



# UNIVERSIDAD ABIERTA Y A DISTANCIA DE MÉXICO



DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA SALUD,  
BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

## Crecimiento de *Pseudomona aeruginosa* sp en Presencia de Luz Roja, Verde y UV

PROYECTO TERMINAL QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA PRESENTA:

**CESAR MORA VALDIVIA**

**ASESOR: DIANA ELINOS CALDERÓN**  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

**ASESOR: ERÉNDIRA RAMÍREZ RIVERO**  
IAM



## Indicé

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 1     | Resumen.....                           | 3  |
| 2     | Justificación.....                     | 4  |
| 3     | Marco Teórico. ....                    | 4  |
| 3.1   | <i>Pseudomona aeruginosa pp.</i> ..... | 4  |
| 3.1.1 | Morfología e Identificación.....       | 6  |
| 3.1.2 | Coloración. ....                       | 7  |
| 3.1.3 | Condiciones de Crecimiento.....        | 8  |
| 3.1.4 | Conservación.....                      | 9  |
| 3.1.5 | Efecto de la Luz. ....                 | 10 |
| 3.2   | Medios de Cultivo.....                 | 11 |
| 3.2.1 | Sintéticos. ....                       | 11 |
| 3.2.2 | No Sintéticos.....                     | 12 |
| 3.2.3 | Selectivos. ....                       | 12 |
| 3.2.4 | Diferenciales.....                     | 12 |
| 3.2.5 | Caracterización e Identificación.....  | 12 |
| 3.2.6 | Enriquecimiento.....                   | 13 |
| 3.2.7 | Enriquecidos.....                      | 13 |
| 3.2.8 | Mantenimiento.....                     | 13 |
| 3.3   | Luz. ....                              | 13 |
| 4     | Hipótesis. ....                        | 16 |
| 5     | Objetivo General. ....                 | 16 |
| 5.1   | Objetivos Particulares. ....           | 16 |



|       |  |    |
|-------|--|----|
| 6     | Metodología.....   | 17 |
| 6.1   | Materiales.....  | 17 |
| 6.2   | Agar Eosina Azul de Metileno.....  | 17 |
| 6.3   | Agar Bilis Rojo Violeta.....   | 18 |
| 6.4   | Método de Siembra por Estría en Placa.....   | 19 |
| 6.5   | Método por Vaciado de Placa para Cuenta de Colonias.....                             | 20 |
| 6.5.1 | Esquema de Dilución.....   | 23 |
| 7     | Resultados.....  | 24 |
| 7.1   | Monitoreo de Temperatura.....  | 24 |
| 7.2   | Resultados por el Método de Estría.....  | 30 |
| 7.2.1 | Análisis de las Muestras a Temperatura Ambiente con Incubación en<br>obscuridad..... | 30 |
| 7.2.2 | Análisis de las Muestras a Temperatura Ambiente con Incubación en<br>Luz Roja.....   | 32 |
| 7.2.3 | Análisis de las Muestras a Temperatura Ambiente con Incubación en<br>Luz Verde.....  | 34 |
| 7.2.4 | Análisis de las Muestras a Temperatura Ambiente con Incubación en<br>Luz UV.....     | 36 |
| 7.3   | Resultados por el Método de Vaciado de Placa.....                                    | 38 |
| 7.4   | Resultados del Efecto en el Medio de Cultivo.....                                    | 40 |
| 8     | Discusión.....   | 41 |
| 9     | Conclusiones.....  | 44 |
| 10    | Bibliografía.....  | 45 |



## 1 Resumen.

La luz puede ser una herramienta útil para favorecer el crecimiento de la *Pseudomonas aeruginosa* sp., pero también puede ser contraproducente, todo depende de la longitud de onda suministrada al medio de cultivo, el tipo de cultivo, además, de la superficie y medio ambiente del entorno, que determinara si favorece o perjudica el crecimiento. Hay investigaciones que aseguran que irradiar con luz azul inhibe el crecimiento (Fila, 2017), otros estudios sugieren que irradiar con luz cercano al ultravioleta o longitudes de onda más cortas se inactiva el crecimiento, mientras que por otro lado mientras se irradia con luz verde, rojo y rojo lejano se presenta poco o ningún efecto de inhibición en el crecimiento (Propst, 1979). Por ello el objetivo de esta investigación es el determinar el efecto de la luz roja, verde y UV en cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* sp., tratando de establecer si alguna de las luces (roja, verde y UV) a las cuales se someterá la bacteria, inhibe el crecimiento de ella.

