



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Química

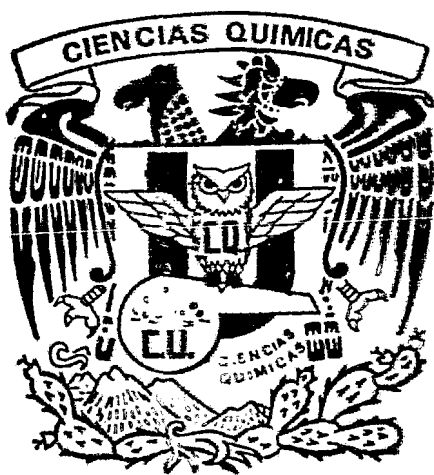
FORMACION DE UNA SUBCOLECCION DE CEPAS
MICROBIANAS PARA CUANTIFICACION POR
METODOS MICROBIOLOGICOS

T E S I S

Que para obtener el título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a :

PATRICIA FOSADO MONZALVO



México, D. F.

1983



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

C O N T E N I D O

1. OBJETIVO
2. INTRODUCCION
3. GENERALIDADES
 - 3.1 Importancia de Métodos Analíticos Microbiológicos
 - 3.2 Tipos de Métodos Analíticos Microbiológicos
 - 3.3 Factores primordiales para la confiabilidad y reproducibilidad
 - 3.4 Microorganismos utilizados
 - 3.5 Características de los microorganismos que integran esta subcolección.
 - 3.6 Conservación de las Cepas.
4. METODOLOGIA
 - 4.1 Reactivos y Medios de Cultivo
 - 4.2 Material y Equipo
 - 4.3 Técnicas
5. RESULTADOS
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES
7. BIBLIOGRAFIA

1. OBJETIVO

El objetivo de esta tesis es formar la Subcolección de Bacterias para el Cepario de la Facultad de Química, que sean utilizados en la Cuantificación por Métodos Microbiológicos, de diversas sustancias.

La Facultad de Química requiere de esta Subcolección por su importancia en el Control de Calidad de productos farmacéuticos, ya que en la actualidad se utilizan rutinariamente métodos microbiológicos para la Cuantificación de fármacos tales como aminoácidos, vitaminas y antibióticos, debido a que en muchos casos son más sensibles que los métodos químicos, además de tener otras ventajas que mencionaremos más adelante.

2. INTRODUCCION.

El uso de métodos microbiológicos permite conocer exactamente la concentración biológicamente activa por ello tienen tanta importancia en el control de calidad de sustancias como las mencionadas, y además en muchos casos los ensayos microbiológicos son el único método utilizable para estimar la potencia. Entre sus ventajas, estos métodos se distinguen por ser altamente especializados y por requerir poco equipo; esto es importante para un país como México, que debe reducir la importación de equipo y refacciones costosas.

Algunos laboratorios de la Industria Farmacéutica donaron las cepas que utilizan en las determinaciones microbiológicas de las sustancias mencionadas. Gracias a ello, la subcolección que se ha integrado es útil para las técnicas que actualmente se están empleando en México; además se han probado los métodos analíticos en los que se utiliza cada una, de modo que la subcolección formada, además de constituir un acervo con un valor didáctico importante, será de gran utilidad para apoyar la Industria, a los programas de Investigación y a otros centros de Docencia.

Este trabajo consistió en obtener las cepas, verificar sus características morfológicas y bioquímicas, es decir su identidad, y comprobar los Métodos cuantitativos para los cuales se utiliza cada una de ellas.

Una vez verificada la identidad de los microorganismos y montados los métodos analíticos cuantitativos, las cepas fueron liofilizadas y se comprobaron nuevamente todas las características mencionadas, después de la liofilización.

3. GENERALIDADES.

3.1 IMPORTANCIA DE METODOS ANALITICOS MICROBIOLOGICOS.

Durante los pasados 15 años se incrementaron notablemente los conocimientos y la conciencia sobre la importancia que tiene el Control de Calidad de las preparaciones farmacéuticas.

Desde entonces la Organización Mundial de la Salud, ha estimulado, alentado y asesorado a sus miembros en el establecimiento de sistemas nacionales de Control de Calidad; como resultado de esto muchas naciones han establecido laboratorios oficiales de control ó han mejorado los que tenían, de modo que dicho control se efectúa no sólo internamente en las industrias farmacéuticas, sino también en laboratorios gubernamentales cuyas funciones son precisamente de inspección, en base a normas y reglamentos dictados por las autoridades competentes; en México esta autoridad es la Secretaría de Salubridad y Asistencia.

Dentro del Control de Calidad hay pruebas analíticas para la evaluación de la eficiencia y seguridad de productos farmacéuticas que comprenden pruebas físicas, químicas, biológicas, microbiológicas y farmacológicas.

Estas pruebas varían de producto a producto y de formulación a formulación. Sin embargo entre las determinaciones que siempre se realizan están las pruebas de potencia. Para realizarlas existen métodos químicos, biológicos y microbiológicos.

Las primeras pruebas de potencia de vitaminas, aminoácidos y antibióticos se hicieron con métodos biológicos, que se basan en los efectos producidas por estas substancias en animales de experimentación. Con el tiempo se desarrollaron métodos químicos, fisicoquímicos y microbiológicos que gradualmente fueron reemplazados a los biológicos, pues el empleo de éstos últimos se ha venido limitando, ya que requieren de más tiempo, son caros y sus limites de error son más amplios. La experimentación con animales ha quedado restringido, por ello, a los casos en que no pueden

aplicarse los otros métodos, ya sea por que la concentración de vitaminas, de aminoácidos o de antibióticos es muy baja; por la presencia de factores que interfieren; ó bien cuando se quiere determinar la facilidad de absorción ó liberación de las vitaminas, aminoácidos y antibióticos presentes en una preparación farmacéutica. Las técnicas químicas y físicoquímicas reemplazaron a los métodos biológicos en la investigación de rutina, especialmente en la industria farmacéutica, por su menor costo, porque consumen menos tiempo y porque sus límites de error son más pequeños; sin embargo presentan poca especificidad, por lo que es aconsejable hacer determinaciones por más de un método y comprobar los resultados con métodos microbiológicos. Aunque muchas veces se utilizan los métodos físicos y químicos, los ensayos microbiológicos siguen siendo, en la Industria Farmacéutica el único método ó el más usado para evaluar la potencia de algunos productos farmacéuticos, debido a que son muy sensibles y son los recomendados por la Farmacopea; por su confiabilidad.

La creciente importancia, de las determinaciones microbiológicas se refleja en el número de estándares biológicos internacionales: En 1948 sólo había uno, en tanto que la Farmacopea de 1980, describe más de 90 estándares utilizables en ensayos microbiológicos. Los métodos microbiológicos tienen la ventaja que pueden realizarse sin equipo altamente especializado que es costoso; aunque se han desarrollado procesos mecánicos y automatizados para algunos pasos de las determinaciones microbiológicas, e incluso existen sistemas completamente automatizados, la inversión que requieren solo se justifican para manejar enormes cantidades de muestras. Se espera seguir usando los métodos manuales por muchos años pues de cualquier manera permiten trabajar con facilidad, mayor número de muestras que los métodos físicos, químicos y biológicos. Puesto que el mismo procedimiento básico se aplica a la valoración de varias sustancias, los métodos microbiológicos manuales resultan más adecuados para el análisis de rutina de gran número de muestras, cuando las realiza un Químico Farmacéutico Biólogo con experiencia.

Los métodos microbiológicos se pueden aprovechar óptimamente cuando se les considera como ramas del análisis farmacéutico cuantitativo y cuando se aplican no solo técnicamente, sino científicamente. Los métodos cuantitativos para los que se usan las cepas de esta subcolección fueron montados como parte de este trabajo, para verificar los detalles de su ejecución y la sensibilidad de las cepas.

3.2 TIPOS DE MÉTODOS ANALITICOS MICROBIOLOGICOS.

Los métodos microbiológicos son muy sensibles y altamente específicos; están basados en el hecho de que ciertos organismos requieren de vitaminas y aminoácidos específicos para su crecimiento ó son sensibles a determinados antibióticos.

Existen métodos cuantitativos microbiológicos de difusión y turbidimétricos.

3.2.1 METODOS TUBIDIMETRICOS.

En éstos métodos se utiliza un medio de cultivo líquido inoculado con el microorganismo de prueba en donde después de la incubación se mide la turbidez producida por el crecimiento microbano, la cuál estará en función de la concentración del antibiótico, vitamina o aminoácido en estudio.

3.2.2 METODOS DIFUSION.

En estos métodos se utilizan placas de agar inoculadas con el microorganismo; la sustancia en estudio se aplica en un punto y, al difundirse en el agar, ocasiona la aparición de zonas de inhibición del desarrollo cuando se trate de antibióticos, o de crecimiento del microorganismo cuando se trate de aminoácido ó vitamina.

3.2.3 DIFERENCIAS DE LOS METODOS.

El ensayo turbidimétrico requiere menos tiempo que el método de difusión, ya que los resultados se obtienen después de 3 a 4 horas de incubación es decir el mismo día que se efectúa el análisis, en tanto que en el método de difusión se requiere de, por lo menos, 18 horas de incubación.

El método turbidimétrico es más económico y requiere de menos equipo que el de difusión. Los costos calculados para el método turbidimétrico, corresponden aproximadamente a la mitad de los del método de difusión. Sin embargo el método turbidimétrico esta sujeto a interferencias cuando se analizan formulaciones con más de un principio activo o que produzcan turbidez en la dilución final, como ocurre con los ungüentos; consecuentemente el método de difusión es preferible para el análisis de tales preparaciones.

3.3 FACTORES PRIMORDIALES PARA LA CONFIABILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD.

Es de suma importancia, en la realización de la técnica, considerar todos los factores que pueden afectar al desarrollo a la inhibición del organismo; la adecuada atención de tales factores permite reducir al mínimo sus efectos y asegurar que la dosificación de la sustancia en estudio sea la única limitante del desarrollo.

A continuación se describen brevemente estos factores y su importancia.

1. Dosificación de la sustancia de prueba. Dado que la base de la cuantificación es la respuesta de crecimiento del microorganismo frente a determinada dosis de la sustancia de prueba y que el cálculo de esta última, se logra interpolando esa respuesta del microorganismo en una curva estándar, la precisión en la elaboración de dicha curva es un factor de máxima importancia. Además la dosis del problema durante el ensayo debe estar dentro del

límite de las cantidades utilizadas para la curva estándar, ya que no es posible hacer extrapolaciones pues quedarían fuera del intervalo de sensibilidad del método.

2. Periodo de incubación. En una técnica ideal el tiempo de incubación debe ser suficientemente largo para permitir la total utilización de la sustancia de prueba asegurando así una respuesta directamente proporcional a la dosis.

En algunos métodos, por ejemplo cuando la respuesta depende de la producción de ácido, se requieren periodos de incubación de tres días, mientras que en técnicas en que se mide absorbancia o transmitancia, la incubación generalmente es de 18 horas.

Si no se logra la completa utilización de la sustancia de prueba, las diferencias de respuestas en las dosis altas son proporcionalmente menores lo cual hace que la gráfica tienda a ser una curva. Debe verificarse el tiempo mínimo de incubación para cada tipo de ensayo e incluso para cada lote de prueba.

3. Inóculo. La estandarización de la cantidad de inóculo es muy importante ya que si fuese mayor no podrían diferenciarse los diversos grados de crecimiento microbiano en las concentraciones menores de la sustancia de prueba; si el inóculo fuese menor, no se obtendría la utilización total de la sustancia en el tiempo de incubación establecido.

Por otro lado la edad de cultivo y su estado fisiológico afectan la duración de la fase de adaptación (fase lag) en el ensayo.

El microorganismo debe ser joven y estar en fase logarítmica ya que durante la fase de adaptación no habría una respuesta proporcional a la cantidad presente de sustancia de prueba y esto falsearía el resultado al final del tiempo de incubación.

4. Temperatura de incubación. Las diferencias pequeñas por arriba o por abajo de la temperatura óptima de crecimiento tienen grandes efectos en la velocidad de crecimiento. Nuevamente en aquellas pruebas en que el periodo de incubación es suficientemente largo para asegurar la utilización completa de la sustancia en estudio, este efecto es mínimo. Cualquier variación en temperatura entre los tubos, puede llevar a errores importantes, por lo que no se

recomienda el uso de estufas para incubar; deben usarse baños de agua de temperatura constante; y se recomienda también enfriar los medios de cultivo antes de inocularlos, de tal manera que los errores ocasionados por las diferencias en tiempo de preincubación se reduzcan al mínimo

5. Naturaleza del medio sintético. Es esencial que todos los factores de crecimiento requeridos por el microorganismo de prueba, excepto el que se está estudiando, se encuentran en exceso ya que de otra manera podrían convertirse en factores limitantes del crecimiento del microorganismo. El pH debe ser óptimo para el crecimiento. Es importante señalar que la esterilización puede afectar los componentes de algunos medios de cultivo, por lo que los fabricantes recomiendan, en esos casos, tratamientos térmicos moderados y la utilización inmediata del medio.

6. Naturaleza del organismo prueba. Hasta donde sea posible, el microorganismo seleccionado para la prueba deberá ser muy específico en sus requerimientos nutricionales o en su sensibilidad al antibiótico y no deberá responder a sustancias extrañas que se encuentren en la muestra. Cuando se trabajan muestras naturales compuestas por varias sustancias relacionadas, las diferencias de sus actividades relativas frente a los organismos de prueba ocasionan muchos problemas, tal es el caso de la vitamina B_{12} y del ácido fólico.

7. Sustancias inhibidoras. Obviamente afecta el desarrollo microbiano la presencia de sustancias inhibidoras que pueden encontrarse, como huellas de antibiótico, detergentes o iones remanentes del proceso de lavado o como contaminantes de la muestra. Por ello reviste gran importancia el lavado cuidadoso de todo el material que se utilice. Se recomienda la técnica de lavado de material, descrito en la página 76.

8. Contaminación de la sustancia en estudio. En algunos casos, se han observado resultados inesperados en el ensayo microbiológico de vitaminas, en los cuales todos los tubos presentan un abundante crecimiento y no es posible establecer una curva aceptable. Obviamente este crecimiento es originado por una contaminación

con algún factor nutricional que los microorganismos requieren, o con una sustancia relacionada, por ejemplo un precursor de la vitamina.

9. Errores en las lecturas. Estos pueden originarse por falta de homogeneidad de los tubos, sobre todo cuando se transfiere a las celdas para la lectura; dispersión inadecuada de la suspensión; variación en el tiempo que transcurre entre la agitación para dispersar a los microorganismos y la lectura de sus propiedades ópticas; un tiempo muy corto puede causar interferencia por las pequeñísimas burbujas de aire formadas y un periodo muy largo podría permitir el asentamiento de los microorganismos.

3.4 MICROORGANISMOS UTILIZADOS.

Para la determinación cuantitativa de vitaminas y aminoácidos se requieren microorganismos auxótrofos, los cuales deben cultivarse inicialmente en un medio nutritivo óptimo que contenga un exceso de las sustancias que requieren; si luego se inoculan en un medio que carece de la vitamina o aminoácido para el cual son auxótrofos el crecimiento se inhibe totalmente. Al agregar cantidades crecientes pero siempre limitantes de la vitamina o aminoácido en estudio, el microorganismo crecerá en proporción a la disponibilidad de dicha sustancia, lo cual se refleja en la turbidez al medio o en el tamaño de la zona de crecimiento, según el tipo de técnica usada.

Para la determinación cuantitativa del antibiótico se utilizan microorganismos sensibles al mismo. El medio de cultivo debe favorecer el crecimiento del microorganismo de prueba y no debe contener ingredientes que pudieran antagonizar la actividad antimicrobiana del antibiótico.

A continuación se enumeran los microorganismos que integran la subcolección y los métodos analíticos para los cuales se utilizan.

Lactobacillus leichmannii ATCC 7830:

Para la determinación de vitamina B₁₂.

Lactobacillus plantarum ATCC 8014

Para la determinación de pantotenato de calcio y ácido nicotínico.

Leuconostoc mesenteroides ATCC 8042:

Para la determinación de L-lisina.

Streptococcus faecalis ATCC 8043

Para la determinación de ácido fólico.

Staphylococcus aureus ATCC 3352

Para la determinación de sulfato de neomicina.

Staphylococcus aureus ATCC 6538P

Para la determinación de tetraciclina, clortetraciclina, minociclina.

Staphylococcus epidermidis ATCC 12228

Para la determinación de sulfato de neomicina.

Sarcina lutea ATCC 9341

Para la determinación de eritomicina.

Bacillus cereus ATCC 11778

Para la determinación de tetraciclina.

3.5 CARACTERISTICAS DE LOS MICROORGANISMOS QUE INTEGRAN ESTA SUBCOLECCION.

BACILOS GRAM POSITIVOS NO ESPORULADOS.

Género Lactobacillus:

Bacilos tan cortos como cocobacilos o largos y delgados. Con frecuencia forman cadenas en fase logarítmica tardía. Generalmente inmóviles; flagelos peritricos cuando los hay. No esporulados. Son Gram positivos pero pueden volverse Gram negativos conforme aumenta su edad; algunas cepas presentan cuerpos dipolares, granulaciones internas o teñidos dispares en tinciones de Gram o de azul de metileno. Crecen en temperaturas de 5°C a 53°C, con óptimas generalmente de 30°C a 40°C. pH óptimo generalmente de 5 a 5.8 o menos. La fase logarítmica puede alargarse cuando el pH inicial del medio es neutro o alcalino. Acíduricos.

Metabolismo fermentativo aunque pueden crecer en atmósfera normal; algunos requieren condiciones anaeróbicas estrictas para el aislamiento. Típicamente sacaroclasticas; en la fermentación de la glucosa, pueden bajar el pH en una unidad o más. Al menos la mitad de sus productos finales de Carbono es lactato, el cual no fermentan. Otros productos pueden ser acetato, formato, succinato, dióxido de carbono o etanol.

Requerimientos nutricionales complejos; requieren de aminoácidos, péptidos, derivados de ácidos nucleicos, vitaminas, sales, ácidos grasos o sus estéres y carbohidratos fermentescibles. Los requerimientos nutricionales generalmente son característicos para cada especie.

Se encuentran generalmente en lacteos o derivados, granos y carnes, agua, aguas negras, cervezas y vinos, jugos y frutas, conservas ácidas; pueden encontrarse como pársitos en la boca, tracto intestinal, en vagina; en animales y humanos rara vez son patógenos.

Lactobacillus leichmannii.

Sinónimos. Bacillus leichmanni, Bacterium leichmannii, Lactobacterium leichmannii.

Bacilos de 0.6 por 2 a 4 μm , con extremos redondeados; aislados o en cadenas cortas, inmóviles, colonias rugosas, sin pigmentos. No crecen a 15°C, crecen a 45°C, su temperatura óptima es de 35°C a 40°C.

Requerimientos nutricionales complejos: requieren pantoteno de calcio, ácido fólico; la vitamina B₁₂ puede ser indispensable o estimula para su crecimiento.

CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS

PRUEBA	RESULTADO
Catalasa	-
Movilidad	-
Indol	-
H ₂ S	-

FERMENTACION DE CARBOHIDRATOS

PRUEBA	RESULTADO
Amigdalina	+
Arabinosa	-
Celobiosa	+
Fructosa	+
Galactosa	-w
Glucosa (ácido)	+
Glucosa (gas)	-
Glucanato	-
Lactosa	+
Maltosa	+
Manitol	-

PRUEBA	RESULTADO
Manosa	+
Melezitosa	-
Melibiosa	-
Rafinosa	-
Rhamnosa	-
Ribosa	-
Salicina	-
Sorbitol	-
Sacarosa	+
Trehalosa	-
Xilosa	-
Esculina	-

Los símbolos utilizados son:

- +Positivo (para \geq 90% de cepas)
-Negativo (para \geq 90% de cepas)
- wVariable

Lactobacillus plantarum.

Sinónimos. Streptobacterium plantarum, Lactobacillus arabinosus, Lactobacillus pentosus, Lactobacillus rudensis.

Bacilos con extremos redondeados, rectos, de 0.9 a 1.2 μ m por 3 a 8 μ m, aislados, en pares, o en cadenas cortas, generalmente inmóviles aunque se han descrito algunas cepas que se mueven por flagelos peritricos.

Crecen a 15°C, generalmente no crecen a 45°C. Su temperatura óptima es de 30°C a 35°C.

Su desarrollo en caldo producen gran turbidez homogénea y pesada.

Fermentan la ribosa produciendo una mol de ácido láctico y una mol de ácido acético; igual para otras pentosas que pueden fermentar.

PRUEBA	RESULTADO
Indol	-
H ₂ S	-

Los símbolos utilizados son:

- + Positivo (para 7/ 90% de las cepas)
- Negativo (para 7/ 90% de las cepas)
- d Débil

L. plantarum ATCC 8014 puede ser utilizado también para la determinación de 7 aminoácidos: Cistina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, triptofano y valina, biotina y ácido p-aminobenzoico.

COCOS GRAM POSITIVOS.

Género Streptococcus:

Células esféricas u ovoides, Gram positivas, de menos de 2 μ m de diámetro; cuando se cultivan en medio líquido se presentan en pares o cadenas. Pocas cepas del grupo D presentan movilidad. Anaeróbios facultativos. Temperatura óptima de crecimiento alrededor de 37°C; las temperaturas máximas y mínimas varían con la especie.

Metabolismo fermentativo; el principal producto final de la fermentación de la glucosa es ácido D-láctico; hemofermentativos. Nunca forman película, no contienen compuestos con grupo hemo. Requerimientos nutricionales complejos.

Streptococcus faecalis.

Sinónimos. Micrococcus ovalis, Enterococcus proteiformis, Streptococcus glycerinaceus.

Células ovoides elongadas en la dirección de las cadenas; 0.5 a 1 μ m de diámetro, generalmente inmóviles. Fermentan la glu-

Requieren para su crecimiento pantotenato de calcio y niacina; generalmente no requieren riboflavina.

