de 580 y 640 nm, muestran una r; $-1 < r < 0$, para lo cual existe una correlación negativa débil y no existe correlación lineal entre ellos
- Entre los tubos 1, 3, 4, 5, 7, 8,9 y 10 de 580 y 640 nm muestran una tendencia r = 1, para lo cual existe una correlación positiva perfecta. El índice indica una dependencia total entre las dos variables denominada *relación directa*: cuando una de ellas aumenta, la otra también lo hace en idéntica proporción,

- Entre los tubos 6 de 580 y 640 nm muestran una tendencia $0 < r < 1$, para lo cual existe una correlación positiva considerable y existe correlación lineal entre ellos

Muestras	No. Aproximado de bacterias	D.O 580 nm U.v	D.O 640 nm Uv
1	300	0.2999	0.3166
2	600	0.4751	0.44159
3	900	0.7101	0.36002
4	1200	0.8716	0.80028
5	1500	1.0457	1.00018
6	1800	1.2056	1.22268
7	2100	1.2002	1.24723
8	2400	1.4163	1.42248
9	2700	1.4479	1.47243
10	3000	1.5732	1.63815

Tabla 7: Número aproximado de bacterias Macfarlnd 580 nm Uv 640 nm Uv



Graf 5 Grado de Dispersión entre densidades ópticas 580 , 640 nm

En el análisis de la tabla 7 muestra que existe una variación óptica mínima para los valores de absorbancia, en el grafico se observa que la nube de puntos dispersos tanto para 580 como para 640nm obtenidos a partir de las densidades ópticas en función de el numero teórico de bacterias tienden a aproximarse a la ecuación y= ax+b, esto se sustenta considerando que la tabla 7 muestra que el rango de correlación para las muestras todas en su mayoría tienden a 1 y cumple con la referencia para grafico de dispersión

Aviles Delgado C ez

Valores absorbancia 580 nm E20

	tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6	Tubo 7	Tubo 8	Tubo 9	Tubo 10
	0.2	0.41	0.58	0.7	0.85	1	1.1	1.1	1.3	1.44
	0.21	0.36	0.5	0.61	0.63	0.9	1	1.2	1.3	1.4
	0.18	0.28	0.4	0.59	0.85	1	1.3	1.3	1.49	1.49
X	0.1967	0.3500	0.4933	0.6333	0.7767	0.9667	1.1333	1.2000	1.3633	1.4433
VARP	0.0002	0.0029	0.0054	0.0023	0.0108	0.0022	0.0156	0.0067	0.0080	0.0014
	Valores de absorbancia 580 nm .Uv									
	0.26965	0.46485	0.74092	0.9129	1.1049	1.2643	1.3303	1.5689	1.5965	1.5512
	0.29151	0.45607	0.71666	0.88215	1.0076	1.1278	1.2317	1.4658	1.3372	1.5536
	0.33853	0.5043	0.67276	0.81966	1.0245	1.2248	1.0385	1.2141	1.4101	1.6148
X	0.2999	0.4751	0.7101	0.8716	1.0457	1.2056	1.2002	1.4163	1.4479	1.5732
VARP	0.0008	0.0004	0.0008	0.0015	0.0018	0.0033	0.0147	0.0222	0.0119	0.0009
R	-0.7966	-0.8457	0.9949	0.8545	0.6341	0.9597	-0.7826	-0.9720	-0.2450	0.8810
R2	0.6345	0.7152	0.9899	0.7302	0.4021	0.9209	0.6124	0.9448	0.0600	0.7762
Prueba t	0.0230	0.0655	0.0395	0.0061	0.0513	0.0113	0.6157	0.1667	0.4463	0.0192

Tabla8 : valores de absorbancia obtenidos a 580 nm Espectrofotómetro Uv, y Espectronic 20