## 2 Justificación.

En la actualidad existe mucha investigación en el área de la biotecnología para utilizar y explotar al máximo posible, los microorganismos para obtener productos de interés en las áreas como medicina, química, biología, ambiental, agricultura, farmacéutica, cosmética, alimentos etc., una de las bacterias de mayor interés para estos campos de estudio es la *Pseudomonas aeruginosa sp.*, por ello surge la necesidad de evaluar el metabolismo de dicha bacteria sometida a tres diferentes longitudes de onda dentro del espectro electromagnético, en la región de luz visible, específicamente en la longitud del rojo, verde y la longitud de onda de la luz ultravioleta, este estudio surge de la necesidad del Tecnológico de Estudios Superiores de Coacalco, del área de Ingeniería Ambiental, debido a que en la actualidad tienen un proyecto de biodegradar tereftalato de polietileno de baja densidad por sus siglas en inglés (LDPE), utilizando la *Pseudomonas aeruginosa sp.* para la degradación biológica de dicho material y el posible efecto del crecimiento de la bacteria por efecto de la luz roja, verde o UV.

## 3 Marco Teórico.

### 3.1 *Pseudomonas aeruginosa sp.*

El género *Pseudomonas*, pertenece a la familia *Pseudomonadaceae*, que se sitúa dentro del orden *Pseudomonadales*, que también comprende la familia *Moraxellaceae*, el género más importante de todas las especies es la *Pseudomonas aeruginosa*, debido a que produce infecciones en los humanos (Ruiz, 2007). Las *Pseudomonas* son bacilos no fermentativos perteneciendo a un complejo conjunto de patógenos oportunistas en el ser humano, animales y plantas (Murray, 2007). Al ser bacilos, la *Pseudomonas aeruginosa sp.* se divide por medio de sus ejes menores, lo que provoca que la formación de sus grupos

sea menor en comparación con otras bacterias (Tortora 2007). A pesar de la diversidad de géneros que existen, son pocos los que se aíslan con regularidad, entre ellos se encuentra la especie *Pseudomona aeruginosa* sp. (Murray, 2007).

Son bacilos gramnegativos, aeróbicos no formadores de esporas (Brooks, 2011). Son móviles por la presentación de uno o dos flagelos polares (imagen 1) (Ruiz, 2007), estos flagelos son los que impulsan a la bacteria permitiéndole dirigirse a los nutrientes, además, de que les permite evitar cruzarse con sustancias tóxicas (quimiotaxis) (Murray, 2009). Su flagelo tiene una estructura helicoidal de consistencia semirrígida lo que permite la propulsión por la rotación del cuerpo basal. La rotación del flagelo tiene un sentido horario y antihorario alrededor del eje mayor, su movimiento es similar al del eje de un motor eléctrico generando una presión en el líquido circundante lo que da la propulsión, por lo tanto, se considera que tiene la capacidad para trasladarse por sí misma (Tortora, 2007).

Por lo regular se encuentran en pequeñas cantidades en la microflora intestinal normal y piel en el ser humano, siendo el principal patógeno del grupo (Brooks, 2011).