FERMENTACION DE CARBOHIDRATOS

PRUEBA	RESULTADO
Amigdalina	+
Arabinosa	d
Celobiosa	+
Fructosa	+
Galactosa	+
Glucosa (ácido)	+
Glucosa (gas)	-
Gluconato	+
Lactosa	+
Maltosa	+
Manitol	+
Manosa	+
Melezitosa	d
Melibiosa	+
Rafinosa	+
Rhamnosa	-
Ribosa	+
Salicina	+
Sorbitol	+
Sacarosa	+
Trehalosa	+
Xilosa	d
Esculina	+

CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS

PRUEBA	RESULTADO
Catalasa	-
Movilidad	-

cosa produciendo generalmente ácido láctico, los productos finales pueden variar si el medio se mantiene en pH neutro, o si la incubación es aeróbica. Crecen en pH de 10 a 10.5 en medio con buffer de Carbonatos. Crece en presencia de 0.4% de telurito. Puede crecer con 0.5 a 1 unidad de penicilina por ml. Crecen a 47°C pero no a 50°C, y crecen en 6.5% de NaCl.

El subcultivo en medios sintéticos generalmente requieren de 7 a 13 aminoácidos y 5 vitaminas del complejo B, aunque hay variaciones entre las diferentes cepas. Las purinas y pirimidinas estimulan el crecimiento.

CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS

PRUEBA	RESULTADO
Hidrólisis de almidón	-
Hidrólisis de gelatina	-

FERMENTACION DE CARBOHIDRATOS

PRUEBA	RESULTADO
Glucosa	+
Maltosa	+
Lactosa	+
Trehalosa	+
Salicina	+
Manitol	v
Sorbitol	v
Arabinosa	-
Sacarosa	-
Inulina	v
Rafinosa	v

Los símbolos utilizados son:

- + Positivo (para 7/90% de las cepas)
- Negativo (para 7/90% de las cepas)
- v Variable.

S. faecalis ATCC 8043 también se utiliza para la cuantificación de piridoxal y piridoxamina.

Género Leuconostoc:

Células esféricas o lenticulares, usualmente en pares o cadenas Gram positivos, inmóviles, no esporulados. Anaerobios facultativos, temperatura óptima entre 20°C y 30°C.

Presentan requerimientos nutricionales complejos de vitaminas o aminoácidos. Todas las especies requieren ácido nicotínico, tiamina, ácido pantoténico y biotina.

Heterofermentativos; su crecimiento requiere de carbohidratos fermentescibles; fermentan la glucosa produciendo ácido D-láctico, etanol y CO₂. Muchas especies producen dextranas a partir de la sacarosa.

No son patógenos para el hombre, ni animales.

Leuconostoc mesenteroides:

Sinónimos. Ascococcus mesenteroides, Betacoccus arabinosaceus.

Células esféricas o lenticulares de 0.5 a 0.7 por 0.7 a 1.2 μ m; en pares o cadenas cortas. Crecen de 10°C a 37°C, su temperatura óptima es de 20°C a 30°C. No soportan calentamiento de 55°C por 30 minutos, aunque algunas cepas con grandes cantidades de polisacáridos extracelular resisten de 80°C a 85°C .

Producen una dextrana viscosa a partir de la sacarosa, especialmente a temperatura de 20°C a 25°C. La morfología de las colonias depende de la dextrana formada.

Los aminoácidos esenciales para su crecimiento son pocos generalmente, pero todas las cepas requieren valina y ácido glutámico.

FERMENTACION DE CARBOHIDRATOS.

PRUEBA	RESULTADO
Amigdalina	d
Arabinosa	+
Celobiosa	d
Fructosa	+
Galactosa	+
Glucosa (ácido)	+
Glucosa (gas)	-
Lactosa	d
Maltosa	+
Manitol	d
Manosa	+
Melibiosa	d
Rafinosa	d
Ribosa	+
Salicina	d
Sacarosa	+
Trehalosa	+
Xilosa	d

Los símbolos utilizados son:

- + Positivo (para 7/ 90% de las cepas)
- Negativo (para 7/ 90% de las cepas)
- d Débil

Género Staphylococcus.

Células esféricas de 0.5 a 1.5 μ m de diámetro que se presentan aislados o en pares y característicamente en racimos irregulares debido a que se dividen en más de un plano. Gram positivos, inmóviles. Anaerobios facultativos pero crecen mejor en aerobiosis. Temperatura óptima de 35°C a 40°C, pero pueden crecer de 6.5° a 46°C, pH óptimo de 7 a 7.5 con intervalo de

4.2 a 9.3.

Metabolismo respiratorio fermentativo, producen catalasa. Utilizan numerosos carbohidratos en presencia de O_2 , produciendo ácido principalmente acético, y cantidades minúsculas de CO_2 . En condiciones anaeróbicas fermentan la glucosa produciendo ácido láctico; requieren aminoácidos y vitaminas para crecer en condiciones aerobias, para crecer en condiciones anaeróbicas requieren uracilo y algún carbohidrato fermentescible.

Generalmente sensible a antibióticos tales como la β -lactama, tetraciclinas, novobiocina, cloranfenicol.

Staphylococcus aureus.

Sinónimos. Staphylococcus pyogenes, Staphylococcus pyogenes aureus, Micrococcus aureus, Micrococcus citreus.

Cocos de 0.8 a 1 μm de diámetro, aislados en pares o en racimos irregulares dada su división en varios planos. Son anaerobios facultativos pero crecen mejor en condiciones aerobias, la mayoría crecen entre 6.5 ° C y 46°C, y sus temperaturas óptimas son de 30°C a 37°C; crecen en pH de 4.2 a 9.3 con óptimo de 7 a 7.5. Crecen en concentraciones de 15% de cloruro de sodio y 40% de bilis.

Algunas cepas poseen cápsula; las colonias son suaves brillantes y butiráceas. En condiciones desfavorables se pueden producir colonias rugosas. La pigmentación es sumamente variable aunque la mayoría de las cepas presentan un pigmento casi naranja; algunas cepas resistentes a antibiótico frecuentemente tienen pigmentos amarillos. Estos pigmentos son carotenoides y su producción depende de las condiciones de desarrollo por lo que puede variar para una misma cepa. Son quimiorganótrofos y su metabolismo es respiratorio y fermentativo. Prácticamente todas las cepas producen coagulasa.

Para desarrollar en condiciones aeróbicas requieren hasta 12 aminoácidos, adenina y tiamina; en anaerobiosis requieren

uracilo y un carbohidrato fermentescible.

CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS

PRUEBA	RESULTADO
Caseina	+
Catalasa	+
Movilidad	-
Hidrólisis de almidón	-
Hidrólisis de gelatina	-
Leche tornasol (ácido)	+
Reducción de nitratos	+

FERMENTACION DE CARBOHIDRATOS

PRUEBA	RESULTADO
Arabinosa	-
Celobiosa	-
Glicerol	+
Glucosa	+
Inositol	-
Inulina	-
Lactosa	+
Maltosa	+
Manitol	+
Rafinosa	-
Ramnosa	-
Sacarosa	+
Salicina	+
Xilosa	-

Los símbolos utilizados son;

+ Positivo (para \geq 90% de las cepas)
- Negativo (para \geq 90% de las cepas)

S. aureus ATCC 6538P también puede emplearse en la cuantificación de penicilina y oxitetraclina.

Staphylococcus epidermidis.

Sinónimos. Staphylococcus epidermidis albus, Albococcus epidermidis, Staphylococcus saprophyticus, Micrococcus hyicus.

Cocos de 0.5 a 1.5 μ m de diámetro aislados en pares o en racimos irregulares y ocasionalmente en tetradas.

Anaeróbios facultativos crecen a 45°C a 10°C, con temperatura óptima de 30°C a 37°C; muchas crecen en 10 a 15% de NaCl y 40% de bilis. Las colonias circulares, convexas y pueden ser suaves o ligeramente granulares, generalmente son blancas aunque algunas variedades puede presentar pigmentos amarillos, naranja y rarisimamente púrpura.

Son quimiorganótrofos con metabolismo respiratorio y fermentativo. Son sensibles a la novobiocina.

CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS.

PRUEBA	RESULTADOS
Catalasa	+
Movilidad	-
Hidrólisis de almidón	-
Hidrólisis de gelatina	d
Leche tornasol (ácido)	+
Reducción de nitratos	+

FERMENTACION DE CARBOHIDRATOS

PRUEBA	RESULTADOS
Arabinosa	-
Celobiosa	-
Fructosa	+
Galactosa	+

PRUEBA	RESULTADOS
Glicerol	+
Glucosa	-
Inulina	-
Lactosa	v
Maltosa	v
Manitol	v
Manosa	+
Sacarosa	+
Sorbitol	-
Salicina	-
Rafinosa	-
Ramnosa	-
Trehalosa	+
Xilosa	-

Los símbolos utilizados son:

+	Positivo	(para 7/90% de las cepas)
-	Negativo	(para 7/90% de las cepas)
v	Variable	

S. epidermidis ATCC 12228 se utiliza también en cuantificaciones de oleandomicina, kanamicina, gentamicina y vancomicina.

Género Micrococcus:

Cocos de 0.5 a 3.5 μm de diámetro, aislados o en pares, pero generalmente en racimos, tetradas o paquetes cúbicos, inmóviles, Gram positivos, no esporulados. Crecimiento óptimo de 25°C a 30°C. Todos crecen en presencia de cloruro de sodio al 5%.

Quimiorganótrofos con metabolismo estrictamente respiratorio.

Solo utilizan oxígeno como aceptor final de electrones por ser aerobios estrictos.

Sus requerimientos nutricionales son variables y pueden incluir tiamina ó biotina como factores de crecimiento.

Micrococcus luteus.

Sinónimos. Sarcina lutea, Sarcina flava, Micrococcus flavus, Sarcina marginata. (La cepa ATCC incorporada a esta subcolección se denomina Sarcina lutea).

Cocos 1.0 a 2.0 μm de diámetro, aisladas o en pares, tetradas, en paquetes cúbicos. Inmóviles. Las colonias son verde-amari-llento o naranja y su aspecto es liso y convexo cuando crecen como tetradas o racimos, ligeramente granulares cuando forman paquetes cúbicos.

Su temperatura óptima de crecimiento es de 30°C; pero pueden crecer de 10°C a 45°C. Pueden crecer en 5% de NaCl, pero no en 10%.

Su metabolismo es estrictamente respiratorio. Pueden crecer en medios sencillos con ácido glutámico, biotina, y sales mi-nerales, pero algunas cepas requieren medios complejos y va-rios aminoácidos.

Son sensibles a la novobiocina y la lisozima.

CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS

PRUEBA	RESULTADO
Pigmento amarillo	+
rojo	-
Glucosa (ácido)	-
Xilosa (ácido)	-

Sarcina lutea. (ATCC 9341) se utiliza también en cuantificaciones de ampi-cilina, cloranfenicol, lincomicina y derivados de tetraciclina.

BACILOS Y COCOS ESPORULADOS.

Género Bacillus.

Bastoncillos rectos de 0.3 a 2.2 por 1.2 a 7 μm . La mayoría son móviles y típicamente los flagelos son laterales, forman endosporas, resisten el calor. Gram positivos, aunque pueden perder esta característica con la edad.

La temperatura máxima para el desarrollo va de 25°C a 75°C y la mínima de menos 5°C a 45°C. Los valores de pH en que pueden crecer varían desde 8 hasta 2. Crecen en concentraciones de 2 a 25% de NaCl.

La característica más significativa del género Bacillus es su capacidad de formar esporas; cuando se ha logrado producir mutantes no esporuladas, han tenido escasa supervivencia en la naturaleza. La esporulación depende de las condiciones del cultivo especialmente de una cantidad suficiente de manganeso.

Quimiorganótrofos, con metabolismo estrictamente fermentativo o ambos. Los requerimientos nutricionales para el desarrollo de las formas vegetativas van desde una sola fuente de carbono y energía, con nitrógeno inorgánico y sin factores de crecimiento, hasta requerimientos muy complejos que pueden incluir algunos factores aún no identificados.

Bacillus cereus.

Bacilos de 1 a 1.2 por 3 a 5 μm , Gram positivos, con esporas elípticas, generalmente centrales.

Crecen a temperaturas entre 10°C y 45°C y pueden crecer en 7% de NaCl.

Requieren varios aminoácidos, diferentes para cada cepa; No requieren vitaminas. Desarrollan en medios complejos en condiciones anaeróbicas requiriendo glucosa y nitratos.

CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS.

PRUEBA	RESULTADO
Movilidad	d
Reducción de NO_3^- a NO_2^-	+
Prueba de catalasa	+
Crecimiento anaeróbico	+
Crecimiento en 7.6% de NaCl	+
Caldo dextrosa-sabouraud	+

FERMENTACION DE CARBOHIDRATOS

PRUEBA	RESULTADO
Glucosa (ácido)	+
Glucosa (gas)	-
Xilosa	-
Alanina	-
Manitol	-

Los símbolos usados son:

- + Positivo (para // 90% de las cepas)
- Negativo (para // 90% de las cepas)

E. cereus ATCC 11778 esta especie se utiliza también para
Cuantificar vancomicina y minociclina

3.6 CONSERVACION DE LAS CEPAS.

Se ha utilizado el método de la liofilización ya que constituye un método apropiado para la conservación a largo plazo, de todos los cultivos utilizados y, lo que es más importante evita la pérdida de las características que los hacen valiosos en el laboratorio de control farmacéutico. La conveniencia de la liofilización como método para preservar la mayoría de los microorganismos ya ha sido bien establecida. Son muchos los reportes de las aplicaciones exitosas: Se conserva la viabilidad por muchos años, la contaminación es relativamente fácil de evitar y cuando la liofilización se hace apropiadamente, la variabilidad en los cultivos de células o esporas liofilizadas es mínima.

4. METODOLOGIA

4.1 Reactivos y medios de cultivo

1. Solución amortiguadora 0.1 M pH 4.5
Fosfato de potasio monobásico13.6 g
Agua1000 ml
Disolver perfectamente y ajustar con ácido fosfórico 18 N
ó hidróxido de potasio 10 N a pH 4.5

2. Reactivo para la prueba de catalasa.
Solución de peróxido de hidrógeno3%

3. Reactivos para la tinción de Gram.
Solución A
"Stock" cristal violeta
Cristal violeta20 g
Etanol, 95%100 ml
Solución B
Oxalato de amonio1 g
Agua destilada100 ml
Diluir la solución "stock" de cristal violeta 1:10 con
agua destilada y mezclar con 4 volúmenes de la solución
"stock" de oxalato. Guardar en frascos ambar.
Solución de yodo
Yodo resublimado20 g
Agua destilada100 ml
Solución de hidróxido de sodio
(4 g por 100 ml de agua destilada).....100 ml
Agua destilada900 ml
Contratinte de safranina
Solución A
Safranina3.4 g
Etanol, 95%100 ml
Solución de trabajo
Solución A 10 ml

- Agua destilada90 ml
4. Solución salina isotónica.
 Cloruro de sodio85 g
 Agua destilada1000 ml
5. Reactivo de Neesler.
 Ioduro de potasio70 g
 Ioduro mercuríco100 g
 Hidróxido de potasio100 g
 Agua destilada1000 ml
6. Fenol al 12%
 Una parte de fenol (36 - 38%) con 2 partes de agua.
7. Acido clorhídrico 0.1 N
 8.5 ml de ácido en 1 litro de agua.
8. Acido clorhídrico 0.01 N
 0.85 ml de ácido en 1 litro de agua.
9. Solución amortiguadora de fosfatos pH 8
 A) Fosfato de potasio monobásico9.078 g
 Agua destilada1000 ml
 B) Fosfato de sodio dibásico11.87 g
 Agua destilada1000 ml
 Disolver perfectamente cada uno por separado. Mezclar:
 31.1 ml de solución A con 96.9 ml de solución B.
10. Alcohol etílico
11. CO₂ sólido (hielo seco)
12. Solución fenolada al 5%

13. Agar micro-inóculo . (Difco 0320-02)

Proteasa-peptona No 3 Difco	5 g
Extracto de levadura	20 g
Dextrosa	2 g
Complejo de sorbitan monoleato	0.1 g
Agar	15 g
Agua	1000 ml

Se mezclan los ingredientes en el agua y se calienta hasta disolver el agar.

Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

14. Caldo dextrosa- sabouraud.

Dextrosa	40 g
Peptona	10 g
Agua destilada	1000 ml

Esterilizar a 121°C durante 10 minutos.

15. Base de caldo púrpura de bromocresol.

Peptona gelizada	10 g
Cloruro de sodio	5 g
Púrpura de bromocresol	0.02 g
Agua destilada	1000 ml

pH final 6.8

Se utilizarón los siguientes azúcares al 10%; amigdalina, arabinosa, celobiosa, fructosa, galactosa, glucosa, lactosa, maltosa, manitol, manosa, melezitosa, melibiosa, rafinosa, rhamnosa, ribosa, salicina, sorbitol, sacarosa, trehalosa, xylosa y esculina. Se agrega 1 ml de la solución de cada azúcar al tubo correspondiente con 9 ml de base púrpura (1:10). Se esteriliza a 121°C durante 15 minutos.

16. Agar anaerobico.

Peptona trypticasa	17.5 g
Peptona fitona	2.5 g
Cloruro de sodio	2.5 g
L-cistina	0.400 g

Dextrosa10 g
 Agar15 g
 Tioglicolato de sodio2 g
 Sulfoxilato de formaldehído sódico1 g
 Azul de metileno0.002 g
 Agua destilada1000 ml
 pH final \pm 7
 Esterilizar a 121° C durante 15 minutos.

17. SIM

Peptona de caseína20 g
 Peptona de carne6.6 g
 Citrato de amonio e hierro0.2 g
 Tiosulfato de sodio0.2 g
 Agar3.0 g
 Agua destilada1000 ml
 pH final 7.3 \pm 0.1
 Esterilizar a 121° C durante 15 minutos..

18. Agar almidón.

Peptona5 g
 Extracto de carne3 g
 Cloruro de sodio5 g
 Almidón20 g
 Agua destilada1000 ml
 pH final 6,9

Disolver el almidón en 400 ml de agua calentando, y el resto de los componentes, en los otros 600 ml calentando, una vez disuelto todo, mezclar las 2 partes.

19. Gelatina nutritiva.

Peptona gelizada	5 g
Extracto de carne	3 g
Gelatina	120 g
Agua destilada	1000 ml

pH final 6.9

Se mezclan los componentes y se calienta hasta disolver el agar.

Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

20. Caldo nutritivo

Peptona gelizada	5 g
Extracto de carne	3 g
Agua destilada	1000 ml

pH final 6.9

Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

21. Medio I para la determinación de antibiótico.

Peptona	6 g
Digerido pancreático de caseína	4 g
Extracto de levadura	3 g
Extracto de carne	1.5 g
Dextrosa	1.0 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

pH final 6.55 ± 0.05

Se mezclan los componentes y se calienta hasta disolver el agar.

Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

22. Medio 3 para la determinación de antibióticos.

Peptona	5 g
Extracto de levadura	1.5 g
Extracto de carne	1.5 g
Dextrosa	1.0 g

Cloruro de sodio3.5 g
 Fosfato de potasio dibásico3.68 g
 Fosfato de potasio monobásico1.32 g
 pH final 7.0 \pm 0.05
 Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

23. Leche estéril al 10%
 Leche descremada Difco (grado bacteriológico)10 g
 Agua destilada90 ml
 Se mezcla perfectamente la leche en polvo, en el agua.
 Esterilizar a 110°C durante 10 minutos.

24. Caldo para Lactobacilli AOAC (Difco 0900-15)
 Leche peptonizada.....15 g
 Extracto de levadura 5 g
 Dextrosa10 g
 Jugo de tomate5 g
 Fosfato de potasio monobásico2 g
 Tween 801 g
 Agua destilada1000 ml
 Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

25. Caldo para inóculo de Vitamina B₁₂ (Difco 0542-15).
 Jugo de tomate100 ml
 Peptona proteasa7.5 g
 Extracto de levadura7.5 g
 Dextrosa10 g
 Complejo sorbitan monoleato0.1 g
 Fosfato de potasio monobásico2 g
 Agua destilada1000 ml
 Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

26. Medio para conservación (Difco 0900-15-4)
 Leche peptonizada15 g

Extracto de levadura	5 g
Dextrosa	10 g
Jugo de tomate (100 ml)	5 g
Fosfato de potasio monobásico	2 g
Tween 80	1 g
Agar	10 g
Agua destilada	1000 ml

Se mezclan los componentes y se calienta para disolverlos.

Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

27. Medio basal para Pantotenato de Calcio (Difco 0604-15)

Casamino ácidos libres de vitaminas	10 g
Dextrosa	40 g
Acetato de sodio	20 g
L-cistina	0.4 g
DL-triptofano	0.2 g
Sulfato de adenina	20 mg
Clorhidrato de guanina	20 mg
Uracilo	20 mg
Clorhidrato de tiamina	200 µg
Riboflavina	400 µg
Niacina	1 mg
Piridoxina	800 µg
Acido p-aminobenzoico	200 µg
Biotina	0.8 µg
Fosfato de potasio monobásico	1 g
Fosfato de potasio dibásico	1 g
Sulfato de magnesio	0.4 g
Cloruro de sodio	20 mg
Sulfato ferroso	20 mg
Sulfato de manganeso	20 mg
Agua destilada	1000 ml

Esterilizar a 121°C durante 10 minutos

28. Medio basal para Vitamina B₁₂ (Difco 0457-15).
- | | |
|-------------------------------------|---------|
| Casamino ácidos libres de vitaminas | 15 g |
| Dextrosa | 40 g |
| Acetato de sodio | 20 g |
| Asparagina | 0.2 g |
| Acido ascórbico | 4 g |
| L-cistina | 0.4 g |
| DL-triptofano | 0.4 g |
| Sulfato de adenina | 20 mg |
| Clorhidrato de guanina | 20 mg |
| Uracilo | 20 mg |
| Xantina | 20 mg |
| Riboflavina | 1 mg |
| Clorhidrato de tiamina | 1 mg |
| Biotina | 10 µg |
| Niacina | 2 mg |
| Acido p-aminobenzoico | 2 mg |
| Pantotenato de calcio | 1 mg |
| Clorhidrato de piridoxina | 4 mg |
| Clorhidrato de piridoxal | 4 mg |
| Clorhidrato de piridoxamina | 800 µg |
| Acido fólico | 200 µg |
| Fosfato de potasio monobásico | 1 g |
| Fosfato de potasio dibásico | 1 g |
| Sulfato de magnesio | 0.4 g |
| Cloruro de sodio | 20 mg |
| Sulfato ferroso | 20 mg |
| Sulfato de manganeso | 20 mg |
| Complejo sorbitan monoleato | 2 g |
| Agua destilada | 1000 ml |
- Esterilizar a 121°C durante 5 minutos.