Análisis

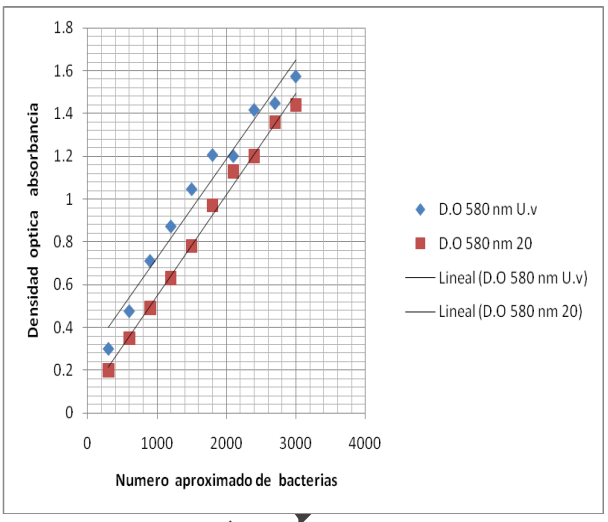
El análisis de la tabla muestra los valores de R entre valores iguales de longitudes de onda (580 nm) en absorbancia, para soluciones en igual concentraciones (soluciones de Macfarländ) y utilizando diferentes equipos para lo cual los resultados de correlación son:

- Entre los tubos 1 , 2 ,7,8,9 de 580 nm, muestran una r; -1 < r < 0, para lo cual existe una correlación negativa y no existe correlación lineal entre ellos
- Entre los tubos 3, 4, 6 y 10 de 580 nm muestran una tendencia r = 1, para lo cual existe una correlación positiva perfecta. El índice indica una dependencia total entre las dos variables denominada *relación directa*: cuando una de ellas aumenta, la otra también lo hace en idéntica proporción,
- Entre los tubos 5 de 580 nm muestran una tendencia 0 < r < 1, para lo cual existe una correlación positiva y existe correlación lineal entre ellos

Aviles Delgado Gome

Muestras	No. Aproximado de bacterias	D.O 580 nm U.v	D.O 580 nm E 20
1	300	0.299	0.2
2	600	0.4751	0.35
3	900	0.7101	0.49
4	1200	0.8716	0.63
5	1500	1.0457	0.78
6	1800	1.2056	0.97
7	2100	1.2002	1.13
8	2400	1.4163	1.2
9	2700	1.4479	1.36
10	3000	1.5732	1.44

Tabla 9: Número aproximado de bacterias Macfarlnd 580 nm Uv 580 nm E20



Graf 6 Grado de Dispersión entre densidades ópticas 580 , 580 nm

En el análisis de la tabla 9 muestra que existe una variación óptica mínima entre los valores de absorbancia, en el grafico se observa que la nube de puntos dispersos tanto para 580 en Uv como para 580 nm E20 obtenidos a partir de las densidades ópticas en función de el numero teórico de bacterias tienden cumplen con la ecuación y= ax+b, esto se sustenta considerando que la tabla 8 muestra que el rango de correlación para las muestras todas en su mayoría tienden a 1 y cumple con la referencia para grafico de dispersión

Aviles Delgado Gomez

	Valores absorbancia 640 nm.E20									
	tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6	Tubo 7	Tubo 8	Tubo 9	Tubo 10
	0.23	0.41	0.45	0.85	0.98	1.2	1.3	1.3	1.5	1.5
	0.28	0.33	0.41	0.8	0.9	1.2	1.4	1.6	1.5	1.4
	0.25	0.39	0.5	0.75	0.75	1.1	1.3	1.6	1.4	1.5
Σ	0.51	0.74	0.86	1.65	1.88	2.4	2.7	2.9	3	2.9
X	0.25	0.38	0.45	0.8	0.88	1.17	1.33	1.5	1.47	1.47
VARP	0.0004	0.0012	0.0014	0.0017	0.0091	0.0022	0.0022	0.0200	0.0022	0.0022
	Valores de absorbancia 640 nm Uv									
	0.24	0.49	0.65	0.85	1.01	1.22	1.35	1.60	1.63	1.63
	0.25	0.41	0.64	0.84	0.95	1.11	1.22	1.52	1.41	1.61
	0.31	0.43	0.60	0.77	0.96	1.12	1.04	1.24	1.40	1.68
Σ	0.80	1.34	1.89	2.46	2.92	3.45	3.61	4.36	4.44	4.91
X	0.268	0.445	0.631	0.819	0.973	1.148	1.205	1.455	1.479	1.638
VARP	0.0011	0.0012	0.0004	0.0011	0.0007	0.0024	0.0159	0.0247	0.0107	0.0009
R	0.1110	0.8775	0.9055	0.9055	0.6806	0.9014	0.0756	-0.6688	0.5281	0.7366
R_2	0.0123	0.7699	0.6723	0.8200	0.4632	0.1969	0.0057	0.4473	0.2789	0.5426
PRUEBA t	0.6366	0.1154	0.0089	0.6384	0.2872	0.7232	0.2834	0.7764	0.8884	0.0176