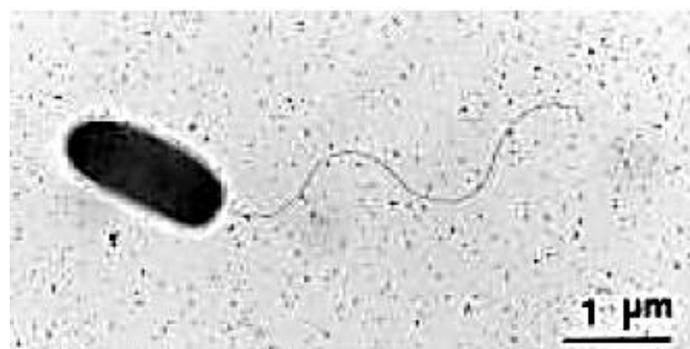


Imagen 1. Electro micrografía que muestra la flagelación polar que presenta *P. aeruginosa* (Ruiz, 2007).

Esta especie tiene la habilidad de emplear sustancias orgánicas, inorgánicas y tóxicas (Hidrocarburos alifáticos y aromáticos), debido a su diversidad metabólica y plasticidad genética, pueden metabolizar más de 80 compuestos orgánicos, también tienen la capacidad de vivir en condiciones ambientales muy diversas, los encontramos en ecosistemas acuáticos y terrestres, además resisten antibióticos, detergentes, desinfectantes, solventes orgánicos y metales pesados (Ruiz, 2007), esto debido a que en determinadas condiciones producen biopelículas de polisacáridos, estableciendo comunidades bacterianas protegiendo a sus organismos de las características antes mencionadas, (Murray, 2009).

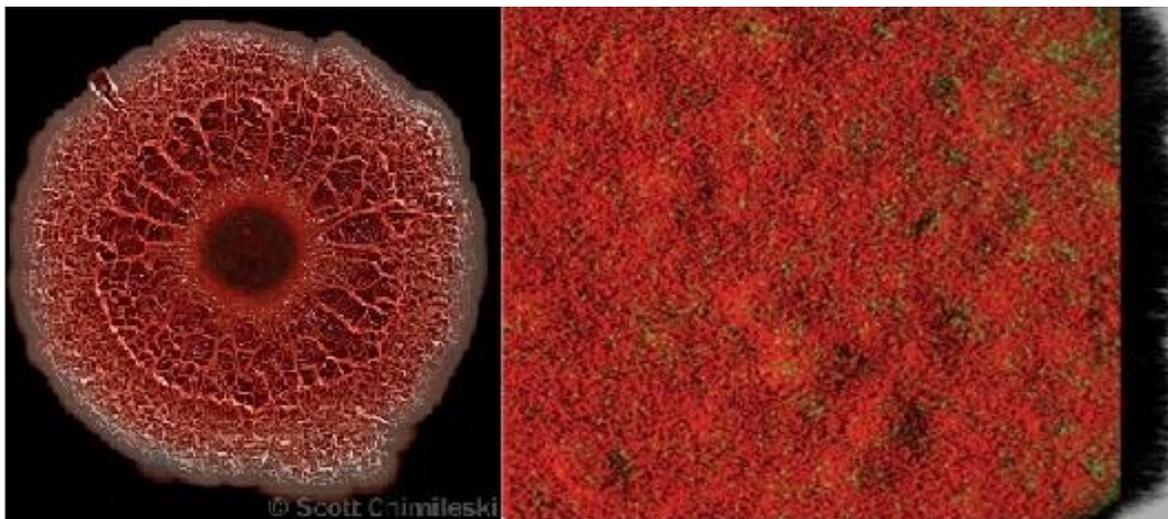


Imagen 2. Biopelícula de *Pseudomonas aeruginosa* cultivada en el reactor de flujo por goteo de fondo de biopelículas de los Centros para el control y la prevención de las enfermedades (ASTM, 2009).

### 3.1.1 Morfología e Identificación.

Tiene forma de bastón con dimensiones aproximadas de  $0.6 \times 2 \mu\text{m}$  (Imagen 1.). Muestra la disposición de bacterias individuales, pares y en algunas veces en cadenas cortas (Ryan, 2010).