29. Medio basal para Acido nicotínico (Difco 0322-15).
- | | |
|-------------------------------------|------|
| Casamino ácidos libres de vitaminas | 12 g |
|-------------------------------------|------|

Dextrosa	40 g
Acetato de sodio	20 g
L-cistina	0.4 g
DL-triptofano	0.2 g
Sulfato de adenina	20 mg
Clorhidrato de guanina	20 mg
Uracilo	20 mg
Clorhidrato de tiamina	200 µg
Pantotenato de calcio	200 µg
Clorhidrato de piridoxina	400 µg
Riboflavina	400 µg
Acido p-aminobenzoico	100 µg
Biotina	0.8 µg
Fosfato de potasio monobásico	1 g
Fosfato de potasio dibásico	1 g
Sulfato de magnesio	0.4 g
Cloruro de sodio	20 mg
Sulfato ferroso	20 mg
Sulfato de manganeso	20 mg
Agua destilada	1000 ml
Esterilizar a 121°C durante 10 minutos.	

30. Medio basal para Lisina (Difco-0422).

Dextrosa	50 g
Acetato de sodio	40 g
Cloruro de amonio	6 g
DL-alanina	0.4 g
Clorhidrato de L-arginina	0.484 g
Asparagina	0.8 g
Acido L-aspártico	0.2 g
L-cistina	0.1 g
Acido L-glutámico	0.6 g
Glicina	0.2 g
Clorhidrato de L-histidina	0.124 g
DL-fenilalanina	0.2 g

L-prolina	0.2 g
DL-serina	0.1 g
DL-treonina	0.4 g
DL-triptofano80 mg
L-tirosina	0.2 g
DL-valina	0.5 g
DL- leucina	0.5 g
DL- isoleucina	0.5 g
DL- metionina	0.2 g
Sulfato de adenina	20 mg
Clorhidrato de guanina	20 mg
Uracilo	20 mg
Xantina	20 mg
Clorhidrato de tiamina	1 mg
Clorhidrato de piridoxina	2 mg
Clorhidrato de piridoxamina	600 μ g
Clorhidrato de piridoxal	600 μ g
Pantotenato de calcio	1 mg
Riboflavina	1 mg
Acido nicotínico	2 mg
Acido p-aminobenzoico	200 μ g
Biotina	2 μ g
Acido fólico	20 μ g
Fosfato de potasio monobásico	1.2 g
Fosfato de potasio dibásico	1.2 g
Sulfato de magnesio	0.4 g
Sulfato ferroso	20 μ g
Sulfato de manganeso	40 μ g
Cloruro de sodio	20 μ g
Agua destilada	1000 ml
Esterilizar a 121°C durante 10 minutos.	

31. Medio basal para Acido Fólico (Difco 0318-15).

Casamino ácidos libres de vitamina	12 g
Dextrosa	40 g
Citrato de sodio	20 g

L-cistina	0.2 g
DL-triptofano	0.2 g
Sulfato de adenina	20 mg
Clorhidrato de guanina	20 mg
Uracilo	20 mg
Clorhidrato de tiamina	2 mg
Clorhidrato de piridoxina	4 mg
Riboflavina	2 mg
Niacina	2 mg
Acido p-aminobenzoico	200 µg
Biotina	0.8 µg
Pantotenato de calcio	400 µg
Fosfato de potasio monobásico	1 g
Fosfato de potasio dibásico	1 g
Sulfato de magnesio	0.4 g
Cloruro de sodio	20 mg
Sulfato ferroso	20 mg
Sulfato de manganeso	20 mg
Agua destilada	1000 ml

Esterilizar a 121°C durante 10 minutos.

32. Medio 2 para la determinación de antibióticos.

Peptona	6 g
Extracto de levadura	3 g
Extracto de carne	1.5 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

Se mezclan los ingredientes y se calienta para disolver el agar. Después de esterilizar a 121°C durante 15 minutos, ajustar pH 5.8 - 6.

33. Medio 11

Peptona	6 g
Digerido pancreático de caseína	4 g

Extracto levadura	3 g
Extracto de carne	1.5 g
Dextrosa	1.0 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

pH final 8.3

Se mezclan los ingredientes y se calientan para disolver el agar. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

34. Solución extractiva acuosa.

Fosfato de sodio dibásico	12.9 g
Acido citrico anhidro	11 g
Metabisulfito de sodio	10 g
Agua destilada	1000 ml

Se mezclan todos los componentes hasta una completa disolución

4.2 MATERIAL Y EQUIPO

Pipetas volumétricas de	10 ml
Pipetas volumétricas de	2 ml
Pipetas volumétricas de	3 ml
Pipetas volumétricas de	5 ml
Pipetas volumétricas de	6 ml
Pipetas graduadas de	10 ml
Pipetas graduadas de	5 ml
Pipetas graduadas de	1 ml
Pipetas Pasteur	
Vasos de precipitados de	50 ml
Vasos de precipitados de	100 ml
Matraces Erlenmeyer de	100 ml
Matraces volumétricos de	10 ml
Matraces volumétricos de	50 ml
Matraces volumétricos de	100 ml
Matraces volumétricos de	500 ml
Matraces volumétricos de	1000 ml
Ampolletas pyrex	
Cilindros metálicos	
Cajas de Petri.	
Tubos de cultivo de 12 por 75	
Tubos de cultivo de 13 por 100	
Tubos de cultivo de tapón de rosca de 12 por 75	
Tubos de cultivo de tapón de rosca de 13 por 100	
Algodón	
Gasa	
Pinzas	
Gradillas	
Frascos para la liofilizadora	
Asa de sierra	
Mechero	
Tripie	
Embudo	

Centrífuga
Liofilizadora
Incubadora
Baño de agua a temperatura constante
Espectrofotómetro
Colorímetro
Microscopio
Autoclave
Lampara de U.V.
Soplete
Campana de flujo laminar
Horno
Balanza analítica
Balanza granataria
Licuadora
Horno

METODO MICROBIOLOGICO PARA LA DETERMINACION DEL
PANTOTENATO DE CALCIO

MICROORGANISMO:

Lactobacillus plantarum ATCC 8014

CONSERVACION DEL MICROORGANISMO.

1. Los cultivos de conservación "stock" se preparan resemebrándose cada semana por picadura en el medio de conservación (#26).
2. Se incuban a 37°C por 24 horas y se almacenan en refrigeración.

PREPARACION DEL INOCULO.

1. El inóculo para las determinaciones se prepara a partir de un cultivo "stock", en tubos con 10 ml de caldo AOAC para Lactobacilli (#24).
2. Se incuba a 37°C por 24 horas.
3. Se centrifuga a 2000 rpm durante 5 minutos y se decanta.
4. Se resuspenden las células en 10 ml de solución salina isotónica estéril y se centrifugan nuevamente en las mismas condiciones.
5. Se resuspenden las células en 10 ml de solución salina isotónica estéril y se transfieren 0.5 ml a 9.5 ml de solución salina isotónica estéril (1/20). Se usa una gota de esta suspensión para inocular cada tubo de ensayo.

PREPARACION DE MUESTRAS.

Cápsulas y Tabletas. Se pone la muestra con una alícuota de agua destilada para llevarla a una concentración de 10 µg de Pantotenato de Calcio por ml y se agita en licuadora durante 5 minutos.

PREPARACION DEL ESTANDAR.

1. Se pesa el equivalente a 50 mg de estándar de Pantotenato de Calcio y se diluye con agua a 500 ml. Esta solución "stock" contiene 100 microgramos de Pantotenato de Calcio por ml. La solución "stock" debe protegerse de la luz y almacenarse en refrigeración. No se debe usar después de 30 días.

2. Para cada ensayo se diluye la solución "stock" con agua destilada, tomando 5 ml y llevándolos a 500 ml de aforo; de esta solución se toman 10 ml y se llevan a 100 ml de aforo. Esto da como resultado una concentración de 0.10 $\mu\text{g/ml}$ de Pantotenato de Calcio.
3. Se hacen series de tubos por duplicado del estándar y las muestras.

Tubos estándar	Sol. estándar (ml)	Conc. de estándar ($\mu\text{g/tubo}$)
1 - 2	0.0	0.00
3 - 4	0.1	0.01
5 - 6	0.2	0.02
7 - 8	0.4	0.04
9 - 10	0.6	0.06
11 - 12	0.8	0.08
13 - 14	1.0	0.10
15 - 16	1.2	0.12
17 - 18	1.5	0.15
19 - 20	2.0	0.20

Tubo muestra	Muestra (ml)	Conc. de PaCa ($\mu\text{g/tubo}$)
1 - 2	0.2	0.02
3 - 4	0.5	0.05
5 - 6	1.0	0.10
7 - 8	1.5	0.15
9 - 10	2.0	0.20

4. Se ajusta el volumen de cada tubo a 5 ml de agua y se adicionan 5 ml de medio basal (# 27) a cada uno de los tubos.
5. Se tapan los tubos con algodón y gasa.
6. Se esterilizan a 121°C durante 10 minutos. Se enfrían rápidamente hasta temperatura ambiente.
7. Se inoculan los tubos asépticamente con una gota del inóculo, y se agitan vigorosamente todos los tubos para que se disperse el inóculo.
8. Se incuba a 37°C por 18 horas.

9. Se mantiene en refrigeración 2- 8°C por 15- 20 minutos.
10. Se preparan seis tubos conocidos como blancos. Consisten en 5 ml de agua destilada y 5 ml de medio basal (#27).
- Se tratan igual que los tubos del estándar y muestras. Se usan para ajustar el colorímetro o espectrofotómetro. No se inoculan.

LECTURA DE RESULTADOS

Se agitan los tubos uniformemente. Se ajusta el aparato a un 100% de transmitancia usando el blanco no inoculado.

Se usa un filtro 640 para el colorímetro o una longitud de onda de 640 nm para el espectrofotómetro.

CALCULOS

Se determina el contenido de cada tubo problema en comparación con las lecturas turbidimétricas de la curva estándar.

Se hace una gráfica con los datos de los tubos de la curva estándar % de transmitancia vs. microgramos de PaCa. En esta curva se interpola para determinar el contenido de PaCa en la muestra problema.

FORMULA

$$\begin{array}{l}
 \text{mg/ml teóricos} \longrightarrow 100\% \\
 \text{mg/ml prácticos} \longrightarrow X \% \\
 \\
 \text{Valor Teórico} \longrightarrow \text{en } \% \\
 X \longrightarrow \% \text{ obtenido}
 \end{array}$$

METODO MICROBIOLOGICO PARA LA DETERMINACION DE
VITAMINA B₁₂

MICROORGANISMO

Lactobacillus leichmannii ATCC 7830

CONSERVACION DEL MICROORGANISMO.

1. Los cultivos de conservación ("stock") se preparan resemebrándose cada semana por picadura en el medio para conservación (#26).
2. Se incuban a 37°C por 24 horas y se almacenan en refrigeración.

PREPARACION DEL INOCULO

1. El inóculo para las determinaciones se prepara a partir de un cultivo "stock", en tubos con 10 ml de caldo para inóculo de Vitamina B₁₂ (# 25).
2. Se incuba a 37°C por 8 horas.
3. Se centrifuga a 2000 rpm durante 5 minutos y se decanta.
4. Se resuspenden las células en 10 ml de solución salina isotónica estéril y se centrifugan nuevamente en las mismas condiciones.
5. Se resuspenden las células lavadas con la misma solución salina estéril hasta llegar a una transmitancia de 80 a 90%.

PREPARACION DE MUESTRAS

Líquidos. Para cada mililitro de muestra usada adicionar 25 ml de la solución extractiva acuosa (# 34) preparada recientemente. Se pone la muestra con una alícuota de agua destilada para llevarla a una concentración de 0.00004 µg/ml y se agita durante 5 minutos. Polvos, cápsulas y tabletas. Para cada gramo, adicionar 25 ml de la solución extractiva acuosa preparada recientemente (# 34). Se pone la muestra con una alícuota de agua destilada para llevarla a una concentración de 0.00004 µg/ml y se agita durante 5 minutos en licuadora. Se esteriliza a 121°C durante 3 minutos y se filtra si es necesario.

PREPARACION DEL ESTANDAR

1. Se pesa el equivalente a 11.54 µg de estándar de Cianocobalamina y se transfiere a un matraz volumétrico de 10 ml, se diluye con etanol al 25% hasta la marca. La solución "stock" debe protegerse

de la luz y almacenarse en refrigeración. No se debe usar después de 30 días.

2. Para cada ensayo se diluye la solución "stock" con agua destilada, tomando 2 ml y llevándolos a 250 ml de aforo; de esta solución se toman 5 ml y se llevan a 100 ml de aforo, de esta solución se toman 2 ml y se llevan a 200 ml de aforo. Esto da como resultado una concentración de 0.00004 $\mu\text{g/ml}$ de Cianocobalamina.

3. Se hacen series de tubos por duplicado del estándar y las muestras.

Tubos estándar	Sol. estándar (ml)	Conc. de estándar ($\mu\text{g/tubo}$)
1 - 2	0.0	0.00000
3 - 4	0.5	0.00002
5 - 6	1.0	0.00004
7 - 8	1.5	0.00006
9 - 10	2.0	0.00008
11 - 12	2.5	0.00010
13 - 14	3.0	0.00012
15 - 16	3.5	0.00014
17 - 18	4.0	0.00016
19 - 20	4.5	0.00018
21 - 22	5.0	0.00020

Tubos muestra	muestra (ml)	Conc. de B ₁₂ ($\mu\text{g/tubo}$)
1 - 2	1.0	0.00004
3 - 4	2.0	0.00008
5 - 6	2.5	0.00010
7 - 8	3.0	0.00012
9 - 10	4.0	0.00016

4. Se ajusta el volumen de cada tubo a 5 ml de agua y se adicionan 5 ml de medio basal (#28) a cada uno de los tubos.

5. Se tapan los tubos con algodón y gasa.
6. Se esterilizan a 121°C durante 5 minutos. Se enfrían rápidamente hasta temperatura ambiente.
7. Se inculan los tubos asépticamente con una gota del inóculo, y se agitan vigorosamente todos los tubos para que se disperse el inóculo.
8. Se incuban a 37°C por 18 horas.
9. Se mantienen en refrigeración por 15 - 20 minutos.
10. Se preparan seis tubos conocidos como blancos. Consisten en 5 ml de agua destilada y 5 ml de medio basal (#28). Se tratan igual que los tubos del estándar y muestras. Se utilizan para ajustar el colorímetro o espectrofotómetro. No se inoculan.

LECTURA DE RESULTADOS

Se agitan los tubos uniformemente. Se ajusta el aparato a un 100% T usando el blanco no inoculado, con un filtro 640 para el colorímetro ó a una longitud de onda 640 nm para el espectrofotómetro.

CALCULOS

Se determina el contenido de cada tubo problema por comparación con las lecturas turbidimétricas de la curva estándar, para lo cual se hace una gráfica con los datos obtenidos de los tubos de la curva estándar; %T contra microgramos de Vitamina B₁₂.

En esta curva se interpola para determinar el contenido de Vitamina B₁₂ en la muestra problema.

FORMULA

mg/ml teóricos → 100%

mg/ml prácticos → X%

Valor teórico → en %

X → % obtenido

METODO MICROBIOLOGICO PARA LA DETERMINACION DEL
ACIDO NICOTINICO

MICROORGANISMO.

Lactobacillus plantarum ATCC 8014

CONSERVACION DEL MICROORGANISMO.

1. Los cultivos de conservación ("stock") se preparan resemebrándose cada semana por picadura en el medio de conservación (#26).
2. Se incuban a 37°C por 24 horas y se almacena en refrigeración.

PREPARACION DEL INOCULO.

1. El inóculo para las determinaciones se prepara a partir de un cultivo "stock", en tubos con 10 ml de caldo AOAC para Lactobacilli (# 24).
2. Se incuba a 37°C por 24 horas
3. Se centrifuga a 2000 rpm durante 5 minutos y se decanta.
4. Se resuspenden las células en 10 ml de solución salina isotónica estéril y se centrifugan nuevamente en las mismas condiciones.
5. Se resuspenden las células en 10 ml de solución salina isotónica estéril (1/20). Se usa una gota de esta suspensión para inocular cada tubo de ensayo.

PREPARACION DE MUESTRAS.

Cápsulas y tabletas. Se pone la muestra con una alícuota de agua destilada para llevarla a una concentración de 0.1µg/ml de ácido nicotínico y se agita en licuadora durante 5 minutos.

PREPARACION DEL ESTANDAR.

1. Se pesa el equivalente de 0.1 g de estándar de Niacina y se diluye con agua a 1000 ml . Esta solución "stock" contiene 100 microgramos de Acido nicotínico por ml . La solución "stock" debe protegerse de la luz y almacenarse en refrigeración. No se debe usar después de 30 días.
2. Para cada ensayo se diluye la solución "stock" con agua destilada, tomando 1 ml y llevándolos a 1000 ml de aforo.

Esto da como resultado una concentración de 0.1 $\mu\text{g/ml}$ de Acido Nicotínico.

3. Se hacen series de tubos por duplicado del estándar y las muestras problemas.

Tubos estándar	Sol. estándar (ml)	Conc. de estándar ($\mu\text{g/tubo}$)
1 - 2	0.0	0.0
3 - 4	0.5	0.05
5 - 6	1.0	0.1
7 - 8	2.0	0.2
9 - 10	3.0	0.3
11 - 12	4.0	0.4
13 - 14	5.0	0.5

Tubos muestras	muestra (ml)	Conc. de Ac. Nicotínico ($\mu\text{g/tubo}$)
1 - 2	1.0	0.1
3 - 4	2.0	0.2
5 - 6	3.0	0.3
7 - 8	5.0	0.5

4. Se ajusta el volumen de cada tubo a 5 ml de agua y se adiciona 5 ml del medio basal (#29) a cada uno de los tubos.

5. Se tapan los tubos con algodón y gasa.

6. Se esterilizan a 121°C durante 10 minutos. Se enfrían rápidamente hasta temperatura ambiente.

7. Se inoculan asépticamente con una gota del inóculo, y se agitan vigorosamente todos los tubos para que se disperse el inóculo.

8. Se incuban a 37°C por 18 horas.

9. Se mantienen en refrigeración 2-8°C por 15 minutos.

10. Se preparan seis tubos conocidos como blancos. Consisten en 5 ml de agua destilada y 5 ml de medio basal (#29). Se tratan igual que los tubos del estándar y muestras. Se usan para ajustar el colorímetro ó espectrofotómetro. No se inoculan.

LECTURA DE RESULTADOS.

Se agitan los tubos uniformemente. Se ajusta el aparato a un 100% de transmitancia usando el blanco no inoculado. Se emplea un filtro 640 para el colorímetro o una longitud de onda 640 nm para el espectrofotómetro.

CALCULOS.

Se determina el contenido de cada tubo problema por comparación con las lecturas turbidimétricas de la curva estándar.

Se hace una gráfica con los datos de los tubos de la curva estándar; % de transmitancia contra microgramos de Acido Nicotínico. En esta curva se interpola para determinar el contenido de Acido Nicotínico en la muestra problema.

FORMULA

mg/ml teóricos \longrightarrow 100%

mg/ml prácticos \longrightarrow X%

Valor teórico \longrightarrow en%

X \longrightarrow % obtenido

METODO MICROBIOLOGICO PARA LA DETERMINACION DE
ACIDO FOLICO

MICROORGANISMO:

. Streptococcus faecalis ATCC 8043

CONSERVACION DEL MICROORGANISMO.

1. Los cultivos de conservación ("stock") se preparan resemebrándose cada por picadura en el medio para conservación (# 26).
2. Se incuban a 37°C por 24 horas y se almacenan en refrigeración.

PREPARACION DEL INOCULO.

1. El inóculo para las determinaciones se prepara a partir de un cultivo "stock", en tubos con 10 ml de caldo AOAC para Lactobacilli (# 24).
2. Se incuban a 37°C por 8 horas.
3. Se centrifuga a 3000 rpm durante 5 minutos y se decanta.
4. Se resuspenden las células en 10 ml de solución salina isotónica estéril y se centrifugan nuevamente en las mismas condiciones.
5. Se resuspenden las células lavadas con la misma solución salina estéril hasta llevar a una transmitancia de 80 - 90%.

PREPARACION DE MUESTRAS.

Para cápsulas, tabletas, y polvos que contienen materiales duros de disolver, se pone la muestra con 500 ml de fosfato de potasio al 3.3% y se agita por 5 minutos en licuadora.

Se lleva a una concentración de 0.001 µg de ácido fólico por ml.

PREPARACION DEL ESTANDAR.

1. Se pesa el equivalente a 108 mg de estándar de Acido Fólico y se transfiere a un matraz volumétrico de un litro. Se adiciona 100 ml de 0.01 N de NaOH y se disuelve; se agregan 200 ml de etanol al 20% y se diluye hasta la marca con agua destilada. La solución "stock" debe protegerse de la luz y almacenarse en refrigeración. No se debe usar después de 60 días.
2. Para cada ensayo se diluye la solución "stock" con agua destilada, tomando 5 ml y llevándolos a 500 ml de aforo; de esta solución

se toman 10 ml y se llevan a 100 ml de aforo, de esta solución se toman 5 ml y se llevan a 500 ml de aforo. Esto da como resultado una concentración de 0.001 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Acido Fólico.