Tabla 10: valores absorbancia obtenidos a 640 nm E.20 y 640 nm Uv.

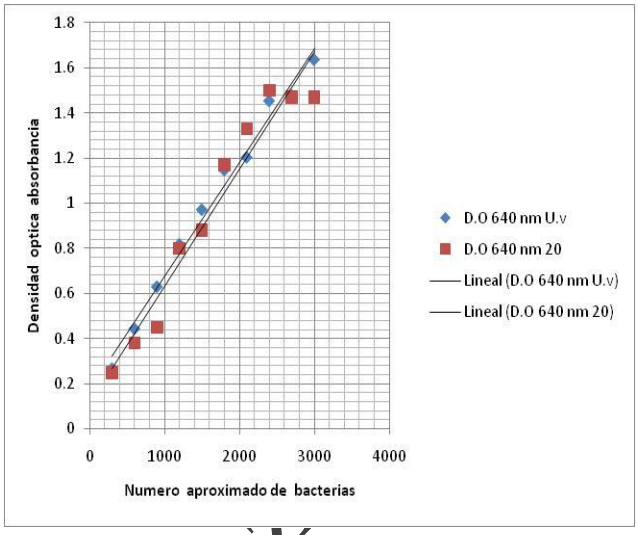
El análisis de la tabla muestra los valores de R Pearson entre longitudes de onda (640 nm E.20, 640 uv nm) en % de absorbancia , para soluciones en igual concentraciones (soluciones de Macfarlánd) y utilizando diferentes equipos para lo cual los resultados de correlación son:

- Entre los tubos 1 de 640 nm E.20 y 640 nm en Uv, muestra una correlación positiva débil ya que sus valores se encuentran entre 0.10.
- Entra los tubos 5, 9, 10 de 640 nm E.20 y 640 nm en Uv muestra una correlación positiva media por encontrarse sus valores entra 0.5
- Entre los tubos 2, 3, 4,6 de 640 nm E.20 y 640 nm en Uv muestra una correlación positiva muy fuerte ya que sus valores se encuentran entre están dentro rango de 0.9.
- Entre los tubos 7 de 640 nm E.20 y 640 nm en Uv muestra una correlación negativa media

Aviles Delgado

Muestras	No. Aproximado de bacterias	D.O 640 nm U.v	D.O 640 nm E 20
1	300	0.268	0.25
2	600	0.445	0.38
3	900	0.631	0.45
4	1200	0.819	0.8
5	1500	0.973	0.88
6	1800	1.148	1.17
7	2100	1.205	1.33
8	2400	1.455	1.5
9	2700	1.479	1.47
10	3000	1.638	1.47

Tabla 11: Número aproximado de bacterias Macfarlnd 640 nm Uv 640 nm E20



Graf 7 Grado de Dispersión entre densidades ópticas 640 Uv 640 E20 nm

En el análisis de la tabla 11 muestra que existe una variación óptica mínima entre los valores de absorbancia, en el grafico se observa que la nube de puntos dispersos tanto para 540 en Uv como para 640 nm E20 obtenidos a partir de las densidades ópticas en función de el numero teórico de bacterias tienden aproximarse con la ecuación y= ax+b, esto se sustenta considerando que la tabla 10 muestra que el rango de correlación para las muestras todas en su mayoría tienden correlación débil que tienden a 1 y cumple con la referencia para grafico de dispersión

Aviles Delgado Gomez

RESULTADOS PARA BACTERIAS.