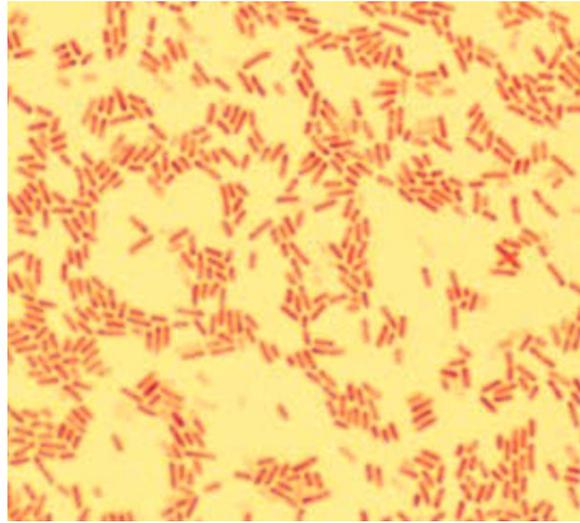
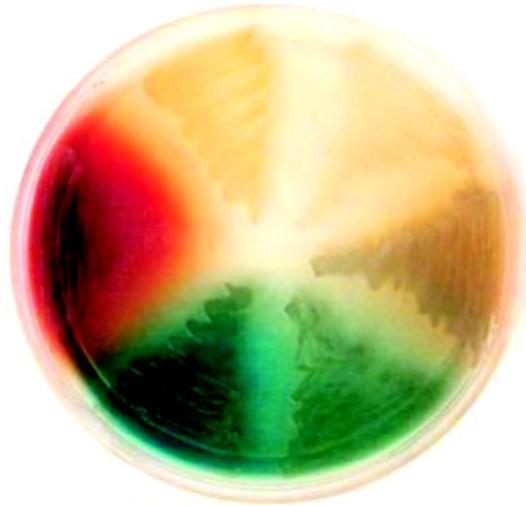


Imagen 3. *Pseudomonas aeruginosa* en tinción de Gram, con una dimensión de 0.6 x 2  $\mu\text{m}$ . aumento original x 1000 (Ryan, 2010).

### 3.1.2 Coloración.

Es un aerobio obligado con el oxígeno como aceptor final de electrones, que fácilmente se reproduce en diferentes tipos de cultivo, a consecuencia de ello en algunas ocasiones produce olores afrutados y dulces como el de la uva o a tortillas de maíz. Algunas cepas generan hemólisis, formando colonias redondeadas y lisas con una coloración verdosa fluorescente, también suelen producir pigmento azulado no fluorescente (**piocianina**), difundándose hacia el agar. Otro pigmento fluorescente generado es (**pioverdina**) produciendo un color verdoso al agar, otras cepas generan un pigmento rojo oscuro (**piorrubina**) o pigmentación marrón (**piomelanina**) (Ryan, 2010).



**Imagen 4. Colonias de aislamientos hospitalarios de *Pseudomonas aeruginosa*. Se muestran los diferentes pigmentos generados sobre agar Mueller Hinton, después de 48 h de incubación a 28 °C (Ryan, 2010).**

Cuando la pioverdina se mezcla con el pigmento piocianina, se origina el color verde brillante característico de la *Pseudomonas aeruginosa* sp. o piomelanina (**marrón**), la coloración es favorecida por la presencia de hierro en el medio y a una temperatura menor de 37 °C (Merino, 2007).

### **3.1.3 Condiciones de Crecimiento.**

Como es un microorganismo resistente se puede cultivar fácilmente con un amplio rango de condiciones y temperaturas. El pH debe de estar entre 4 y 8, crecen en agar MacConkey como no fermentadores de lactosa (Ruiz, 2007). La temperatura óptima de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* sp. es de 37 °C, sin embargo, tiene un rango amplio de temperatura que va de 4 a 42 °C, se tiene que considerar la selección de la temperatura adecuada para su crecimiento. En placas se pueden almacenar las bacterias a una temperatura de 4 °C para ser utilizadas con un máximo de una semana. El crecimiento se puede favorecer con aeración, independiente de los medios, sin embargo, la *P. aeruginosa* puede



metabolizar en medio anaerobio con algunas fuentes de carbono suministrándole nitrato como aceptor de electrones terminal. Por lo general se realizan los cultivos en tubos de vidrio de 18 mm, con adición de 3 mL de medio en un tambor de rodillo, generalmente se observan tiempos de duplicación exponencial (LaBauve, 2012).