3. Se hacen series de tubos por duplicado del estándar y las muestras.

Tubos estándar	Sol. estándar (ml)	Conc. de estándar ($\mu\text{g}/\text{tubo}$)
1 - 2	0.0	0.000
3 - 4	0.5	0.0005
5 - 6	1.0	0.001
7 - 8	1.5	0.0015
9 - 10	2.0	0.0020
11 - 12	2.5	0.0025
13 - 14	3.0	0.003
15 - 16	3.5	0.0035
17 - 18	4.0	0.004
19 - 20	4.5	0.0045
21 - 22	5.0	0.005

Tubos muestra	Muestra (ml)	Conc. de Acido Fólico ($\mu\text{g}/\text{tubo}$)
1 - 2	1.0	0.001
3 - 4	2.0	0.002
5 - 6	2.5	0.0025
7 - 8	3.0	0.003
9 - 10	4.0	0.004

4. Se ajusta el volumen de cada tubo a 5ml de agua destilada y se adiciona 5 ml del medio basal (#31) a cada uno de los tubos.

5. Se tapan los tubos con algodón y gasa.

6. Se esterilizan a 121° C durante 10 minutos. Se enfrían rápidamente hasta temperatura ambiente.

7. Se inoculan los tubos asépticamente con una gota del inóculo, y se agitan vigorosamente todos los tubos para que se disperse el inó-

culo.

8. Se incuban a 37°C por 18 horas.
9. Se mantienen en refrigeración por 15 - 20 minutos.
10. Se preparan seis tubos conocidos como blancos. Consisten en 5 ml de medio basal (# 31) y 5 ml de agua destilada. Se tratan igual que los tubos del estándar y muestras. Se utilizan para ajustar el colorimétero o espectrofotómetro. No se inoculan.

LECTURA DE RESULTADOS.

Se agitan los tubos uniformemente. Se ajusta el aparato a un 100% de transmitancia usando el blanco no inoculado, se emplea un filtro de 640 para el colorimétero o una longitud de onda 640 nm para el espectrofotómetro.

CALCULOS.

Se determina el contenido de cada tubo problema en comparación con las lecturas turbidimétricas de la curva estándar. Se hace una gráfica con los datos de la curva estándar; % de transmitancia contra microgramos de Acido Fólico. En esta curva se interpola para determinar el contenido de Acido Fólico en la muestra problema.

FORMULA.

mg/ml teóricos \longrightarrow 100%

mg/ml prácticos \longrightarrow X%

Valor teórico \longrightarrow en %

X \longrightarrow % obtenido

METODO MICROBIOLOGICO PARA LA DETERMINACION DE
ERITROMICINA

MICROORGANISMO.

Sarcina lutea ATCC 9341

CONSERVACION DEL MICROORGANISMO.

1. Los cultivos de conservación ("stock") se preparan resembrándose cada mes por estría en el medio inclinado de conservación (#21).
2. Se incuban a 37° C por 24 horas y se almacenan en refrigeración.

PREPARACION DEL INOCULO

1. El inóculo para las determinaciones se prepara a partir de un cultivo "stock" en tubos inclinados de medio 2 (#32).
2. Se incuba a 37° C por 24 horas.
3. Se recoge el desarrollo con 3 ml de solución salina isotónica estéril y se pasa a un tubo preparado con medio 1 de cultivo (#21).
4. Con ayuda de perlas de vidrio se distribuye el inóculo sobre toda la superficie.
5. Se incuba por 24 horas a 37° C.
6. Se lava el crecimiento de la superficie con 50 ml de solución salina isotónica estéril.
7. Se hace una dilución 1:40 para obtener 25% de transmitancia a 540 nm y se usan 6 ml de la suspensión por cada 100 ml de medio 2 (#32).

PREPARACION DE MUESTRAS.

Polvo. Se pone con 40 ml de metanol y se afora con solución amortiguadora pH 8 (#9). Se agita durante 15 minutos, mecánicamente. Se coloca el matraz en baño maría por 2 horas a 60° C. Se enfria a temperatura ambiente. Se lleva hasta obtener una concentración de 20 µg/ml.

PREPARACION DEL ESTANDAR.

1. Se pesa el equivalente a 50 mg de estándar de eritromicina y disolver en 50 ml de metanol para obtener una concentración de 1000 µg/ml.
2. Para cada ensayo se diluye la solución "stock", tomando una alícuota de 10 ml y se afora a 100 ml con solución amortiguadora pH 8

(# 9), para obtener una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$.

3. A partir de esta disolución tomar las siguientes alícuotas: 1.28 ml, 1.6 ml, 2.0 ml, 2.5 ml, y 3.12 ml y aforarse a una a 100 ml con la solución amortiguadora pH 8. La dilución de referencia será la de 2.0 $\mu\text{g/ml}$.

PREPARACION DE LAS CAJAS PETRI.

1. Se preparan las cajas el mismo día de su empleo.
2. Se usan 16 cajas petri para la curva tipo y 4 para cada muestra.
3. Se colocan 21 ml de medio 2 (# 32) en cada una de las cajas.
4. Se dejan solidificar y secar con las cubiertas ligeramente levantadas.
5. Se añaden 4 ml de medio 2 inoculado a cada una de las cajas, y se dejan solidificar.
6. Se colocan 6 cilindros de acero inoxidable estéril sobre la superficie del medio, de cada una de las cajas.
7. Alternadamente se distribuyen las soluciones de la curva tipo así como las del problema.
8. A cada cilindro se le agrega 0.2 ml del estándar y de la solución de ensayo.
9. Se dejan incubar por 18 horas a 37° C.

LECTURAS.

Se miden las zonas de inhibición producidas. El diámetro de las zonas de inhibición indica la cantidad de antibiótico presente.

CALCULOS.

Se promedian los valores de los tamaños de los halos de inhibición de cada uno de las concentraciones del estándar. Se utilizan las siguientes formulas para calcular los puntos Máximos y Mínimos.

$$L = \frac{3a + 2b + c - e}{5}$$

Valor de los halos de inhibición para la menor concentración.

$$H = \frac{3e + 2d + c - a}{5}$$

Valor de los de inhibición para la mayor concentración.

a, b, c, d, y e: promedio de los valores de los halos de inhibición, en mm para cada concentración, del valor más bajo (a) al valor mas alto (e) respectivamente.

FORMULA

mg/ml teóricos → 100%

mg/ml prácticos → X%

Valor teórico → en %

X → % obtenido.

METODO MICROBIOLOGICO PARA LA DETERMINACION DE
VITAMINA B₁₂
(DIFUSION)

MICROORGANISMO.

Lactobacillus leichmannii ATCC 7830

CONSERVACION DEL MICROORGANISMO.

1. Los cultivos de conservación ("stock") se preparan resemebrándose cada semana por picadura en el medio de conservación (# 26).
2. Se incuban a 37° C por 24 horas y se almacena en refrigeración.

PREPARACION DEL INOCULO.

1. El inóculo para las determinaciones se prepara a partir de un cultivo "stock", en tubos con 10 ml de caldo para inóculo de Vitamina B₁₂ (#25).
2. Se incuba a 37° C por 24 horas.
3. Se centrifuga a 2000 rpm durante 5 minutos y se decanta.
4. Se resuspenden las células en 10 ml de solución salina isotónica estéril y se centrifugan nuevamente en las mismas condiciones.
5. Se resuspenden las células en 10 ml de solución salina isotónica estéril y se transfiere 1 ml a 9 ml de solución salina estéril. Se utiliza 1 ml por cada 100 ml de medio basal con agar al 15% (# 28).

PREPARACION DE MUESTRAS.

Líquidos. Para cada mililitro de muestra usada adicionar 25 ml de la solución extractiva acuosa (# 34) preparada recientemente. Se pone la muestra con una alícuota de agua destilada para llevarla a una concentración de 200 ng/ml y se agita durante 5 minutos mecánicamente.

Polvos, cápsulas y tabletas. Para cada gramo, se adicionan 25 ml de la solución extractiva acuosa preparada recientemente (# 34). Se pone la muestra con una alícuota de agua destilada para llevarla a una concentración de 200 ng/ml y se agita durante 5 minutos en licuadora. Se esteriliza a 121° C durante 3 minutos esta primera dilución. Se filtra si es necesario.

METODO MICROBIOLOGICO PARA LA DETERMINACION DE
TETRACICLINAS

MICROORGANISMO.

Bacillus cereus ATCC 11778

CONSERVACION DEL MICROORGANISMO.

1. Los cultivos de conservación ("stock") se preparan reseleccionándose cada mes por estría en el medio inclinado de conservación (#21).
2. Se incuban a 37° C por 24 horas y se almacenan en refrigeración.

PREPARACION DEL INOCULO.

1. El inóculo para las determinaciones se prepara a partir de un cultivo "stock", en tubos inclinados de medio 2 para la determinación de antibióticos (#32).
2. Se incuba a 37° C por 24 horas.
3. Se lava el crecimiento con aproximadamente 5 mililitros de solución salina isotónica estéril.
4. Se calienta esta suspensión a 65° C durante 30 minutos.
5. Se adicionan 4 ml del inóculo preparado a 100 ml del medio 2 para la determinación de antibióticos (#32).

PREPARACION DE MUESTRAS.

Tabletas y polvos. La muestra se lleva a una concentración final de 1.0 µg/ml. La primera dilución se hace con HCl 0.1 N. Las diluciones sucesivas se hacen con buffer 0.1 M pH 4.5 (# 1).

PREPARACION DEL ESTANDAR.

1. Se pesa el equivalente a 25 mg de estándar y se afora a 250 ml con HCl 0.1N. La solución "stock" debe protegerse de la luz y almacenarse en refrigeración. No se debe usar después de 3 días.
2. Para cada ensayo se diluye la solución "stock" con buffer 0.1M (# 1) tomando:

		6.4 ml	----->	10 ml (0.64 µg/ml)
1 ml	----->	100 ml	----->	8.0 ml
		(1.0 µg/ml)	----->	10 ml (0.80 µg/ml)

De la solución "stock" (100 µg/ml) tomar.

1.25 ml -----> 100 ml (1.25 µg/ml)

1.56 ml -----> 100 ml (1.56 µg/ml)

PREPARACION DE LAS CAJAS PETRI.

1. Se preparan las cajas el mismo día de su empleo.
2. Se usan 16 cajas petri para la curva tipo y 4 para cada muestra.
3. Se colocan 21 ml de medio 2 para la determinación de antibióticos (#32), en cada una de las cajas.
4. Se dejan solidificar y secar con las cubiertas ligeramente levantadas.
5. Se añaden 4 ml de medio 2 para la determinación de antibióticos inoculado, a cada una de las cajas y se dejan solidificar.
6. Se colocan 6 cilindros de acero inoxidable estériles sobre la superficie del medio, de cada una de las cajas.
7. Alternadamente se distribuyen las soluciones de la curva tipo así como la del problema.
8. A cada cilindro se le agregan 0.2 ml del estándar o de la solución de ensayo.
9. Se dejan incubar por 18 horas a 37° C.

LECTURA.

Se miden las zonas de inhibición producidas. EL diámetro de las zonas de inhibición indica la cantidad de antibiótico presente.

CALCULOS.

Se promedian los valores de los tamaños de los halos de inhibición de cada una de las concentraciones del estándar. Se utilizan las siguientes fórmulas para calcular los puntos Máximos y Mínicos.

$$L = \frac{3a + 2b + c - e}{5}$$

Valor de los halos de inhibición para la menor concentración.

$$H = \frac{3e + 2d + c - a}{5}$$

Valor de los halos de inhibición para la mayor concentración.

a, b, c, d, y e; promedio de los valores de las zonas de inhibición en mm, para cada concentración, del valor más bajo (a) al valor más alto (e) respectivamente.

FORMULA.

mg/ml teórico \longrightarrow 100%

mg/ml prácticos \longrightarrow X%

Valor teórico \longrightarrow en %

X \longrightarrow % obtenido.

METODO MICROBIOLOGICO PARA LA DETERMINACION DE
SULFATO DE NEOMICINA

MICROORGANISMO. Staphylococcus aureus ATCC 3352
Staphylococcus epidermidis ATCC 12228

CONSERVACION DEL MICROORGANISMO.

1. Los cultivos de conservación ("stock") se preparan resemebrándose cada mes por estría en el medio inclinado de conservación (#21).
2. Se incuban a 37° C por 24 horas.

PREPARACION DEL INOCULO

1. El inóculo para las determinaciones se prepara a partir de un cultivo "stock", en tubos inclinados con el medio 11 (# 33).
2. Se incuba a 37° C por 24 horas.
3. Se lava el crecimiento con 5 ml de solución salina isotónica estéril.
4. Se adicionan 4 ml del inóculo preparado, a 100 ml de medio 11 para determinación de antibióticos (# 33).

PREPARACION DE MUESTRAS.

Ungüentos. La muestra se lleva a una concentración final de 10 µg/ml. La extracción se hace primeramente con una dilución de cloroformo y posteriormente se obtiene la neomicina con buffer pH 8 (# 9), y posteriormente todas las diluciones se hacen con buffer pH 8.

PREPARACION DEL ESTANDAR.

1. Se pesa el equivalente a 10 mg de estándar de neomicina y se afora a 10 ml con buffer pH 8. La solución "stock" contiene 1000 µg/ml de neomicina. La solución "stock" debe protegerse de la luz y almacenarse en refrigeración. No debe usarse después de 3 días.
2. Para cada ensayo se diluye la solución "stock" con buffer pH 8. Tomando 1 ml y llevándolo a 10 ml, esta última que contiene 100 µg/ml se toman alícuotas de 2ml, 1.5 ml, 0.1 ml, y 0.6 ml y aforar cada una a 10 ml con la solución amortiguadora de pH 8. La dilución de referencia será de 10 µg/ml.

PREPARACION DE LAS CAJAS PETRI.

1. Se preparan las cajas el mismo día de su empleo.
2. Se usan 16 cajas petri para la curva tipo y 4 para muestras.
3. Se colocan 21 ml de medio 11 para determinación de antibióticos (# 33), en cada una de las cajas.
4. Se dejan solidificar y secar con las cubiertas ligeramente levantadas.
5. Se añaden 4 ml del medio 11 para determinación de antibióticos inculado, a cada una de las cajas, y se dejan solidificar.
6. Se colocan 6 cilindros de acero inoxidable estériles sobre la superficie del medio, de cada una de las cajas.
7. Alternadamente se distribuyen las soluciones de la curva tipo así como la del problema.
8. A cada cilindro se le agregan 0.2 ml del estándar o de la solución de ensayo.
9. Se dejan incubar por 18 horas a 37° C.

LECTURAS.

Se miden las zonas de inhibición producidas. El diámetro de las zonas de inhibición indica la cantidad de antibiótico presente.

CALCULOS.

Promediar los valores de los tamaños de los halos de inhibición de cada una de las concentraciones del estándar. Se utilizan las siguientes fórmulas para calcular los Máximos y Míminos.

$$L = \frac{3a + 2b + c - e}{5}$$

Valor de los halos de inhibición para la menor concentración.

$$H = \frac{3e + 2d + c - a}{5}$$

Valor de los halos de inhibición para la mayor concentración

a, b, c, d, y e: promedio de los valores de la zona de inhibición en mm, para cada concentración, del valor más bajo (a) al valor más alto (e) respectivamente.

FORMULA.

mg/ml teóricos \longrightarrow 100%
mg/ml prácticos \longrightarrow X%

Valor teórico \longrightarrow en%
X \longrightarrow % obtenido

METODO MICROBIOLOGICO PARA LA DETERMINACION DE
MINOCICLINA

MICROORGANISMO.

Staphylococcus aureus ATCC 6538P

CONSERVACION DEL MICROORGANISMO.

1. Los cultivos de conservación ("stock") se preparan resemebrándose cada mes por estría en tubos inclinados en el medio I para la determinación de antibióticos (#21).
2. Se incuban a 37° C por 24 horas y se almacenan en refrigeración .

PREPARACION DEL INOCULO.

1. El inóculo para las determinaciones se prepara a partir de un cultivo "stock", en tubos con 20 ml de medio 3 para la determinación de antibiótico (#22). SE incuba a 37° C por 24 horas.
2. Se inocula un litro del medio 3 para la determinación de antibiótico con 20 ml del microorganismo desarrollado.
3. Se preincuba a 37° C durante 15 minutos, en baño de agua.

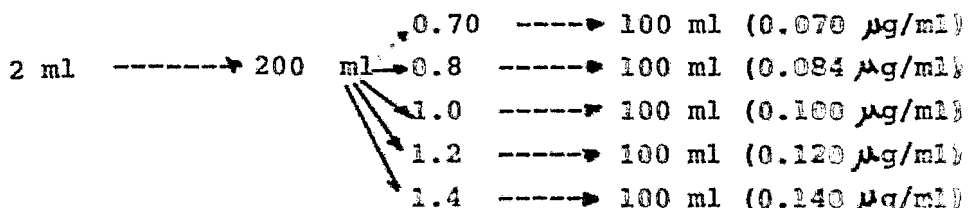
PREPARACION DE MUESTRAS.

Tabletas y polvos. La muestra se lleva a una concentración de 0.10 µg/ml. Para hacer la primera dilución se utiliza HCl 0.1 N (# 7). Las diluciones sucesivas se hacen con buffer 0.1 M pH 4.5 (# 1).

PREPARACION DEL ESTANDAR.

1. Se pesa el equivalente a 50 mg de estándar de minociclina y se aforan a 50 ml con HCl 0.1 N. La solución "stock" debe protegerse de la luz y almacenarse en refrigeración. No se debe usar después de 3 días.

2. Para cada ensayo se diluye la solución "stock" con buffer 0.1 M, tomando:



3. Se preparan 4 tubos de cada dilución del estándar, poniendo 1 ml en cada tubo, para tener 20 tubos en total.
4. De cada dilución del problema se agrega un ml a cada uno de 6 tubos de ensayo.
5. Se adicionan 9 ml de medio 3 para la determinación de antibiótico (# 22) a cada tubo inoculado con la suspensión.
6. Se tapan los tubos con algodón y gasa.
7. Se incuban a 37° C en baño de agua durante 4 horas.
8. Al terminar el tiempo de incubación se agregan 0.5 ml de formol al 12% (# 6) a cada tubo para detener el crecimiento.
9. Se prepara un blanco con un ml de la primera dilución del estándar, adicionándole 9 ml de medio 3 para la determinación de antibióticos (#22) inoculado con la suspensión. Se trata igual que los tubos del estándar y muestra.

LECTURA DEL RESULTADO.

Leer usando un filtro de 530 para el colorímetro, ajustando a 100% de transmitancia con el blanco.

CALCULOS.

Se coloca el promedio de los valores en una gráfica semilogarítmica con los valores de la absorbancia en la escala aritmética y las concentraciones en la escala logarítmica. Se interpola el promedio de los valores del problema, para determinar su concentración y se multiplica por la dilución para obtener el valor real del antibiótico. También se puede construir la línea recta por la siguiente ecuación.

$$L = \frac{3a + 2b + c - e}{5}$$

Valor de la absorbancia para la menor concentración.

$$H = \frac{3e + 2d + c - a}{5}$$

Valor de la absorbancia para la mayor concentración.

a, b, c, d, y e ; promedio de los valores de la absorbancia para cada concentración del valor más bajo (a) al valor más alto (e) respectivamente.

FORMULA

mg/ml teóricos \longrightarrow 100%

mg/ml prácticos \longrightarrow X%

Valor teórico \longrightarrow en %

X \longrightarrow % obtenido

METODO MICROBIOLOGICO PARA LA DETERMINACION DE
TETRACICLINA

MICROORGANISMO.

Staphylococcus aureus ATCC 6538P

CONSERVACION DEL MICROORGANISMO.

1. Los cultivos de conservación ("stock") se preparan resemebrándose cada mes por estría en tubos inclinados en el medio I para la de terminación de antibióticos (#21).
2. Se incuban a 37°C por 24 horas y se almacenan en refrigeración.

PREPARACION DEL INOCULO.

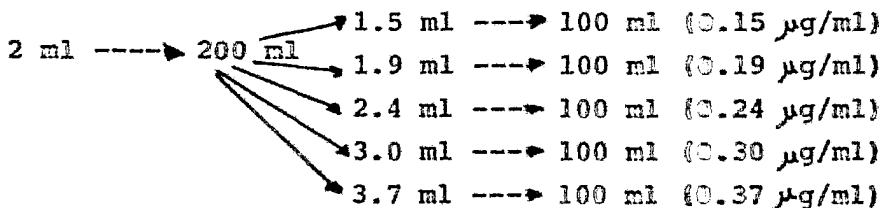
1. El inóculo para las determinaciones se prepara a partir de un cultivo "stock", en tubos con 20 ml de caldo de medio 3 para la de terminación de antibióticos (#22).
2. Se incubaba a 37°C por 24 horas.
3. Se inócula un litro del medio 3 para la determinación de anti- bióticos, con 20 ml del microorganismo desarrollado.
4. Se preincuba a 37° C durante 15 minutos, en baño de agua.

PREPARACION DE MUESTRAS.

Tabletas y polvos. La muestra se lleva a una concentración final de 0.24 μ g/ml. La primera dilución se hace con HCl 0.1 N. Las dilucio- nes sucesivas se hacen con buffer 0.1 M pH 4.5 (# 1).

PREPARACION DEL ESTANDAR.

1. Se pesa el equivalente a 50 mg de estándar de tetraciclina y se afora a 50 ml con HCl 0.1 N. La solución "stock" debe protegerse de la luz y almacenarse en refrigeración. No se debe usar después de 3 días.
2. Para cada ensayo se diluye la solución "stock" con buffer 0.1 M (# 1), tomando:



3. De cada dilución del estándar se agrega un ml a cada uno de los 4 tubos de ensayo, para tener 20 tubos en total.
4. De cada dilución del problema se agrega un ml a cada uno de los seis tubos.
5. Se adicionan 9 ml de medio 3 para la determinación de antibióticos cada tubo inoculado con la suspensión.
6. Se tapan los tubos con algodón y gasa.
7. Se incuban en baño de agua a 37°C durante 4 horas.
8. Al terminar el tiempo de incubación se agregan 0.5 ml de formal al 12% (# 6) a cada tubo, para detener el crecimiento.
9. Se prepara un blanco con un ml de la primera dilución del estándar, adicionándole 9 ml de medio 3 para la determinación de antibióticos, inoculado con la suspensión. Se trata igual que los tubos del estándar y muestra.

LECTURA DEL RESULTADO.

Se lee usando un filtro de 530, ajustando a un 100% de transmitancia con el blanco.

CALCULOS.

Se coloca el promedio de los valores en una gráfica semilogarítmica, con los valores de la absorbancia en la escala aritmética y las concentraciones en la escala logarítmica.