	Absorbancia							
		tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6	Tubo 7
	580 nm	0.02	0.01	0.01	0	0.01	0	0
		0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0	0
Shigella disenteriae		0.02	0.01	0.01	0.005	0.01	0	0
	Σ	0.06	0.03	0.03	0.015	0.03	0	0
	X	0.02	0.01	0.01	0.005	0.01	0	0
	VARP	0	0	0	1.7E-05	0	0	0
	640 nm	0.03	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01
		0.03	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01
		0.03	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01
	Σ	0.09	0.06	0.06	0.03	0.03	0.03	0.03
	X	0.03	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01
	VARP	0	0	0	0	0	0	0
	R	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!
	R2	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!
	PRUEBA t	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	0.22540333	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!

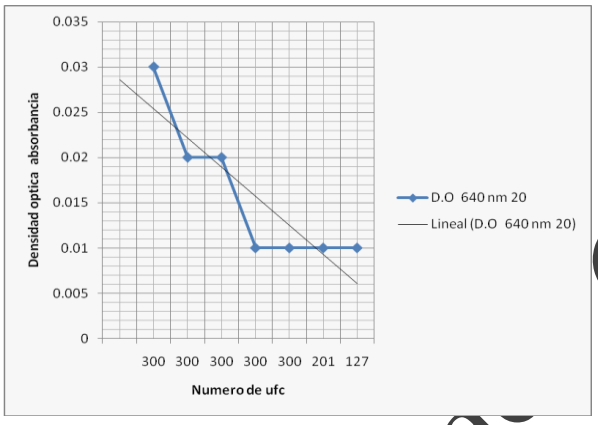
Tabla 12: valores de absorbancia de *Shiguella disenteriae* a 580 nm y 640 nm E 20

La siguiente tabla muestra que no existe una correlación lineal entre los tubos que contienen *Shiguella* a 580 nm y 640 nm de absorbancia para un mismo equipo. Ya que los valores de R y R_2 tienden a cero por tanto no existe correlación lineal alguna entre las variables.La VARP (Variación entre las poblaciones) es igual a cero a excepción del tubo 4 que se aleja un poco del promedio de los otros tubos debido a los resultados de correlación. Para la PRUEBA t (prueba *t*-estudent) el resultado es nulo ya que los punto entre las matrices 1 y 2 tiene un numero de punto de datos diferentes a excepción del tubo 4 ya que existe un valor absoluto más elevado que el resto de los tubos.

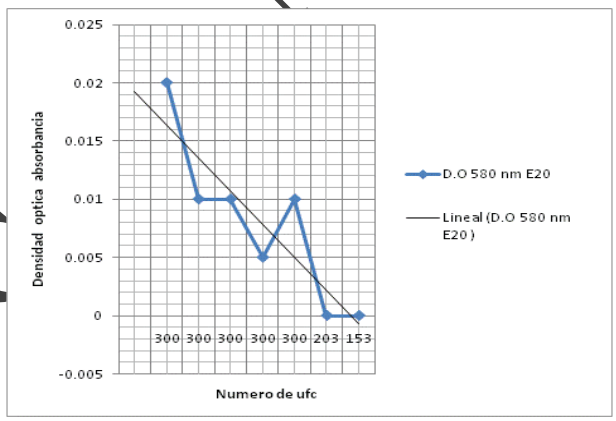
Aviles Delga

No. Aproximado de bacterias	D.O 580 nm E20	No. Aproximado de bacterias	D.O 640 nm E20
300	0.02	300	0.03
300	0.01	300	0.02
300	0.01	300	0.02
300	0.005	300	0.01
300	0.01	300	0.01
203	0	201	0.01
153	0	127	0.01

Tabla 13 Valores de ufc y absorbancias para 580 nm E20 , 640 nm E20



Graf 8 Grado de Dispersión entre densidades ópticas 640 nm



Graf 9 Grado de Dispersión entre densidades ópticas 580 nm

La siguiente tabla muestra el crecimiento uniforme de las colonias de bacteria *Shiguella* a 580 nm E.20 y 640 nm E.20, para los tubos 1-5 considerando el crecimiento logarítmico de el microorganismo que permite establecer el recuento, mientras que para los tubos 6 y 7 no hay una variación, el paso óptico de la luz va a ser mayor para estos ultimo como se puede observar en el grafico la variación no es muy significativas pero influye en el recuento para la ultimas diluciones