Es de fácil crecimiento en medios comunes de aislamiento, como el agar sangre y el agar MacConkey, es necesaria una incubadora aerobia, de lo contrario es necesario suministrar nitrato, por lo que su crecimiento en el medio es restringido (Murray 2007). Regularmente se suele limitar a la superficie de contacto entre el cultivo y el aire, zona donde la concentración de oxígeno es máxima (Murray, 2009).

Crece en caldo LB, teniendo como opción una gama amplia de sustancias como única fuente de carbono y nitrógeno. Para evaluar el crecimiento en estas únicas fuentes de nutrientes, se emplean diferentes medios para el cultivo como MOPS [3-(N-Morpholino) Propane-Sulfonic Acid], medio M9 o M63. Tienen la versatilidad de modificarse las formulaciones del medio para evaluar el papel de las diferentes fuentes de carbono, nitrógeno y azufre. Para crecimiento robusto se puede utilizar medio MOPS. Otros medios son agar de aislamiento de *Pseudomonas* (PIA Difco) y King A que estimula la producción de pirocianina (LaBauve, 2012).

#### **3.1.4 Conservación.**

Pueden conservarse congeladas a - 80 °C con 20 % de glicerol o 10 % de leche desnatada. Al emplear la cepa congelada es recomendable diseminar las



bacterias en una placa de agar LB y el cultivo líquido un día siguiente a partir de la placa fresca. No colocar directamente en el líquido ya que los aislados pueden crecer mal, también no es recomendable la recuperación de cepas directamente sobre placas de agar MOPS (LaBauve, 2012).

### 3.1.5 Efecto de la Luz.

En los sistemas biológicos, específicamente ablando de los procesos bioquímicos y fisiológicos de los organismos, la exposición a la luz juega un papel importante, debido a que tiene efecto en la respuesta del sistema defensivo en el huésped además de la virulencia de los organismos patógenos (Nagendran, 2014).

Las proteínas fotosensibles posibilitan la detección y la respuesta a las exposiciones a la luz de los organismos. En los procesos biológicos y ecológicos de las proteínas fotosensibles en bacterias no fotosintéticas; como es el caso de la *Pseudomonas aeruginosa*, en gran medida son desconocidas en la actualidad (Wu, 2018).

Los resultados obtenidos en un estudio reciente de la bacteria *Pseudomonas syringae*, presentan que las bacterias no fotosintéticas poseen redes empleando un fitocromo que reacciona a diferentes tipos de luz (azul, roja y rojo lejano), para tener control en el comportamiento objetivo, estableciendo que la motilidad de enjambre está regulada por *BphP1* que regula negativamente la motilidad y una proteína *LOV – HK* que regula positivamente la motilidad suprimiendo la regulación negativa por *BphP1* en respuesta a la luz azul, esto es posible debido a que se presenta una conversación cruzada de las vías de señalización reguladas



por la proteína *LOV* y el fitocromo dando respuesta a una señal de luz única (luz azul) (Wu, 2018).

En estudios recientes de crecimiento bacteriano sometidos a procesos de exposición a diferentes tipos de luz, se concluyó que no se presentaron cambios significativos en el crecimiento de *Pseudomona cichorii* JBC1, entre estas exposiciones se encuentra la luz roja teniendo como resultado  $8.5 \times 10^8 \text{ UFC/mL}$ , en luz verde  $8.5 \times 10^8 \text{ UFC/mL}$  y en luz blanca  $8.7 \times 10^8 \text{ UFC/mL}$ , todas ellas a una intensidad de  $120 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , mientras que las que se sometieron en la oscuridad tuvieron un crecimiento  $8.7 \times 10^8 \text{ UFC/mL}$ , por otro lado el crecimiento ligeramente se inhibió cuando se sometió a la bacteria a un incremento de  $240 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  incrementó (Nagendran, 2014).