Se interpola el promedio de los valores del problema, para determinar su concentración y se multiplica por la dilución para obtener el valor real del antibiótico.

También se puede construir la línea recta por la siguiente ecuación

$$L = \frac{3a + 2b + c - e}{5} \quad \text{Valor de la absorbancia para la menor concentración.}$$

$$H = \frac{3e + 2d + c - a}{5} \quad \text{Valor de la absorbancia para la mayor concentración.}$$

a, b, c, d, y e: promedio de los valores de la absorbancia de cada concentración del valor más bajo (a) al valor más alto (e) respectivamente.

FORMULA

mg/ml teóricos \longrightarrow 100%
mg/ml prácticos \longrightarrow X%

Valor teórico \longrightarrow %
X \longrightarrow % obtenido

METODO PARA LA LIOFILIZACION

Una vez identificado el microorganismo y montada la técnica analítica respectiva, se procedió a propagarlo, sembrando en tubos con el medio de conservación para cada cepa e incubando a 37°C durante 24 horas. Posteriormente se verificó la pureza de la cepa mediante tinción de Gram.

Se realizó la cosecha añadiendo a cada tubo de cultivo 3 ml de leche bacteriológica estéril. Se suspendió en ella el desarrollo obtenido. Se llenaron las ampolletas (etiquetadas y esterilizadas) mediante pipetas Pasteur y se tomaron alícuotas de esta suspensión para efectuar la cuenta de gérmenes viables, realizando diluciones en solución salina hasta 10^{-12} . Se sembraron las tres últimas diluciones en placas con su medio de conservación y se incubaron a 37°C durante 24 horas.

A continuación, las ampolletas etiquetadas y llenas se colocaron en una mezcla de hielo seco y etanol para lograr una congelación rápida a -84°C. Se dejaron toda la noche en congelación en esta mezcla. Al otro día se metieron en frascos de centrifuga y se liofilizaron. Una vez liofilizadas, se colocaron en un desecador para evitar que se hidrataran.

Para cerrarlas se sellaron al vacío con soplete de gas-oxígeno. Se verificó el sellado, sumergiendo las ampolletas en solución de fenol al 5% con púrpura de bromocresol en un matraz Kitasato; se tapa el matraz y se hace vacío durante unos minutos, rompiendo el vacío bruscamente de modo que la solución colorida penetre por cualquier fisura de las ampolletas mal selladas.

Se verificó el vacío dentro de las ampolletas mediante un generador de alta frecuencia, checando si se trasmite la luz ultravioleta que éste produce en el interior de la ampolleta.

Las ampolletas aceptadas se ordenaron debidamente y se refrigeraron. Para las pruebas de control posteriores a la liofilización se rehidrataron cinco ampolletas de cada cepa con solución salina y se realizó una cuenta de gérmenes viables, una prueba de pureza en el de-

sarrollo obtenido, la serie de pruebas bioquímicas con un cultivo de 24 horas en medio de conservación y la determinación cuantitativa en la que se emplean.

Tambien se verificó la humedad obtenida después de la liofilización por el método de Karl-Fisher.

TECNICA PARA EL LAVADO DE MATERIAL UTILIZADO PARA
LA DETERMINACION DE VITAMINAS

1. Todo el material de vidrio que se emplea : Tubos de cultivos, matraces Erlenmeyer, matraces volumétricos, pipetas, deben lavarse cuidadosamente con detergente y enjuagar abundantemente.
2. Una vez limpio, se trata con HCl 3N durante toda la noche.
3. Se enjuaga después abundantemente con agua, con el objeto de eliminar toda la materia orgánica.
4. Este material se seca y se esteriliza a 200°C.

5. RESULTADOS

5.1 Resultados de la verificación de la identidad de las cepas.

A continuación se presentan los resultados de las pruebas de identidad de los microorganismos; en todos los casos se verificó la identidad de los microorganismos.



No. DE CEPA ATCC 9341	NOMBRE <u>Sarcina lutea</u>
-----------------------	-----------------------------

	UTILIZACION DE CARBOHIDRATOS	
	MEDIO BASE:	
ANTES DESPUES	ANTES DESPUES	ANTES DESPUES
FORMA <u>cocos</u>	ADONITOL	ACIDO SULFHDIRICO
TAMAÑO <u>1 m</u>	ALMIDON	INDOL
AGRUPACION <u>pares, tetradas, racimo</u>	ARABINOSA	CATALASA
TINCION DE GRAM <u>+</u>	DEXTRINA	COAGULASA
ACIDO-ALCOHOL RES <u>+</u>	DULCITOL	OXIDASA
CAPSULA	ERITRITOL	CRECIMIENTO EN KCN
ESPORAS	FRUCTOSA	CITRATO
OTRAS	GALACTOSA	SALES DE AMONIO
	GLICEROL	HIDROLISIS ALMIDON
	GLUCOSENO	HIDROLISIS ESCULINA
	GLUCOSA -	HIDROLISIS HIPURATO
MOVILIDAD	INOSITOL	HIDROLISIS GELATINA
	INULINA	HIDROLISIS UREA
	LACTOSA	REDUCCION DE NITRATOS
CARACTERISTICAS DE CULTIVO	MALTOSA	VOGES-PROSKAUER
MEDIO <u>Medio 1 para deter antibio</u>	MANITOL	ROJO DE METILO
TIEMPO <u>24 horas</u>	MANOSA	LECHE TORNASOL
TEMPERATURA <u>37°C</u>	RAFINOSA	
COLONIAS <u>lisas</u>	RAMNOSA	SUERO
FORMA <u>redondas</u>	RIBOSA	GELOSA-SANGRE
TAMAÑO <u>pequeñas</u>	SACAROSA	
SUPERFICIE <u>lisa</u>	SALICINA	OTRAS:
COLOR <u>amarillo</u>	SORBITOL	
PIGMENTO <u>amarillo</u>	SORBOSA	
CONSISTENCIA	TREHALOSA	
OPACIDAD	XILOSA -	
OTRAS	OTROS:	
PRODUCTOS DE BIOSINTESIS		
NOMBRE		
SUSTRATO		
CONDICIONES		
RENDIMIENTO		
OTROS DATOS		SEROLOGICAS



No. DE CEPA ATCC 11778

NOMBRE Bacillus cereus

UTILIZACION DE CARBOHIDRATOS
MEDIC BASE:

ANTES DESPUES		ANTES DESPUES	ANTES DESPUES
FORMA <u>Bacilos</u>	✓	ADONITOL	ACIDO SULFHDIRICO
TAMANO <u>1.2 m</u>	✓	ALMIDON	INDOL
AGRUPACION <u>aislados 6 cadenas</u>		ARABINOSA	CATALASA + +
TINCION DE GRAM <u>+</u>	+	DEXTRINA	COAGULASA
ACIDO-ALCOHOL RES		DULCITOL	OXIDASA
CAPSULA		ERITRITOL	CRECIMIENTO EN KCN
ESPORAS		FRUCTOSA	CITRATO
OTRAS		GALACTOSA	SALES DE AMONIO
MOVILIDAD <u>+d</u>	+d	GLICEROL	HIDROLISIS ALMIDON
CARACTERISTICAS DE CULTIVO		GLUCOGENO	HIDROLISIS ESCULINA
MEDIO: <u>Medio 1 para detrr. antibió.</u>		GLUCOSA	HIDROLISIS HIPURATO
TIEMPO <u>24 horas</u>		INOSITOL	HIDROLISIS GELATINA
TEMPERATURA <u>37°C</u>		INULINA	HIDROLISIS UREA
COLONIAS <u>lisas irregulares</u>		LACTOSA	REDUCCION DE NITRATOS + +
FORMA <u>irregulares</u>		MALTOSA	VOGES-PROSKAUER
TAMANO <u>grandes</u>		MANITOL	ROJO DE METILO
SUPERFICIE <u>rugosa</u>		HANOSA	LECHE TORNASOL
COLOR <u>blancas</u>		RAFINOSA	SUERO
PIGMENTO <u>blancas</u>		RANNOSA	GELOSA-SANGRE
CONSISTENCIA		RIBOSA	
OPACIDAD		SACAROSA	OTRAS:
OTRAS		SALICINA	Crecimiento anaerobicos +
PRODUCTOS DE BIOSINTESIS		SORBITOL	Creec. en 7.6% NaCl +
NOMBRE		SORBOSA	Caldo dextrosa-sabouroud +
SUSTRATO		TREHALOSA	
CONDICIONES		XILOSA	
RENDIMIENTO		OTROS:	
OTROS DATOS		Alanina	SEROLOGICAS



No. DE CEPA ATCC 6538 P NOMBRE Staphylococcus aureus

UTILIZACION DE CARBOHIDRATOS
MEDIO BASE:

ANTES DESPUES		ANTES DESPUES		ANTES DESPUES	
FORMA	cocos ✓	ADONITOL		ACIDO SULFIDRICO	
TAMANO	1 m ✓	ALMIDON		INDGL	
AGRUPACION	aislados 6 cadenas	ARABINOSA	+	CATALASA	+
TINCION DE GRAM	+	DEXTRINA		COAGULASA	
ACIDO-ALCOHOL RES.		DULCITOL		OXIDASA	
CAPSULA		ERITRITOL		CRECIMIENTO EN KCN	
ESPORAS		FRUCTOSA		CITRATO	
OTRAS		GALACTOSA		SALES DE AMONIO	
		GLICEROL	+	HIDROLISIS ALMIDON	-
		GLUCOGENO		HIDROLISIS ESCULINA	
		GLUCOSA	+	HIDROLISIS HIPURATO	
		INOSITOL	-	HIDROLISIS GELATINA	-
		INULINA	-	HIDROLISIS UREA	
		LACTOSA	+	REDUCCION DE NITRATOS	+
		MALTOSA	+	VOGES-PROSKAUER	
		MANITOL	+	ROJO DE METILO	
		MANOSA		LECHE TORNASOL	
		RAFINOSA	+		
		RAMNOSA	-		
		RIBOSA		SUERO	
		SACAROSA	+	GELOSA-SANGRE	
		SALICINA	+		
		SORBITOL		OTRAS:	
		SORBOSA		Caseina	+
		TREHALOSA			
		XILOSA	-		
		OTROS:			
		Celobiosa	-		
CARACTERISTICAS DE CULTIVO					
MEDIO: Medio 1 para deter. antibio					
TIEMPO	24 horas				
TEMPERATURA	37°C				
COLONIAS	lisas				
FORMA	circulares				
TAMANO	pequeñas				
SUPERFICIE	lisa				
COLOR	dorado				
PIGMENTO	dorado				
CONSISTENCIA					
OPACIDAD					
OTRAS					
PRODUCTOS DE BIOSINTESIS					
NOMBRE					
SUSTRATO					
CONDICIONES					
RENDIMIENTO					
OTROS DATOS					
				SEROLOGICAS	

No. DE CEPA ATCC 3352NOMBRE Staphylococcus aureus

UTILIZACION DE CARBOHIDRATOS

MEDIO BASE:

ANTES DESPUES		ANTES DESPUES		ANTES DESPUES	
FORMA <u>cocos</u>	<u>✓</u>	ADONITOL		ACIDO SULFHDRIICO	
TAMARO <u>1 m</u>		ALMIDON		INDOL	
AGRUPACION <u>aislados o cadenas</u>		ARABINOSA	<u>+</u>	CATALASA	<u>+</u>
TINCION DE GRAM <u>+</u>	<u>+</u>	DEXTRINA		COAGULASA	
ACIDO-ALCOHOL RES		DULCITOL		OXIDASA	
CAPSULA		ERITRITOL		CRECIMIENTO EN KCN	
ESPORAS		FRUCTOSA		CITRATO	
OTRAS		GALACTOSA		SALES DE AMONIO	
		GLICEROL	<u>+</u>	HIDROLISIS ALMIDON	<u>-</u>
		GLUCOGENO		HIDROLISIS ESCULINA	
MOVILIDAD <u>-</u>	<u>-</u>	GLUCOSA	<u>+</u>	HIDROLISIS HIPURATO	
		INOSITOL	<u>-</u>	HIDROLISIS GELATINA	<u>-</u>
		MULINA	<u>-</u>	HIDROLISIS UREA	
CARACTERISTICAS DE CULTIVO		LACTOSA	<u>+</u>	REDUCCION DE NITRATOS	<u>+</u>
MEDIO: <u>Medio I para deter. antibi</u>		MALTOSA	<u>+</u>	VOGES-PROSKAUER	
TIEMPO <u>24 horas</u>		MANITOL	<u>+</u>	ROJO DE METILO	
TEMPERATURA <u>37°C</u>		MANOSA		LECHE TORNASOL	<u>+</u>
COLONIAS <u>lisas</u>		RAFINOSA	<u>+</u>	SUERO	
FORMA <u>circulares</u>		RAMNOSA	<u>-</u>	GELOSA-SANGRE	
TAMARO <u>pequeñas</u>		RIBOSA			
SUPERFICIE <u>lisa</u>		SACAROSA	<u>+</u>		
COLOR <u>dorado</u>		SALICINA	<u>+</u>	OTRAS:	
PIGMENTO <u>dorado</u>		SORBITOL		<u>Cesefna</u>	<u>+</u>
CONSISTENCIA		SORBOSA			
OPACIDAD		TREHALOSA			
OTRAS		XILOSA	<u>-</u>		
		OTROS:			
		<u>Celobiosa</u>	<u>-</u>		
PRODUCTOS DE BIOSINTESIS					
NOMBRE					
SUSTRATO					
CONDICIONES					
RENDIMIENTO					
OTROS DATOS				SEROLGICAS	

UTILIZACION DE CARBOHIDRATOS		MEDIO BASE:	
ANTES	DESPUES	ANTES	DESPUES
FORMA <u>cocos</u>	<input checked="" type="checkbox"/>	ACIDO SULFIDRICO	
TAMARO <u>1 m</u>	<input checked="" type="checkbox"/>	INDOL	
AGRUPACION <u>pares 6 esdenas</u>		CATALASA	
TINClON DE GRAM		COAGULASA	
ACIDO-ALCOHOL RES		OXIDASA	
CAPSULA		CRECIMIENTO EN KCN	
ESPORAS		CITRATO	
OTRAS		SALES DE AMONIO	
		HIDROLISIS ALMIDON	
		HIDROLISIS ESCULINA	
		HIDROLISIS HIPURATO	
		HIDROLISIS GELATINA	
		HIDROLISIS UREA	
		REDUCCION DE NITRATOS	
		VOGES-PROSKAUER	
		ROJO DE METILO	
		LECHE TERNASOL	
		SUERO	
		GELOSA-SANGRE	
		OTRAS:	
CARACTERISTICAS DE CULTIVO			
MEDIO: <u>Agar micro-inoculo</u>			
TIEMPO <u>24 horas</u>			
TEMPERATURA <u>37°C</u>			
COLONIAS <u>lisas</u>			
FORMA <u>irregulares</u>			
TAMARO			
SUPERFICIE <u>lisa</u>			
COLOR <u>incoloras</u>			
PIGMENTO <u>sin pigmentación</u>			
CONSISTENCIA			
OPACIDAD			
OTRAS			
PRODUCTOS DE BIOSINTESIS			
NOMBRE			
SUSTRATO			
CONDICIONES			
RENDIMIENTO			
OTROS DATOS			

5.2 Resultados de la liofilización.

Una vez verificada su identidad, como se reporta en la primera parte de este capítulo, las cepas fueron liofilizadas.

Después de la liofilización se determinó la humedad residual en las ampollitas, la cual se muestra en la siguiente tabla.

HUMEDAD RESIDUAL EN AMPOLLETAS.

(Determinada por el método de Karl-Fisher) .

MICROORGANISMOS		
<u>S. faecalis</u>	<u>L. plantarum</u>	<u>L. leichmannii</u>
1%	1.29%	3.23%
<u>L. mesenteroides</u>	<u>B. cereus</u>	<u>S. aureus</u> ATCC 3352
1.46%	1.0%	1.25%
<u>S. lutea</u>	<u>S. aureus</u> ATCC 6538P	<u>S. epidermidis</u>
1.0%	1.2%	1.7%

La viabilidad fue determinada antes y después de la liofilización, obteniéndose en ambos casos, colonias incontables hasta la dilución de 10^{-12} . El sellado y el vacío de las ampollitas fueron satisfactorios en todos los casos.

5.3 Resultados de la aplicación de las técnicas microbiológicas cuantitativas.

1. Determinación Microbiológica

de Eritromicina

Valores del estándar Conc. del estándar	Lecturas de halos de inhibición	Promedio
($\mu\text{g/ml}$)	(mm)	
1.28	1) 16, 16, 15	15.92 (a)
	1) 16, 16, 16	
	1) 15, 16, 16	
	1) 16, 16, 17	
1.6	2) 19, 18, 18	18 (b)
	2) 18, 18, 18	
	2) 17, 18, 17	
	2) 19, 18, 18	
	3) 19, 19, 19	
	3) 20, 20, 19	
	3) 18, 19, 18	
	3) 19, 19, 19	
	3) 20, 20, 20	
	3) 19, 20, 19	
	3) 19, 19, 19	
	3) 19, 19, 19	
	3) 19, 19, 19	
	3) 18, 18, 18	
	3) 19, 19, 19	
	3) 20, 20, 20	
	3) 19, 19, 19	
	3) 20, 20, 19	
3) 18, 17, 19		

2.0	3) 19, 19, 19	19.02 (c)
	3) 18, 18, 19	
	3) 19, 19, 19	
	3) 19, 19, 19	
2.5	4) 22, 22, 22	22.8 (d)
	4) 22, 22, 22	
	4) 22, 23, 22	
	4) 21, 23, 22	
3.1	5) 23, 23, 24	23.17 (c)
	5) 24, 24, 23	
	5) 22, 23, 23	
	5) 23, 23, 23	

MUESTRA:

2.0	M) 20, 20, 20	MUESTRA
	M) 20, 20, 20	
	M) 20, 21, 20	
	M) 21, 20, 21	

20.25

$$L = \frac{3 (15.92) + 2 (18) + 19.02 - 23.17}{5}$$

$$L = 15.92 \text{ mm.}$$

$$H = \frac{3 (23.17) + 2 (22.8) + 19.02 - 15.92}{5}$$

$$H = 23.642 \text{ mm.}$$

Muestra estoloato de eritromicina (materia prima).
Se trato como se mencionó en el método de determi-
nación de eritromicina.

CALCULOS:

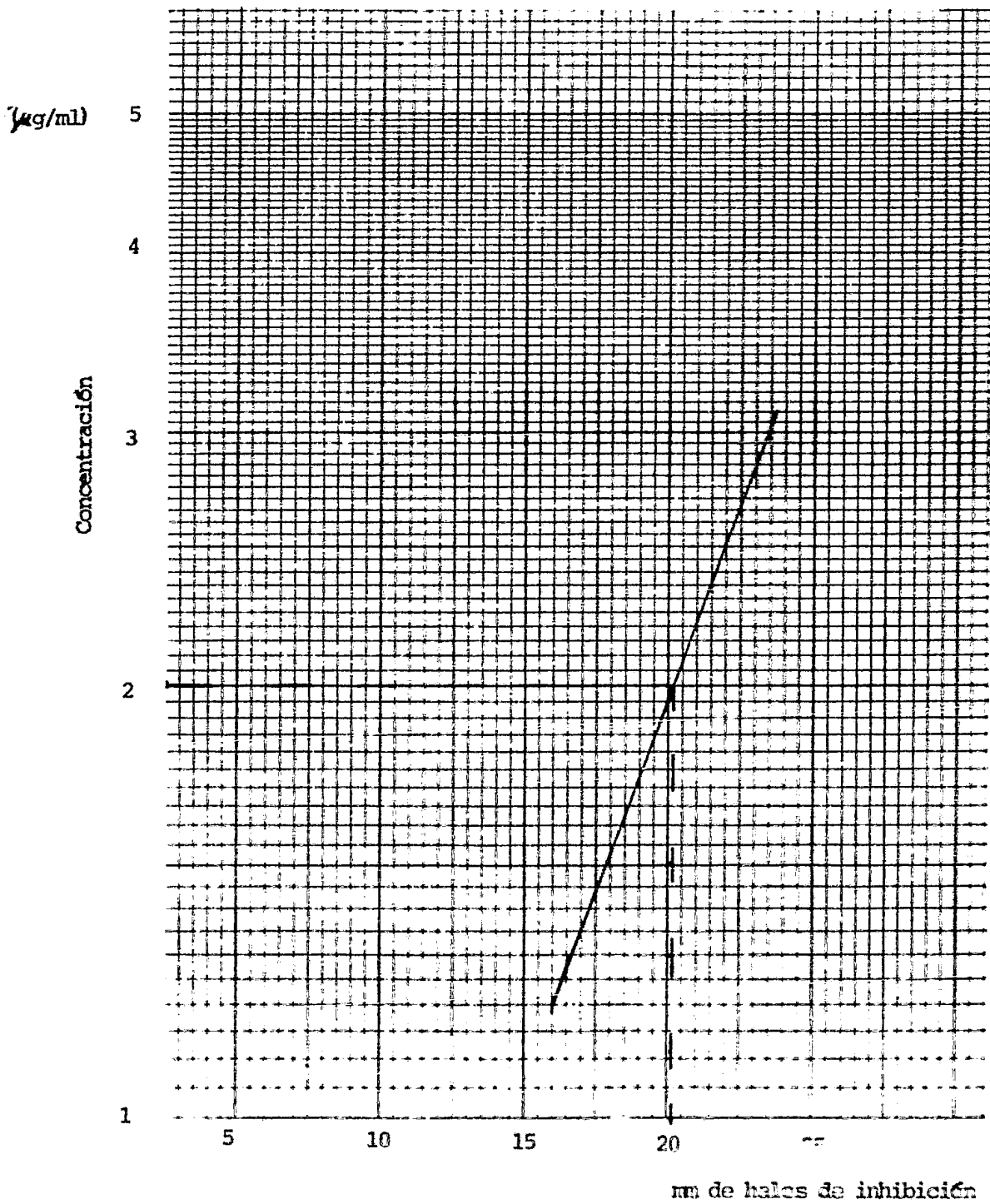
$$\frac{2 \mu\text{g/ml} \times 100\%}{2 \mu\text{g/ml}} = 100\%$$

Valor teórico 658 $\mu\text{g/ml}$ \longrightarrow 100%

RESULTADO:

658 $\mu\text{g/ml}$ \longrightarrow 100%

CURVA ESTANDAR DE ERITROMICINA



2. Determinación Microbiológica
de vitamina B₁₂

CONC (µg/ml)	0.0	0.02	0.04	0.06	0.08	0.10	0.12	0.14	0.16	0.18
% T	85	83	79	77	75	74	73	72	71	70
STD	85	83	79	77	75	74	73	72	71	70
PROMEDIO	85	83	79	77	75	74	73	72	71	70

Muestra Problema:

M.L.	%T	µg/T	µg/ml	%T	µg/T	µg/ml
1.0	78	0.05	0.05	78	0.05	0.05
2.0	74	0.10	0.050	74	0.10	0.050
2.5	72	0.14	0.056	73	0.12	0.048
3	71	0.16	0.053	71	0.16	0.053
4	69	0.20	0.05	69	0.20	0.05
P R O M E D I O			0.0518	P R O M E D I O		0.0502
PRCMEDIO = 0.0510 µg/ml.						