Avilés Delgado Cristian Nuñez

	Absorbancia							
		tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6	Tubo 7
	580 nm	0.02	0.01	0	0	0	0	0
		0.04	0.01	0	0.02	0.01	0	0
E.aerus		0.03	0.01	0	0.01	0.005	0	0
	Σ	0.09	0.03	0	0.03	0.015	0	0
	X	0.03	0.01	0	0.01	0.005	0	0
	VARP	6.67E-05	0.00E+00	0.00E+00	6.67E-05	1.67E-05	0	0
	640 nm	0.03	0.01	0.05	0.01	0.01	0.01	0.01
		0.03	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01
		0.03	0.01	0.03	0.01	0.01	0.015	0.01
	Σ	0.09	0.03	0.09	0.03	0.03	0.045	0.03
	X	0.03	0.01	0.03	0.01	0.01	0.015	0.01
	VARP	0	0	0.000266667	0	0	1.66667E-05	0
	R	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!
	R2	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!
	PRUEBA t	1	#¡DIV/0!	0.121689934	1	0.22540333	0.035098719	#¡DIV/0!

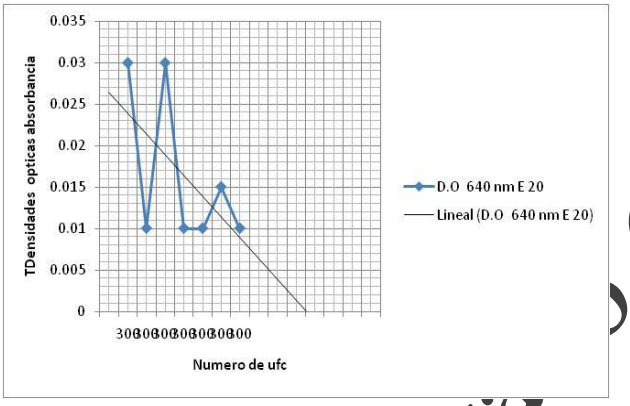
Tabla 14: valores de absorbancia de *E.aerus* a 580 nm y 640 nm E 20

La siguiente tabla muestra que no existe una correlación lineal entre los tubos que contienen *E.aerus* a 580 nm y 640 nm de absorbancia para un mismo equipo. Ya que los valores de R y R_2 tienden a cero por tanto no existe correlación lineal alguna entre las variables. La VARP (Variación entre las poblaciones) es igual a cero para los tubos 1, 2, 3, 4, 5, 7, a excepción del tubo 6 que se aleja un poco del promedio de los otros tubos. Para la PRUEBA t (prueba t-estudent) el resultado es nulo para los tubos 2 y 7 ya que los punto entre las matrices 1 y 2 tiene un numero de punto de datos diferentes. Para los tubos 1, 3, 4, 5, 6 los resultados son mayores a 0 por tener un valor absoluto más elevado.

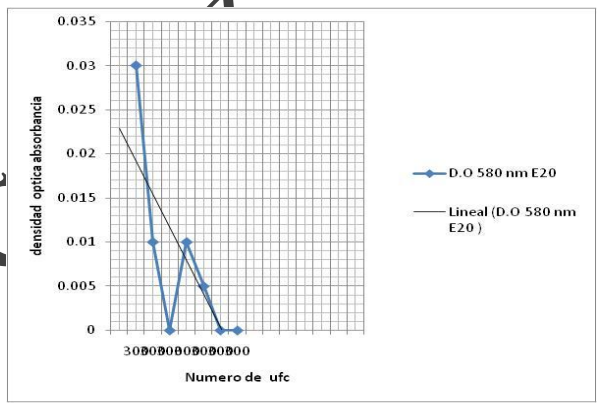
Aviles Delgado

No. Aproximado de bacterias	D.O 580 nm E20	No. Aproximado de bacterias	D.O 640 nm E 20
300	0.03	300	0.03
300	0.01	300	0.01
300	0	300	0.03
300	0.01	300	0.01
300	0.005	300	0.01
300	0	300	0.015
300	0	300	0.01