La exposición de cultivos en luz de 371 nm (muy cercano a UV) y 420 nm (violeta), provoca la foto inactivación del pigmento pirocianina (azulado), cuando se emplea luz de 550 nm (verde), 660 nm (rojo) y 740 nm (rojo lejano), se presentaba poco o ningún efecto. Estudios con extractos pirocianina arrojaron foto inactivación fuerte por la luz de longitudes de onda menores a 371 nm, más acertadamente en longitudes de 254, 313 y 365 nm por lo que se observa que a medida que la longitud de onda de la luz ultravioleta es más corta, la inactivación se acelera (Propst, 1979).

## **3.2 Medios de Cultivo.**

### **3.2.1 Sintéticos.**

Son preparados con base a compuestos altamente purificados generalmente, su preparación requiere una composición conocida exacta.

### **3.2.2 No Sintéticos.**

Por lo regular suelen ser a base de extracto de sangre, adicionándole sangre, suero y algunas otras sustancias complejas, la composición de los ingredientes no es precisa.

### **3.2.3 Selectivos.**

Favorecen el desarrollo de los microorganismos impidiendo el crecimiento de ciertos grupos de microorganismos. Un ejemplo de ello es la adición de nitrógeno inorgánico en lugar de nitrógeno orgánico, además de otras sustancias como potasio, telurito, sulfito de bismuto, entre otros. También pueden ser adicionados algunos antibióticos para inhibir el crecimiento de ciertas especies bacterianas.

### **3.2.4 Diferenciales.**

Permiten el desarrollo de las bacterias con una apariencia de colonia distintiva por medio del suministro de sustancias indicadoras o nutritivas.

### **3.2.5 Caracterización e Identificación.**

Se preparan con sustratos específicos permitiendo diferenciar una especie de otra aprovechando la capacidad enzimática específica de la especie.



### **3.2.6 Enriquecimiento.**

Consiste en combinar un medio selectivo, además de la variación de factores ambientales como suministrar una única fuente de carbono, temperatura, pH, iluminación, aeración, etc., para favorecer el crecimiento de un cierto grupo de microorganismos.

### **3.2.7 Enriquecidos.**

Se emplean complejos especiales y sofisticados para algunas bacterias que no tienen la capacidad de crecimiento en los medios de cultivo comunes.

### **3.2.8 Mantenimiento.**

Se suministran la concentración de los nutrientes de forma limitada para la preservación y viabilidad de los microorganismos.

## **3.3 Luz.**

Un campo eléctrico que con el tiempo varía genera un campo magnético y viceversa, el campo magnético que con el tiempo varía se manifiesta como la fuente de un campo eléctrico. Estos dos campos se sostienen uno al otro formando en conjunto una onda electromagnética propagándose a través del espacio. Podemos emitir luz visible a través del filamento de una bombilla incandescente eléctrica. Las ondas electromagnéticas, como, por ejemplo, luz visible, microondas, ondas de radio, rayos x, entre otras, se diferencian sólo en su longitud y frecuencia de onda. La luz visible es del interés de este estudio y dentro

de ella existen 6 frecuencias de las cuales dos son de interés para esta investigación y una última que es la luz ultravioleta. Se han detectado frecuencias de 1 a  $10^{24}$  Hz de ondas electromagnéticas, en la siguiente imagen 4, se muestra el espectro electromagnético, indicando las frecuencias e intervalos de longitud de onda aproximados más comunes (Young, 2009).