Determinación de Vitamina B₁₂

Muestra Problema: Autrin 600

1 Tab = 1.33 g = 25%

1.33g — 250ml → 0.177/ml
 4.0ml
 0.4 — 100ml → 0.00477/ml
 10ml
 0.04 — 1000ml → 0.0000477/ml = 0.04 μg/ml.

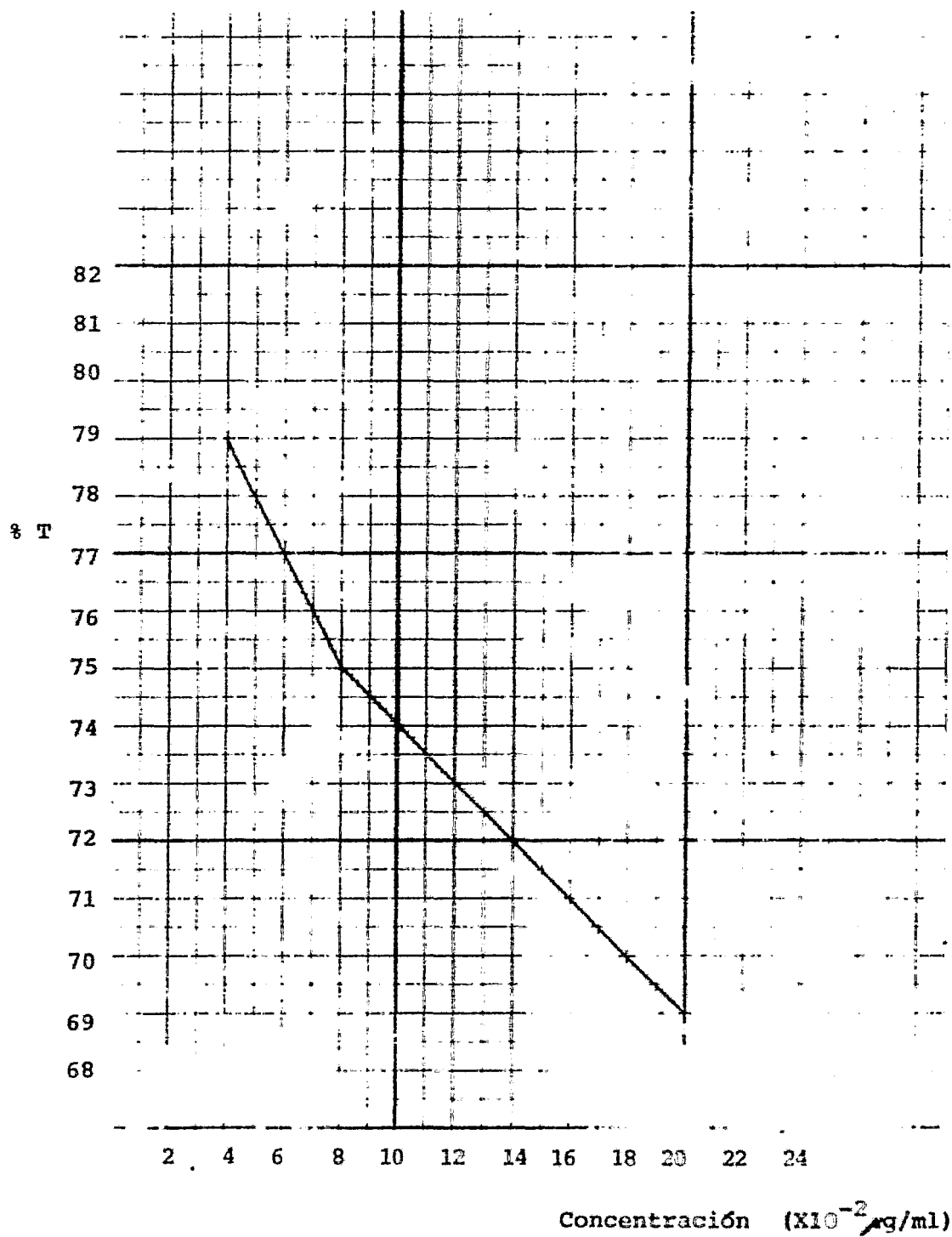
CALCULOS:

$$\frac{0.0510 \mu\text{g/ml} \times 100\%}{0.04 \mu\text{g/ml}} = 127.5\%$$

VALOR TEORICO: 25 mg/ml → 100%

RESULTADO: 31.87 mg/ml → 127.5%

CURVA ESTANDAR DE VITAMINA B₁₂



3. Determinación Microbiológica
de Pantotenato de Calcio

CONC ($\mu\text{g/ml}$)	0.0	0.01	0.02	0.04	0.06	0.08	0.10	0.12	0.15	0.20
% T	85	83	81	78	74	70	66	63	59	54
STD	85	83	81	77	74	70	65	63	60	54
Promedio	85	83	81	77.5	74	70	65.6	63	59.5	54

Muestra Problema:

ML	%T	$\mu\text{g/T}$	$\mu\text{g/ml}$	%T	$\mu\text{g/T}$	$\mu\text{g/ml}$
0.2	80	0.026	0.13	80	0.026	0.13
0.5	74	0.060	0.12	74	0.060	0.12
1.0	63	0.120	0.12	63	0.120	0.12
1.5	56	0.180	0.12	56	0.180	0.12
2.0	54	0.200	0.10	54	0.200	0.10
Promedio			0.118	Promedio		0.118
Promedio = 0.118						

Muestra Problema utilizada fue Stress-Tabs 600

$$1 \text{ Tab} = 1.096\text{g} = 20 \text{ mg} = 100\%$$

$$2 \text{ Tab} = 2.192\text{g} = 40 \text{ mg}$$

$$\begin{array}{l}
 40 \text{ mg} - 500 \text{ ml} \longrightarrow 0.08 \text{ mg/ml} \\
 \quad \quad \quad \swarrow \\
 \quad \quad \quad 10 \text{ ml} \longrightarrow \\
 0.8 \text{ mg/ml} - 200 \text{ ml} \longrightarrow 0.004 \text{ mg/ml} \\
 \quad \quad \quad \swarrow \\
 \quad \quad \quad 5 \text{ ml} \longrightarrow \\
 0.02 \text{ mg/ml} - 200 \text{ ml} \longrightarrow 0.0001 \text{ mg/ml} = 0.1 \text{ } \mu\text{g/ml}
 \end{array}$$

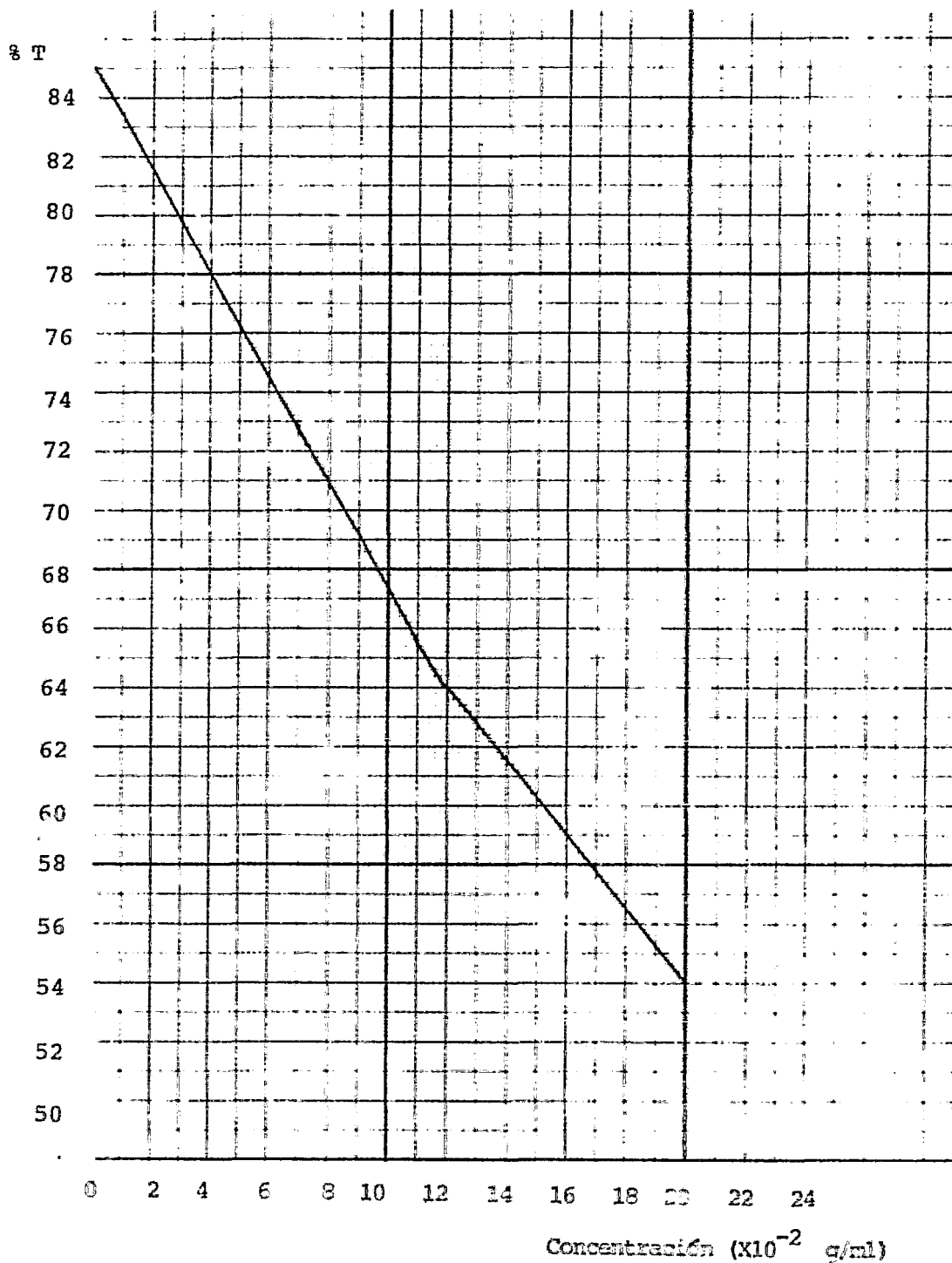
CALCULOS:

$$\frac{0.118 \mu\text{g/ml} \times 100\%}{0.10 \mu\text{g/ml}} = 118\%$$

VALOR TEORICO 24 mg/ml → 118%

RESULTADO. 24 mg/ml → 118%

CURVA ESTANDAR DE PANTOTENATO DE CALCIO



4. Determinación Microbiológica
de Vitamina B₁₂
(Difusión)

Valores del estándar Conc. del estándar (ng/ml)	Lectura de halos de crecimiento (mm)	Promedio
50	1) 15, 15, 15 1) 16, 16, 15 1) 16, 15, 16 1) 16, 15, 16	15.5 (a)
100	2) 18, 18, 18 2) 19, 17, 18 2) 18, 18, 18 2) 18, 18, 18	18 (b)
200	3) 19, 20, 20 3) 20, 20, 20 3) 20, 20, 20 3) 20, 20, 20	19.9 (c)
500	4) 21, 21, 21 4) 22, 22, 22 4) 22, 22, 22 4) 21, 22, 21	21.5 (a)
1000	5) 23, 24, 24 5) 24, 24, 24 5) 25, 24, 24 5) 24, 24, 24	24.0 (e)

MUESTRA

200 ng/ml

M) 19, 19, 19
 M) 20, 19, 19
 M) 19, 20, 19
 M) 19, 20, 19

MUESTRA

19.25

Muestra problema; Autrín 600

1 Tab = 1.33 g = 25
 4 Tab = 5.32 g = 100

4 tab = 100 100 ml aforo 1 /ml = 1000 ng/ml

1000 ng/ml

2 ml 10 ml 200 ng/ml

$$L = \frac{3 (15.5) + 2(18) + 19.6 - 24}{5} = 15.62 \text{ mm}$$

$$H = \frac{3 (24) + 2 (21,5) + 19.6 - 15.5}{5} = 23.8 \text{ mm}$$

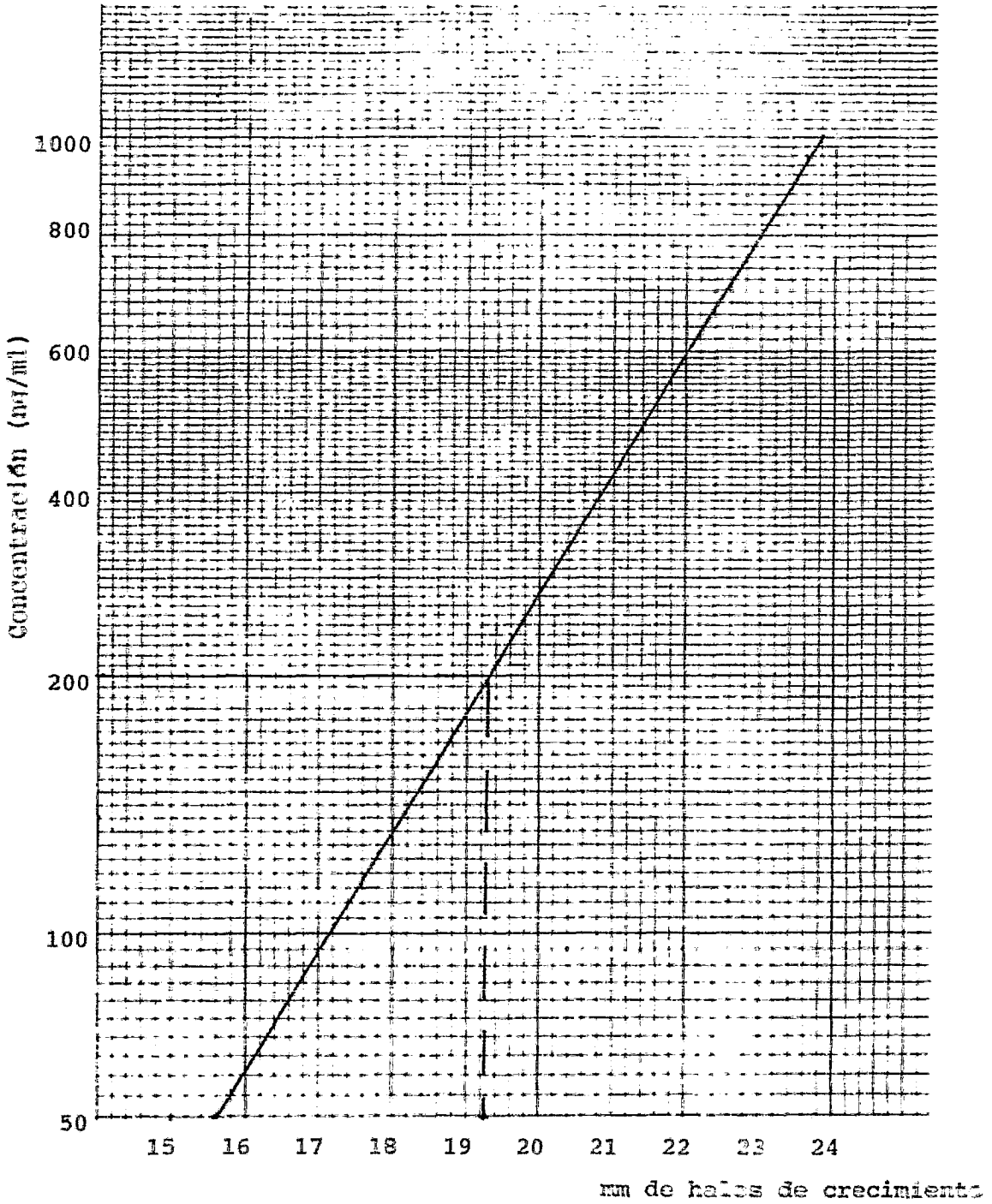
CALCULOS

$$\frac{200 \text{ ng/ml} \quad X \quad 100\%}{200 \text{ ng/ml}} = 100\%$$

VALORES TEORICOS. 25 mg/ml → 100%

RESULTADO. 25 mg/ml → 100%

CURVA ESTANDAR DE VITAMINA B₁₂
(Difusión)



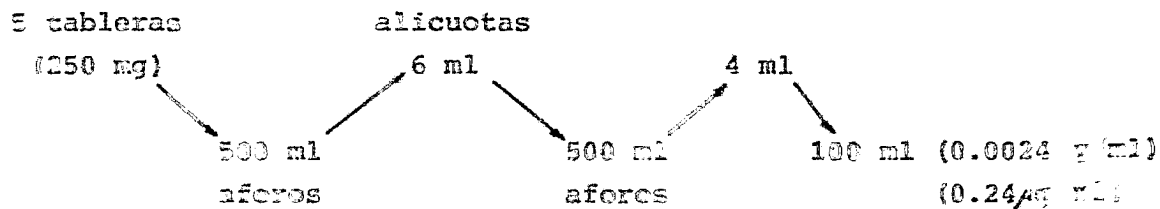
5. Determinación Microbiológica
de Tetraciclina

$\mu\text{g/ml}$	0.154		0.192		0.240		0.300		0.375	
Standar	70	70	71	73	74	74	76	77	78	79
% T	70	70	72	72	74	74	75	76	79	79
Promedio	70		72		74		76		78.75	
	a		b		c		d		e	

Producto	% Transmisión			Prom.	$\mu\text{g/ml}$
acromicina 50 mg	73	74	73	73.5	0.23
	74	73	74		

Muestra Utilizada: Acromicina 50 mg.

Potencia 1 Tab. = 50 mg



$$L = \frac{3(70) + 2(72) + 74 - 73.75}{5} = 69.83 \text{ mm}$$

$$H = \frac{3(78.75) + 2(75) + 74 - 70}{5} = 78.59 \text{ mm}$$

CALCULOS:

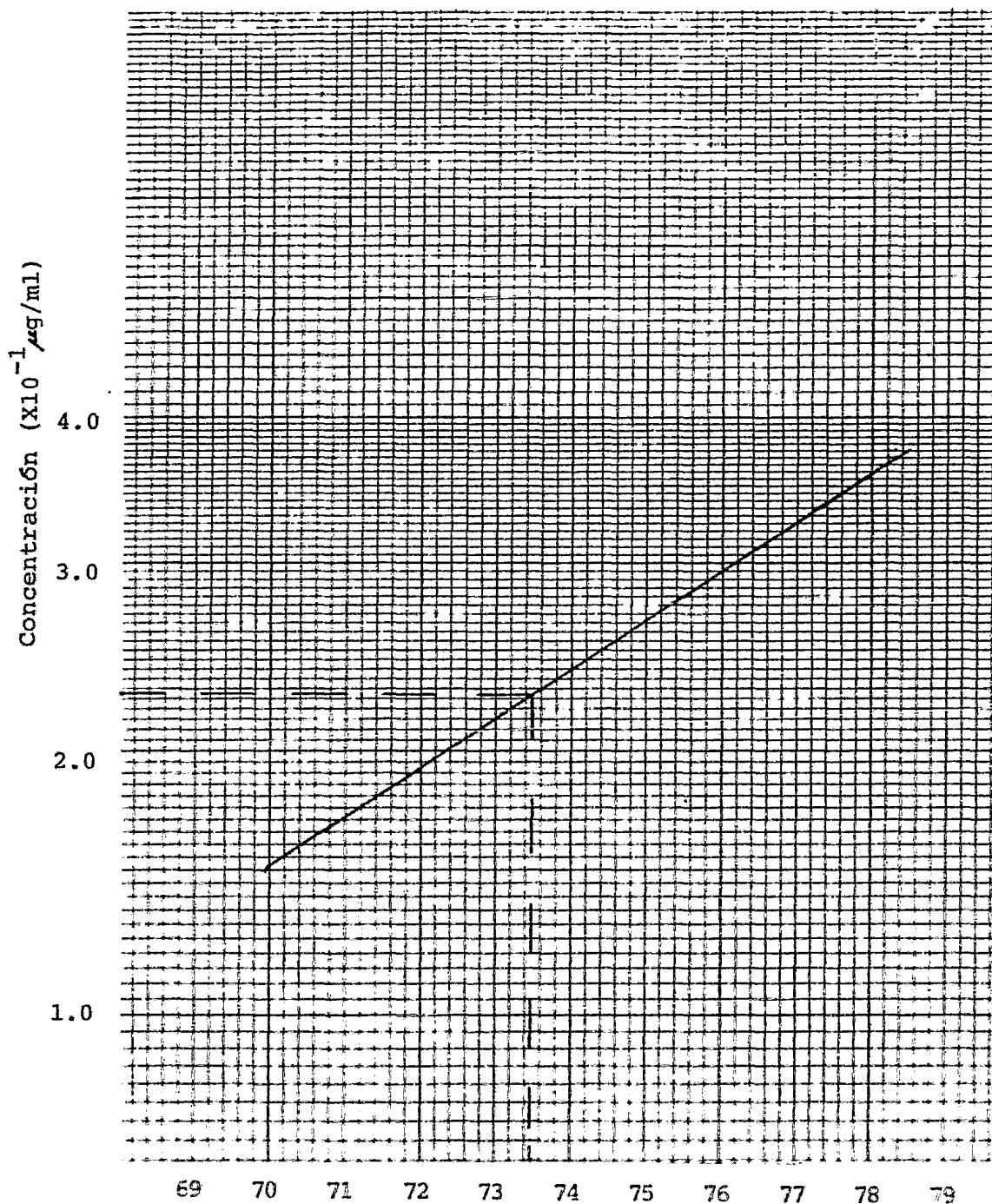
$$\frac{0.23 \mu\text{g/ml}}{0.24 \mu\text{g/ml}} \times \frac{100\%}{1} = 95.83\%$$

VALOR TEORICO:

$$45 \text{ mg/t} \longrightarrow 90\%$$

RESULTADO: $47.9 \text{ mg/t} \longrightarrow 95.83\%$

CURVA ESTANDAR DE TETRACICLINA
(Turbidimétrico)



8 T

6. Determinación Microbiológica
de Minociclina

$\mu\text{g/ml}$	0.070		0.084		0.100		0.120		0.143	
% T	70	70	71	72	73	73	75	76	77	77
	70	70	71	71	73	73	75	75	78	79
Promedio	70		71.25		73		75.25		77.75	
	a		b		c		d		e	

Producto	% Trasmisión				Prom.	$\mu\text{g/ml}$
Minocin 100mg	73	73	73	73	73	0.096
	74	73	72	73		

Muestra Utilizada: Minocin 100mg.