Tabla 14: numero de colonias ufc-ml *E.aerus* a absorbancia 580nm y 640 nm



Graf 10 Grado de Dispersión entre densidades ópticas 640 nm



Graf 11 Grado de Dispersión entre densidades ópticas 580 nm

La siguiente tabla muestra una variación de las densidades ópticas considerado el mismo valor de crecimiento en ufc de *E. aerus* en cada tubo de 580 nm y 640 nm en E20 , se evidencia que el paso óptico para aureus es independiente de la fase logarítmica de crecimiento que establece el recuento . Así mismo lo anterior es sustentado por la falta de correlación para *E.aureus* entre densidades ópticas

Avilés Delgado Nuñez

Absorbancia 580 m								
	580nm	tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6	Tubo 7
E.coli		0.04	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02
		0.04	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01
		0.04	0.015	0.015	0.01	0.01	0.01	0.015
	Σ	0.12	0.045	0.045	0.03	0.03	0.03	0.045
	X	0.04	0.015	0.015	0.01	0.01	0.01	0.015
	VARP	0	1.667E-05	1.667E-05	0	0	0	1.67E-05
	640nm	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0	0
		0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0	0
		0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0	0
	Σ	0.06	0.03	0.03	0.03	0.03	0	0
	X	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0	0
	R	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!
	R2	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!
	VARP	0	0	0	0	0	0	0
	PRUEBA t	#¡DIV/0!	0.2254033	0.22540333	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!	0.035099

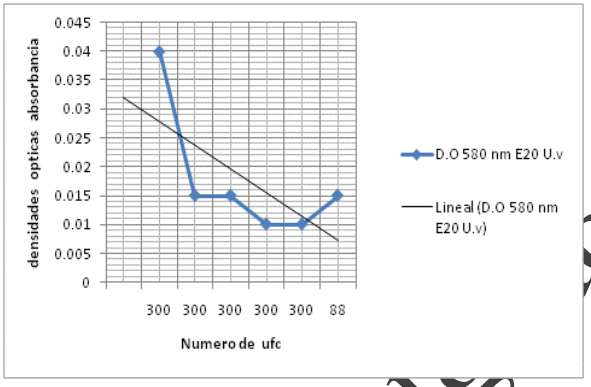
Tabla 15: valores de absorbancia de *E.coli* a 580 nm y 640 nm E 20

La siguiente tabla muestra que no existe una correlación lineal entre los tubos que contienen *E.coli* a 580 nm y 640 nm de observancia para un mismo equipo. Ya que los valores de R y R_2 tienden a cero por tanto no existe correlación lineal alguna entre las variables. La VARP (Variación entre las poblaciones) es cero para todos los tubos para la PRUEBA t (prueba t-estudent) el resultado es nulo para todos los tubos ya que la desviación estándar es cero.

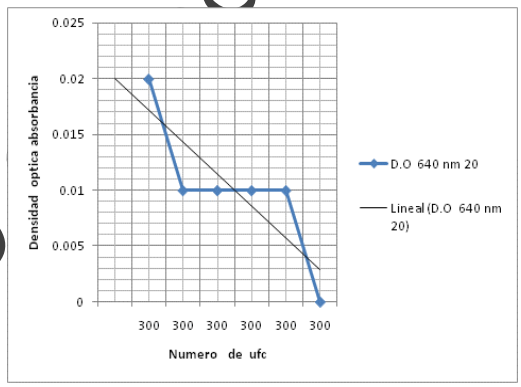
Aviles De

No. Aproximado de bacterias	D.O 580 nm E20	No. Aproximado de bacterias	D.O 640 nm 20
300	0.04	300	0.02
300	0.015	300	0.01
300	0.015	300	0.01
300	0.01	300	0.01
300	0.01	300	0.01
88	0.015	300	0

Tabla 16: numero de colonias ufc-ml *E.coli* a absorbancia 580nm



Graf 11 Grado de Dispersión entre densidades ópticas 580 nm



Graf 12 Grado de Dispersión entre densidades ópticas 640 nm

La siguiente tabla muestra una variación de las densidades ópticas considerado el mismo valor de crecimiento en ufc de *E. coli* entre muestras de 580 nm y 640 nm en E20 , se evidencia que el paso óptico para *E.coli* muestra una mejor dispersión para 580 nm que para 640 nm . Así mismo lo anterior es sustentado por la falta de correlación para *E.coli* entre densidades ópticas. En los resultados de la tabla y la grafica muestra un crecimiento uniforme mayor entre diluciones de *E.coli* a 580 nm , que diluciones de *E.coli* 640 nm