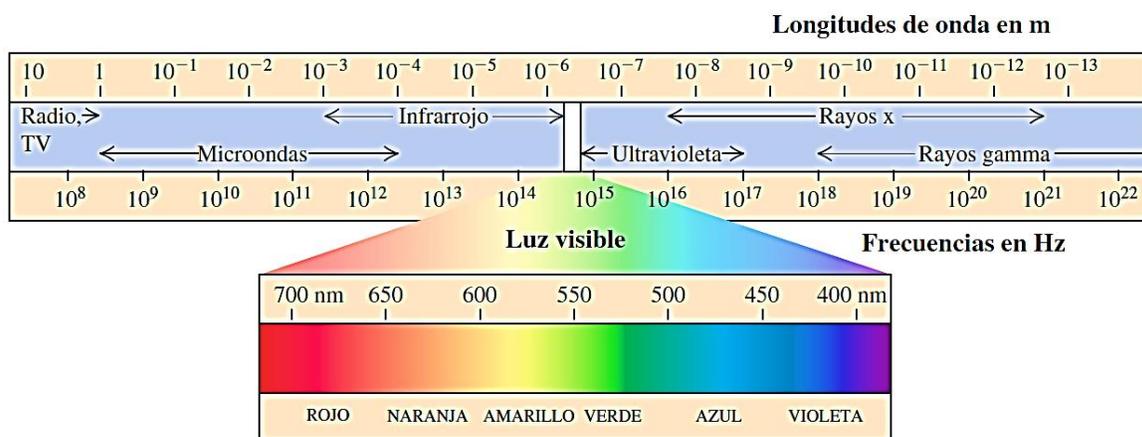


Imagen 5. Espectro Electromagnético (Young 2009).

El ser humano únicamente puede detectar directamente con el sentido de la vista, una zona muy pequeña del espectro electromagnético llamada luz visible. El rango de longitud de onda se encuentra de 400 a 700 nm ( $400$  a  $700 \times 10^{-9}m$ ) equivalente a frecuencias de 750 a 430 THz ( $7.5$  a  $4.3 \times 10^{14}Hz$ ) aproximadamente (Tippens, 2011).

El ser humano percibe el espectro visible con diferentes colores, se muestra a continuación una tabla donde se presentan estas coloraciones con sus respectivas longitudes de onda:

## Longitudes de Honda de la Luz Visible

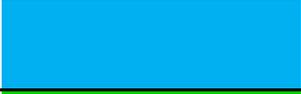
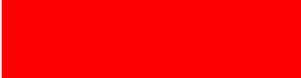
| Longitud de Onda |   |     | Color        |   |
|------------------|---|-----|--------------|---|
| <b>100</b>       | A | 400 | Ultravioleta |    |
| <b>400</b>       | A | 440 | Violeta      |    |
| <b>440</b>       | A | 480 | Azul         |    |
| <b>480</b>       | A | 560 | Verde        |    |
| <b>560</b>       | A | 590 | Amarillo     |   |
| <b>590</b>       | A | 630 | Naranja      |  |
| <b>630</b>       | A | 700 | Rojo         |  |

Tabla 1. Longitudes de onda de la luz visible (Elaboración Propia).

Todas las longitudes de onda en el espectro visible están en la luz blanca, con el uso adecuado de filtros o fuentes especiales se puede seleccionar una banda angosta de longitudes de onda en un intervalo de unos cuantos  $nm$ . Como resultado obtendremos una aproximación considerable, a una luz monocromática (de un solo color). Es importante aclarar que la luz monocromática totalmente con una sola longitud de onda es algo inalcanzable.

## 4 Hipótesis.

La aplicación adecuada de longitud de onda de luz roja favorece el crecimiento controlado de la *Pseudomona aeruginosa sp.*, mientras que la aplicación de luz UV inhibe el crecimiento.

## 5 Objetivo General.

Determinar el efecto de la luz roja, verde y UV en cultivos de *Pseudomona aeruginosa pp.*

### 5.1 Objetivos Particulares.

1. Evaluar el crecimiento en placa de *Pseudomona aeruginosa sp.*, sometiendo el medio de cultivo con luz roja, a temperatura ambiente.
2. Evaluar el crecimiento en placa de *Pseudomona aeruginosa sp.*, sometiendo el medio de cultivo con luz verde, a temperatura ambiente.
3. Evaluar el crecimiento en placa de *Pseudomona aeruginosa sp.*, sometiendo el medio de cultivo con luz UV, a temperatura ambiente.
4. Determinar el crecimiento por el método de siembra por estría en placa.