Potencia 1 tab = 100mg

5 tabletas

500 mg

1 ml

10 ml

500 ml

500 ml

200 ml

(0.0001 g/ml)

(0.1 $\mu\text{g/ml}$)

$$L = \frac{3(70) + 2(71.25) + 73 - 77.75}{5} = 69.55 \text{ mm}$$

$$H = \frac{3(77.75) + 2(75.25) + 73 - 70}{5} = 77.35 \text{ mm}$$

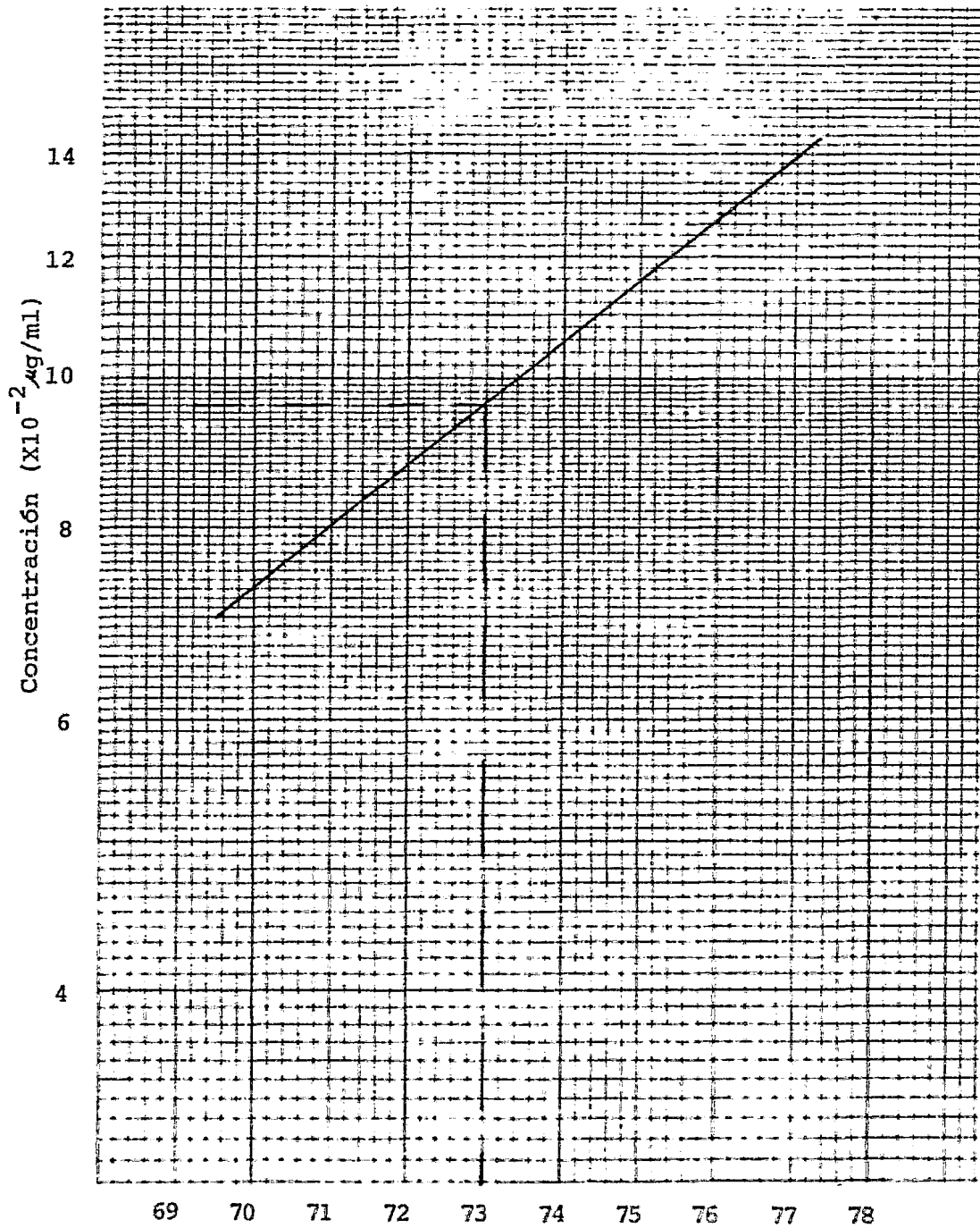
CALCULOS:

$$\frac{0.096 \mu\text{g/ml}}{0.1 \mu\text{g/ml}} \times 100\% = 96\%$$

VALOR TEORICO: 90 mg/tb \longrightarrow 90%

RESULTADO: 96 mg/tb \longrightarrow 96%

CURVA ESTANDAR DE MINOCICLINA
(Turbidimétrico)



§ T

7. Determinación de Clortetraciclina

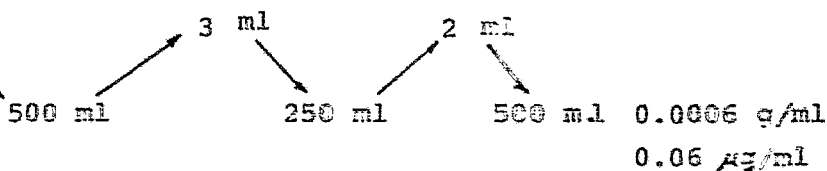
$\mu\text{g/ml}$	0.038		0.048		0.060		0.075		0.094	
% T.	73	71	75	77	83	81	85	85	88	89
	72	72	75	75	80	80	84	84	88	91
Promedio	72		75.7		81		84.5		89	

a b c d e

Producto	% Transmisión			Prom.	$\mu\text{g/ml}$
aureomicina	80	84	81	81.5	0.063
trociscos	81	81	82		

Muestra Problema: Aureomicina 250 mg

5 tabletas
(1250 mg)



$$L = \frac{3(72) + 2(75.7) + 81 - 89}{5} = 71.88 \text{ mm}$$

$$H = \frac{3(89) + 2(84.5) + 81 - 72}{5} = 89 \text{ mm}$$

CALCULOS:

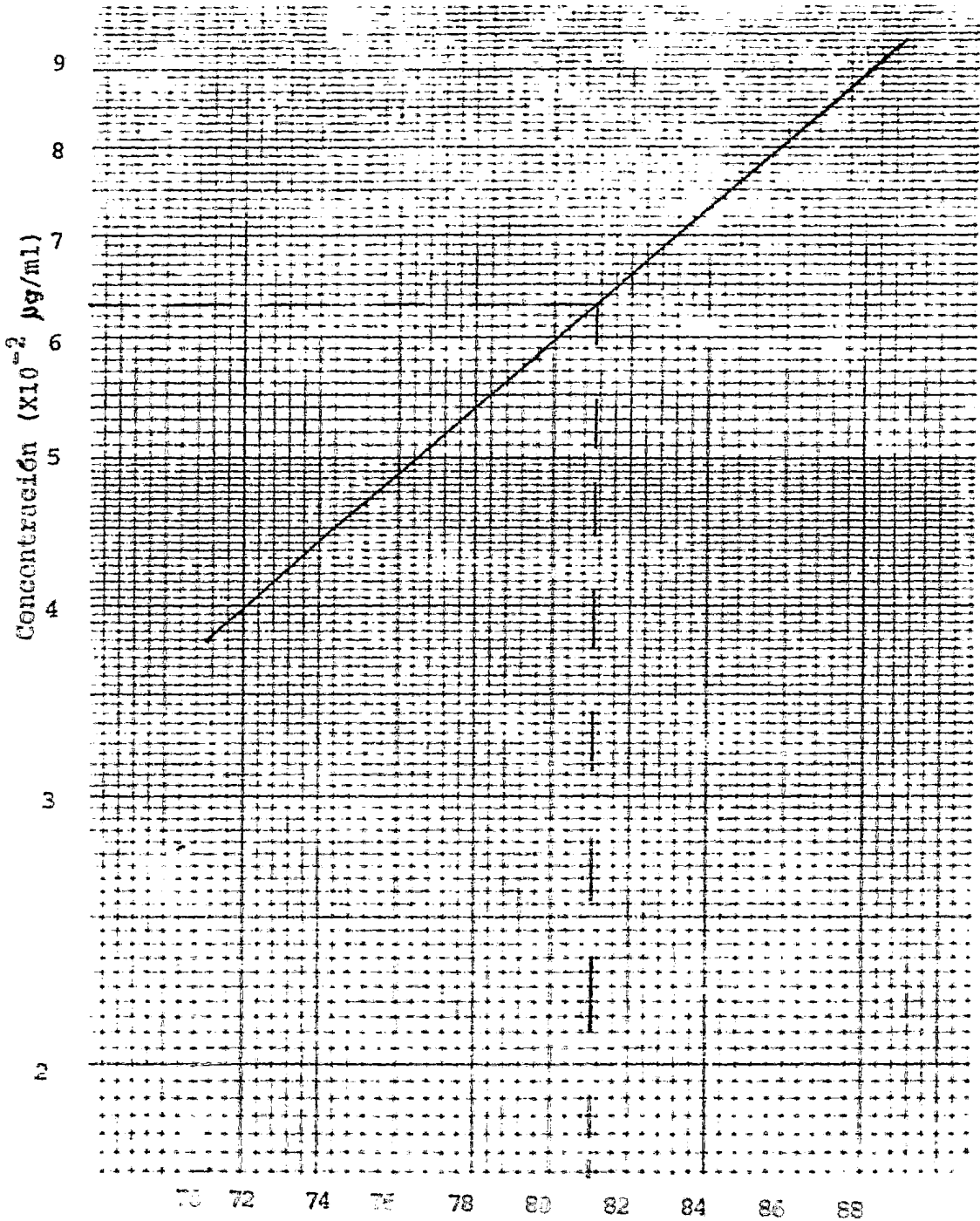
$$\frac{0.063 \mu\text{g/ml} \times 100\%}{0.06 \mu\text{g/ml}} = 105\%$$

VALOR TEORICO:

$$213 \text{ mg/tb} \longrightarrow 85\%$$

$$\text{RESULTADOS} \quad 263 \text{ mg/tb} \longrightarrow 105\%$$

CURVA ESTANDAR DE CLORTETRACICLINA



8. Determinación de Acido Fólico

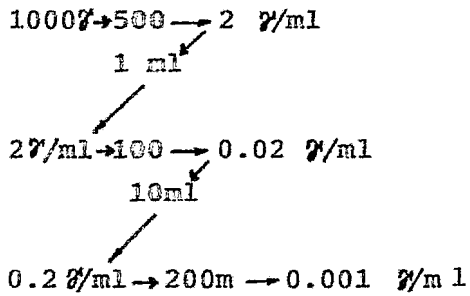
μl	0.00	0.0005	0.0010	0.0015	0.0020	0.0025	0.0030	0.0035	0.0040	0.0045
ans.	89	84	81	78	76	73	70	68	64	62
	89	84	81	78	76	73	70	68	64	62
edio	89	84	81	78	76	73	70	68	64	62

% T	μg/T	μg/ml	% T	μg/T	μg/ml
78	0.0015	0.0015	78	0.0015	0.0015
73	0.0025	0.00125	76	0.0020	0.001
70	0.0030	0.0012	70	0.0030	0.0012
64	0.0040	0.0013	64	0.0040	0.0013
62	0.0045	0.00112	64	0.0040	0.0010
Promedio		0.00127			0.00120
Promedio 0.001237 μg/ml					

Muestra Problema Autrín 600

Valor Teórico

1 Tab. = 1.33gr = 1mg = 1000 μ g 1.00 mg/tb = 100%



CALCULOS:

$$\frac{0.001237 \mu\text{g/ml} \times 100\%}{0.0010 \mu\text{g/ml}} = 123.7\%$$

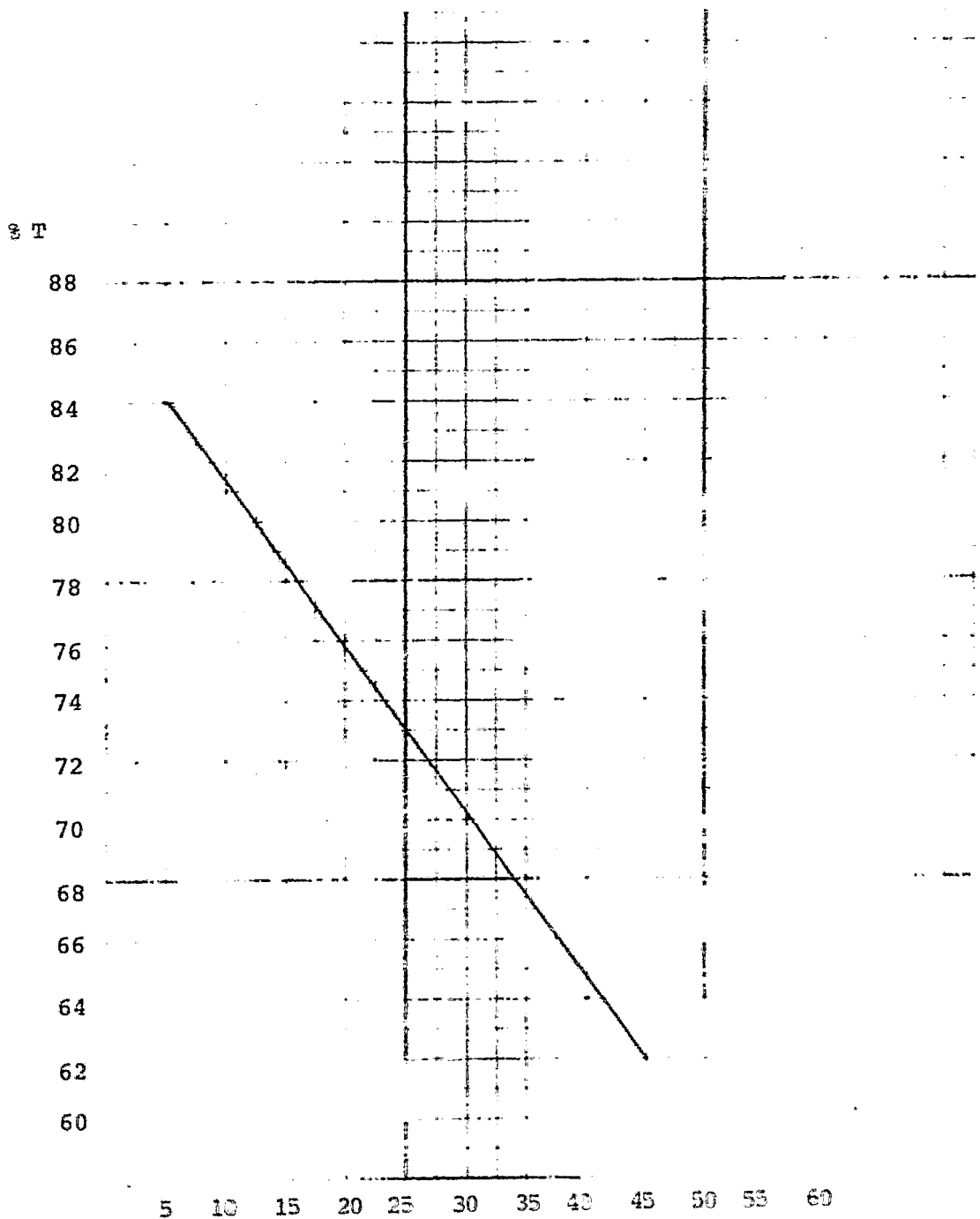
VALOR TEORICO:

$$1.0 \text{ mg/tb} \rightarrow 100\%$$

RESULTADO

$$1.23 \text{ mg/tb} \rightarrow 123.7\%$$

CURVA ESTANDAR DE ACIDO FOLICO



Concentración ($\times 10^{-2}$ g/ml)

9. Determinación de L - Lisina

$\mu\text{g/ml}$	0.00	0.03	0.06	0.09	0.12	0.15	0.18	0.21	0.24	0.27
% T	90	86	82	76	72	66	62	58	52	47
	90	86	82	76	72	66	62	58	-	47
Promedio	90	86	82	76	72	66	62	58	-	47

ml	%T	$\mu\text{g/T}$	$\mu\text{g/ml}$	%T	$\mu\text{g/T}$	$\mu\text{g/ml}$
1.0	82	0.06	0.06	82	0.06	0.06
2.0	72	0.12	0.06	72	0.12	0.06
2.5	66	0.15	0.06	65	0.16	0.064
3.0	62	0.18	0.06	62	0.18	0.06
4.0	47	0.27	0.0675	50	0.26	0.065
Promedio			0.0615	Promedio		0.0618
Promedio = 0.06165 $\mu\text{g/ml}$						

Muestra Problema:

Geural polvo para cápsula

1 cápsula = 75 mg de L - lisina

2.7075 g → 100 ml → 0.75 mg/ml

8 ml

0.6 mg/ml → 100 ml → 0.06 mg/ml = 60 μg/ml

CALCULOS.

$$\frac{0.06165 \mu\text{g/ml}}{0.06 \mu\text{g/ml}} \times 100\% = 102.75\%$$

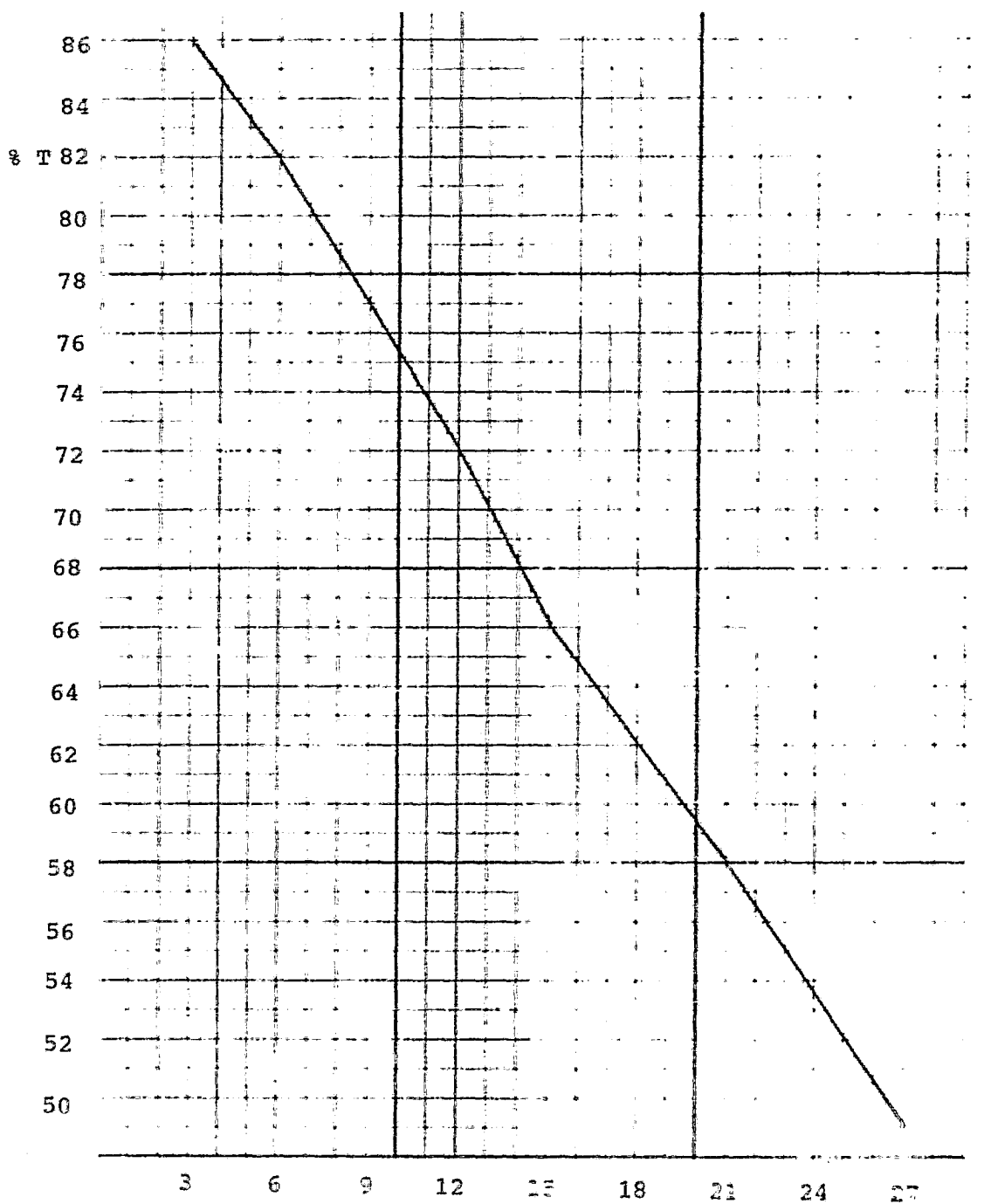
VALOR TEORICO.

24 mg/g → 90%

RESULTADO.