Aviles Delgado Nuñez

CONCLUSIONES

Se concluye en el presente trabajo de investigación, lo siguiente que existe mayor correlación de las soluciones de Macfarla*nd* ensayadas para los valores de absorbancia que trasmitancia considerando la precisión que presentan la absorbancias sin considerar el equipo utilizado

Entre valores de absorbancia para las soluciones de macfarland entre equipos este último tiene mayor correlación para longitud de 640 nm que 580 nm lo anterior en base a que entre mayor sea la apertura y menor el tamaño de la partícula el porcentaje de error establecido a través de de los recuentos de ufc disminuye lo inverso ocurre a 580 nm considerando que el paso óptico es menor el grado de dispersión de la luz influye en un mayor porcentaje de erros en los recuentos bacterianos

Se evidencio el grado de exactitud de las soluciones ensayadas y suspensiones de microorganismos respectivamente por cuanto el espectrofotómetro precisa en mayor media el grado establecido para la apertura del paso óptico a diferencia de el espectronic 20 que es de tipo mecánico , así mismo el espectrofotómetro calcula con mayor precisión la luz dispersada por las partículas contenidas en el material de ensayo (suspensiones de microorganismos y soluciones de macfarland) en la actualidad se utiliza el nefelómetro ya que este posee mayor sensibilidad que el espectrofotómetro, puesto que determina el grado de impulso eléctrico de la luz absorbida por las partículas contenidas en una solución a diferencia de el espectrofotómetro que solo lo hace en función de la luz dispersada sin embargo, no se contaba con uno para la realización de la práctica.

Aviles Delgado Gomez Nuñez

RECOMENDACIONES

- Durante los conteos o recuentos debe considerarse que no todas las células crecen a la misma velocidad, puede ocurrir una variación hasta el 20% en el tiempo de generación entre individuos, grupos o conjuntos.
- Se necesita curvas de calibración en turbidimetria
- Debe considerarse que el operador lea rápido necesitan un tiempo aproximado de 5-10 min minutos.
- Debe considerarse las cubetas y tubos de cultivo difractan la luz llevando a errores hasta del 30 %
- Preparar la suspensión de microorganismos rápidamente para evitar precipitación de las células y obtener mejores resultados en las lecturas de absorbancia.
- Realizar una manipulación adecuada de los equipos para el mino margen de error en los resultados.
- Agitar constantemente las suspensiones para homogenizar antes de hacer las lecturas

.

Aviles Delgado Gomez Nuñez

BIBLIOGRAFIA

- Frobisher M, Hindill R. Microbiología. 5ta edición, editorial Salvat S.A. pag 208, 209, 475, 476, 514.
- Jawetz Ernst. Microbiología Médica.
- Farmacopea francesa-codex Edición lengua española. Pag 903, 904, 905
- Farmacopea de los Estados Unidos, Mexicanos. Sexta edición 1994. Pag 567 569, 765, 766, 190.
- Farmacopea Europea. Segunda edición. Parte volumen 3. Pag 274-1, 274-3.
- Farmacopea Herbal Británica. 1983. pag 108.
- Diccionario químico y productos químicos. Gessner G. Hawley. Ediciones omega S.A. Pag 318.
- Metodología de la Investigación. Hernandez Sampieri. Pag.385
- Metodología de la Investigación. Hernandez Sampieri. Pag.386
- Metodología de la Investigación. Hernandez Sampieri. Pag.391
- Ciclo celular 2001 pag 3 disponible en: http://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/12crecimiento.htm#_Toc58934318
- Cuantificación de microorganismos por Turbidimetria 2004 pág. 2 disponible en: http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/181ssa18.html
- Métodos de microbiología I. Aislamiento y cultivo de microorganismos pag 1. Disponible en: http://www2.cbm.uam.es/jlsanz/Docencia/archivos/02.pdf
- Determinación de suspensión de bacterias 1907 J. Espaun, Md, pag 6, disponible en: http://whqlibdoc.who.int/bulletin/1962/Vol26/Vol26-No2/bulletin_1962_26(2)_219-225.pdf

Aviles Delgado Gomez Nuñez

ANEXOS

ANEXO1.