27.4 mg/g → 102.75%

CURVA ESTANDAR DE L- LISINA



Concentración (X10⁻² μg/ml)

10. Determinación de Acido Nicotínico

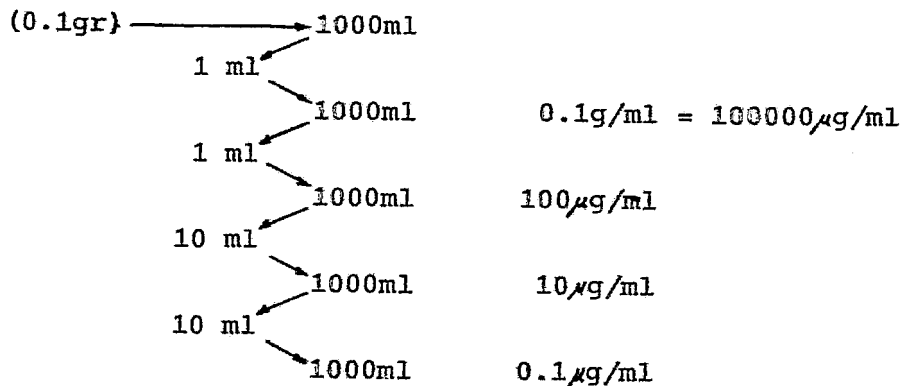
g/ml	0.0	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
%T	86	81	77	72	67	64	60
	86	81	78	72	67	74	61
Promedio	86	81	77.5	72	67	64	60.5

ml	%T	$\mu\text{g}/\text{T}$	$\mu\text{g}/\text{ml}$	%T	$\mu\text{g}/\text{T}$	$\mu\text{g}/\text{ml}$
1.0	77	0.1	0.1	76	0.13	0.13
2.0	72	0.2	0.1	72	0.2	0.1
3	67	0.3	0.1	66	0.32	0.106
5	61	0.5	0.1	61	0.5	0.1
Promedio			0.1	Promedio		0.109
Promedio = 0.1045						

Muestra Problema: Prenicap

1.- Tab. 20 mg de ácido nicotónico

5 grageas



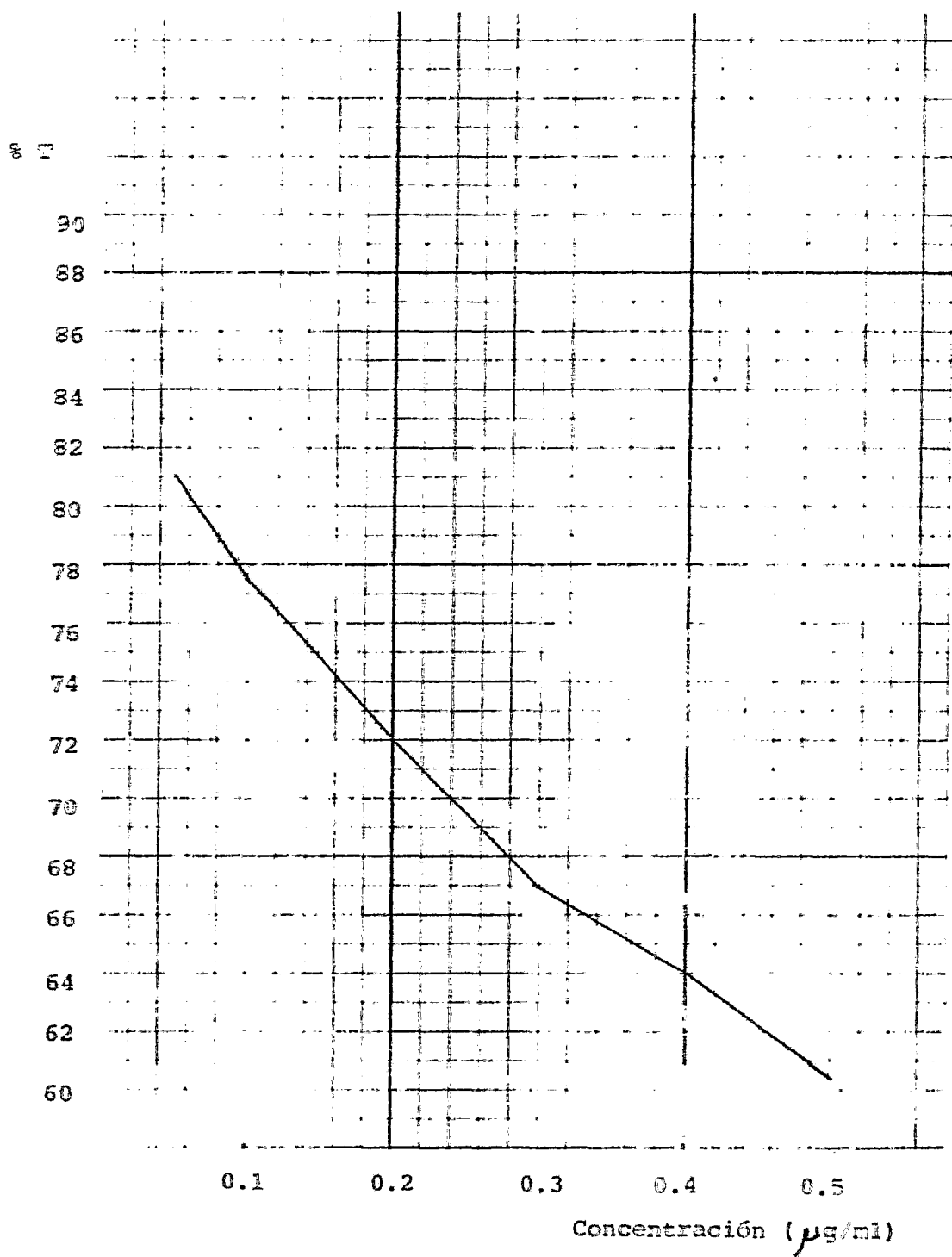
CALCULOS:

$$\frac{0.1045 \mu\text{g/ml}}{0.1 \mu\text{g/ml}} \times 100\% = 104.5\%$$

VALOR TEORICO: 1 mg/ml → 100%

RESULTADO: 1.045 mg/ml → 104.5%

CURVA ESTANDAR DE ACIDO NICOTINICO



11. Determinación Microbiológica
de Tetraciclina
(Difusión)

Valores del estándar ($\mu\text{g/ml}$)	Lecturas de halo de inhibición (mm)	Promedio
0.64	1) 16, 16, 16 1) 17, 16, 16 1) 16, 16, 16 1) 17, 16, 15	16.08mm (a)
0.80	2) 18, 18, 18 2) 19, 18, 19 2) 19, 19, 19 2) 18, 19, 18	18.5mm (b)
1.0	3) 20, 19, 20 3) 21, 20, 20 3) 21, 20, 21 3) 20, 20, 20 3) 20, 20, 20 3) 20, 20, 20 3) 20, 21, 21 3) 20, 21, 20 3) 20, 20, 20 3) 21, 20, 21 3) 20, 20, 20 3) 20, 20, 20 3) 20, 19, 19 3) 20, 20, 20 3) 20, 20, 20 3) 20, 19, 20	20.08

1.25	4) 21, 21, 21	
	4) 22, 21, 21	21
	4) 21, 22, 21	
	4) 21, 20, 20	
1.56	5) 22, 22, 22	
	5) 21, 22, 23	22
	5) 22, 22, 21	
	5) 22, 23, 22	
Muestra	M) 21, 22, 21	Muestra
	M) 21, 22, 21	21
	M) 21, 20, 21	
1.0	M) 21, 20, 21	

$$L = \frac{3(16.08) + 2(18.5) + 20.08 - 22}{5} = 16.6 \text{ mm}$$

$$H = \frac{3(22) + 2(21) + 20.08 - 16.08}{5} = 22.4 \text{ mm}$$

CALCULOS:

$$\frac{1.0 \mu\text{g/ml} \times 100\%}{1.0 \mu\text{g/ml}} = 100\%$$

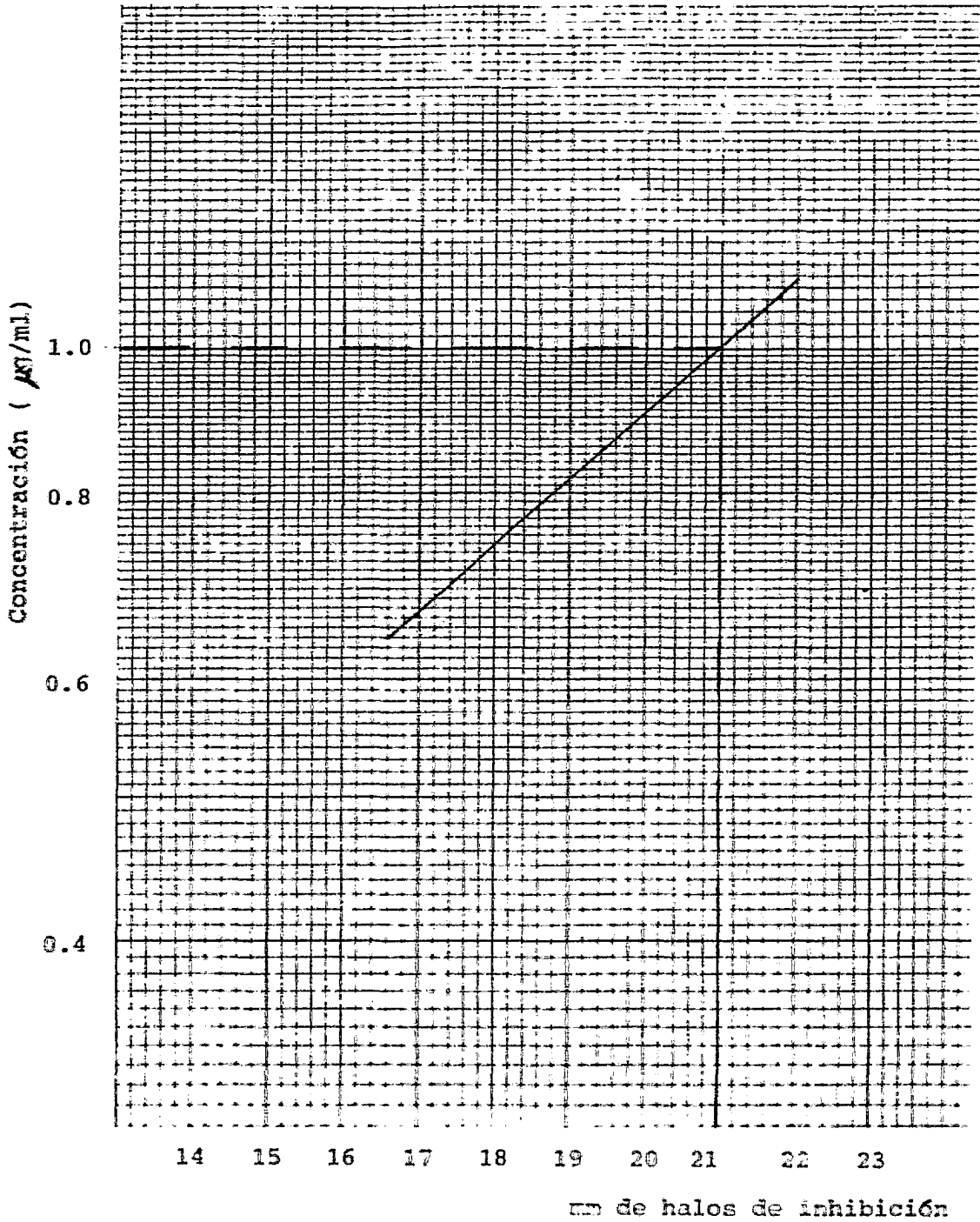
VALOR TEORICO

$$1.0 \text{ mg/ml} \rightarrow 100\%$$

RESULTADO

$$1.0 \text{ mg/ml} \rightarrow 100\%$$

CURVA ESTANDAR DE TETRACICLINA
(Difusión)



12. Determinación Microbiológica de
Sulfato de Neomicina

Valores del estándar Cond. del estándar ($\mu\text{g/ml}$)	Lecturas de halos de inhibición (mm)	Promedio (mm)
0.6	1) 12, 12, 12	12.5 (a)
	1) 13, 13, 13	
	1) 12, 13, 12	
	1) 13, 12, 13	
8.0	2) 14, 14, 14	14.08 (b)
	2) 14, 14, 14	
	2) 14, 14, 14	
	2) 15, 14, 14	
10	3) 17, 17, 17	16.45 (c)
	3) 17, 16, 17	
	3) 16, 17, 17	
	3) 17, 15, 17	
	3) 17, 17, 17	
	3) 17, 17, 17	
	3) 15, 16, 17	
	3) 16, 17, 17	
	3) 17, 17, 17	
	3) 17, 17, 17	
	3) 17, 17, 17	
	3) 17, 17, 17	
	3) 17, 17, 17	
	3) 17, 16, 17	
3) 18, 16, 17		
3) 17, 17, 17		

12	4) 18, 18, 18 4) 18, 18, 18 4) 18, 18, 18 4) 18, 19, 18	18.08 (d)
----	--	-----------

15	5) 19, 19, 20 5) 20, 20, 20 5) 20, 19, 20 5) 20, 19, 20	19.66 (e)
----	--	-----------

Muestra	M) 17, 17, 17 M) 17, 17, 17 M) 17, 17, 17 M) 17, 17, 17	Muestra 17
---------	--	---------------

$$L = \frac{3(12.5) + 2(14.08) + 16.45 - 19.66}{5} = 12.49 \text{ mm}$$

$$H = \frac{3(19.66) + 2(18.08) + 16.45 - 12.5}{5} = 19.8$$

CALCULOS: $\frac{10 \mu\text{g/ml}}{10 \mu\text{g/ml}} \times 100\% = 100\%$

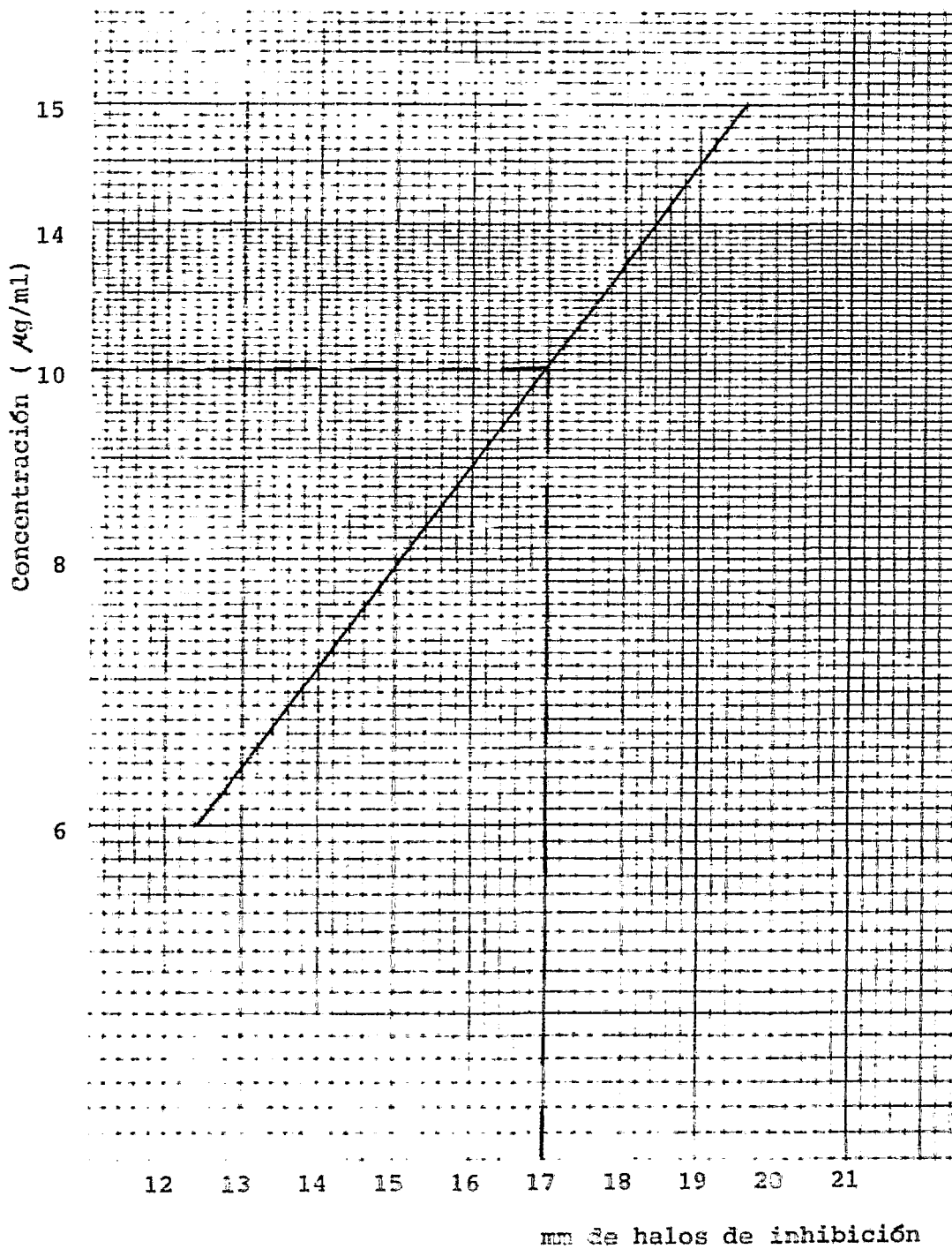
VALOR TEORICO: (target unguento)

85 mg/tubo → 85%

RESULTADO.

100 mg/tubo → 100%

CURVA ESTANDAR DE SULFATO DE NEOMICINA



La aplicación de los métodos cuantitativos microbiológicos demostró que las técnicas, son perfectamente - aplicables y confiables en la forma en que están descritas, con los microorganismos que integran esta subcolección.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. Esta pequeña subcolección, integrada por nueve cepas ATCC, ha permitido montar los métodos microbiológicos para la cuantificación de 12 sustancias, cuyo control generalmente se hace de esta manera en los laboratorios farmacéuticos.
2. Las cepas que integran esta subcolección también puede utilizarse para otras determinaciones microbiológicas de aminoácidos, vitaminas y antibióticos.
3. Además de emplearse en prácticas de control farmacéutico, las cepas pueden utilizarse, dentro de la Facultad, para la realización de prácticas sencillas, como requerimientos nutricionales y sensibilidad a antibióticos y en las determinaciones cuantitativas de proyectos de investigación que las requieran.
4. Por todo esto la subcolección será de gran utilidad tanto para las materias de Microbiología General, Biosíntesis Microbiológica de Aplicación a la Industria, Microbiología Farmacéutica, Microbiología Industrial y Seminario de Microbiología Industrial, y Bacteriología Médica, Fisiología y Bioquímica de Microorganismos, Control de Medicamentos y Nutrición, así como para el apoyo que la Facultad de Química, tradicionalmente brinda a otras instituciones de investigación y docencia, y a la industria.
5. El uso de los métodos microbiológicos para la determinación cuantitativa de aminoácidos, antibióticos y vitaminas, por su sencillez, permiten reducir las importaciones de equipo y reacciones comúnmente usados en otros tipos de técnicas analíticas, lo cual es una ventaja muy notable para nuestro país, pero debe estimularse además, la producción de estándares secundarios y de medios de cultivo adecuados que permitan reducir también la importación de sustancias.
6. Finalmente, se recomienda incorporar a esta subcolección, otras cepas que se obtengan en el futuro, para otras determinaciones microbiológicas, revisando y montando las técnicas respectivas.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Anderson, Bendush, Chase, Gennaro, Gibson, Granberg, Harwey, King, Martin, Swinyard. (Board members)
"Remington's Pharmaceutical Sciences".
15a. Edition
Marck Publishing Company, 1975
2. Bailey - Scott
"Diagnostic Microbiology"
4a. Edition
The C.V. Mosby Company.
Saint Louis, 1974
3. "Bergey's"
"Manual of Determinative Bacteriology"
8a. Edition
Waverly Press Inc.
Baltimore MD. USA 1974
4. BBL
"Manual de procedimientos en laboratorios y de productos".
Becton, Dickinson de México, S.A. de C.V.
México, 1971
5. Collins, C.H.
"Microbiological Methods".
London, Butterworth.
1979
6. DIFCO
"Manual of dehydrated culture media and reagents for microbiological and clinical laboratory procedures".
9a. Edition

Detroid Michigan USA 1953

7. DIFCO

"Media for the microbiological assay of vitamins and aminoacids"

USA, 1971

8. Federal Register (Editor)

"Code of federal regulations"

"Foods and Drugs".

1977

9. Felemovicius y S.P.

"Creación y funcionamiento de una colección de cepas microbianas en la Facultad de Química, UNAM". (Tesis)

México, 1974

10. Frederick Kavanagh

"Analytical Microbiology"

Academic Prees.

N.Y., 1963

11. Hatt, Lessel, Clark, Davis, Jong, Zieg, and Alexander (Editors).

"Catalogue of strains"

The American Type Culture Collection.

11a. Edition

USA, 1974

12. Hugo - R

"Pharmaceutical Microbiology"

2a. Edition

Blackwell Scientific Publications. 1980

13. Horwitz William (Editor)
"Methods of Analysis"
Association of Official Analytical Chemists
11a. Edition
USA, 1970

14. Listsky
"Microbiology Industrial"
Mc-Graw-Hill Book Company.
N.Y. USA, 1976

15. Prescott, S.C. y C. G. Dunn
"Microbiología Industrial"
Editorial Aguilar.
Madrid, 1962

16. Skinner and Lovelock
"Identification Methods for Microbiologist"
2a. Edition
Academic Press
N.Y. USA.

17. Syntex (Editor)
"Avances del control en la Industria Farmacéutica".
IV Conferencia Farmacéutica sobre control de calidad.
San Juan del Río, Qro, México, Octubre, 1978.

18. US Pharmacopeia - National Formulary
The United States Pharmacopeial Convention, Inc.
(Meeting at Washington D.C.)
20a. Edition
USA 1980

19. Thoma W. R.

"Microbiology Industrial"

Dowden, Hutchinson and Ross, Inc

Stroudsburg, Pennsylvania 1979

20. William H.

"Microbiological assay an introduction to quantitative principles and evaluation.

Academic Press

N.Y. USA, 1977