PREPARACION ESCAL MACFARLAND

- PREPARACION SOLUCION CLORURO DE BARIO 1%

↓

PESAR 5 g CLORURO DE BARIO

↓

DISOLVER EN UM PEQUEÑA CANTIDAD DE AGUA.

↓

AFORAR

- PREPARACION SOLUCION ACIDO SULFURICO 1%

↓

MEDIR 5 ML ACIDO SULFURICO.

↓

HOMOGENIZAR COM AGUA DESTILADA

↓

AFORAR

↓

MEZCLAR EM 10 TUBOS DE ENSAYOS LAS SIGUIENTES CANTIDADES.

↓

Aviles Delgado Gomez Nuñez

TUBO	Cl_2Ba 1%	SO_4H_2 1%
1	0,1	9,9
2	0,2	9,8
3	0,3	9,7
4	0,4	9,6
5	0,5	9,5
6	0,6	9,4
7	0,7	9,3
8	0,8	9,2
9	0,9	9,1
10	1,0	9,0

Aviles Delgado Gomez Nuñez

ANEXO Nº2

PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN SALINA DE CLORURO DE SODIO 0.9%.

PESAR 0.9 GR DE CLORURO DE SODIO.

↓

DISOLVER EN 100 ML. DE AGUA DESTILADA ESTÉRIL.

↓

AUTOCLAVAR POR 15 MINUTOS A 121°C.

Aviles Delgado Gomez Nuñez

ANEXO N°3

PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS.

PESAR 4 G. DE AGAR TRIPTICA SOJA

↓

DISOLVER EN 1OO ML. DE AGUA DESTILADA

↓

CALENTAR HASTA LOGRAR SOLUCIÓN CLARA.

↓

AUTOCLAVAR POR 15 MINUTOS A 121°C.

Aviles Delgado Gomez Nuñez

ANEXO N°4

ESQUEMA DE ENSAYO DE ACTIVIAD ANTIBACTERIANA

A.CULTIVO DE MICROORGANISMOS.

CEPAS.ATCC

↓

CEPAS CON PATOGENICIDAD DISMINUIDA.
9 PASES

↓

PASES A TUBOS DE ENSAYOS
CONTENIENDO AGAR TRIPTICA SOJA.

↓

MARCAR E INCUBAR A 37°C.
POR 24 HORAS.

Aviles Delgado Gomez Nuñez

PREPARACIÓN DE LA SUSPENCIONES DE MICROORGANISMOS.

ANEXO Nº5

PREPARAR UNA SOLUCION MADRE PARA CADA UNO DE M.O DE PRUEBA A 70% TRAMITANCIA

↓

DISOLVER EN SERIE S DE TUBOS DE 1 A 7 CONTENIENDO SOLUCIÓN SALINA AL 0.9 %

↓

AGITAR HASTA HOMOGENIZAR LA SUSPENSIÓN.

↓

MEDIR LA ABSORBANCIA Y TRAMITANCIA EN ESPECTROFOTÓMETRO Y ESPECTRONIC 20 A 580 NM Y 640 NM

Aviles Delgado Gomez Nuñez

ANEXO N°6

PREPARACIÓN DE LOS PLATOS PETRI PARA EL ENSAYO

DEJAR ENFRIAR EN BAÑO MARÍA A 55°C EL AGAR TRIPTICA SOJA PREVIAMENTE ESTERILIZADO EN AUTOCLAVE.

↓

VERTIR 15 ML. DE AGAR+1 ML DE MUESTRA.

↓

AGITAR PARA HOMOGENIZAR LA MEZCLA.

↓

DEJAR ENFRIAR A TEMPERATURA AMBIENTE.

↓

INVERTIR LAS PLACA S E INCUBAR POR 24 H A 37ºC

Aviles Delgado Gomez Nuñez