## 6 Metodología.

### 6.1 Materiales.

- Cajas Petri estéril.
- Asa de siembra.
- Espátula.
- Vidrio de reloj.
- Parrilla eléctrica con agitación magnética.
- Balanza.
- Matraz Erlenmeyer de 25 mL.
- Matraz Erlenmeyer de 250 mL.
- Mechero.
- Incubadora.
- Algodón estéril.
- Agar Eosina Azul de Metileno.
- Agar Bilis Rojo Violeta.
- *Pseudomona aeruginosa* (proporcionada por el TESCO.).
- Agua destilada.

### 6.2 Agar Eosina Azul de Metileno.

1. Se pesan 7.2 gr de agar eosina azul de metileno y se disuelve en 200 mL de agua destilada en un matraz Erlenmeyer de 250 mL.
2. Disolver lo más que se pueda y dejar reposar durante 15 minutos.



3. Tapar el matraz y calentar con agitación magnética hasta ebullición manteniéndola durante 20 minutos.
4. Transcurrido el tiempo retirar el matraz de la parrilla y dejar enfriar alrededor de 40 °C.
5. Se colocan tres mecheros para crear un cinturón de fuego, que será la zona donde se va a trabajar.
6. Se destapa el matraz con el medio de cultivo dentro de la zona de cinturón de fuego y se acerca la boca del matraz para flamearla, posteriormente se vacía el medio de cultivo en la placa.
7. Repetir esta operación hasta tener un total de 6 placas.
8. Una vez que se ha solidificado el agar en la placa se puede emplear para la inoculación de la *Pseudomona*.

### **6.3 Agar Bilis Rojo Violeta.**

1. Se pesan 8.2 gr de agar bilis rojo violeta y se disuelve en 200 mL de agua destilada en un matraz Erlenmeyer de 250 mL.
2. Disolver lo más que se pueda y dejar reposar durante 15 minutos.
3. Tapar el matraz y calentar con agitación magnética hasta ebullición manteniéndola durante 20 minutos.



4. Transcurrido el tiempo retirar el matraz de la parrilla y dejar enfriar alrededor de 40 °C.
5. Se colocan tres mecheros para crear un cinturón de fuego, que será la zona donde se va a trabajar.
6. Se destapa el matraz con el medio de cultivo dentro de la zona de cinturón de fuego y se acerca la boca del matraz para flamearla, posteriormente se vacía el medio de cultivo en la placa.
7. Repetir esta operación hasta tener un total de 6 placas.
8. Una vez que se ha solidificado el agar en la placa se puede emplear para la inoculación de la *Pseudomona*.

#### **6.4 Método de Siembra por Estría en Placa.**

1. Se prepara un cinturón de fuego con tres mecheros.
2. Se toma un asa de siembra y se esteriliza en la flama de uno de los mecheros.
3. Una vez que se ha enfriado el asa, se toma una muestra de *Pseudomona aeruginosa* (proporcionada por el Tecnológico de Estudios Superiores de Coacalco).
4. A continuación, se destapa una de las placas (1 de 6) de agar de eosina y se procede a inocular realizando estrías en forma de zigzag sobre la

superficie del agar, a medida que se realiza este proceso, la inoculación de la bacteria se van depositando menos microorganismos.

5. Una vez concluida la estría se esteriliza el asa nuevamente antes de tomar otra muestra.
6. Realizar este procedimiento hasta completar un total de cinco muestras. La sexta muestra se conservará como control de la esterilización del medio de cultivo.
7. Colocar las seis placas en la incubadora a temperatura ambiente y en obscuridad.
8. Monitorear el crecimiento.
9. Repetir este mismo procedimiento con las placas de agar bilis.
10. Repetir todo el proceso hasta el punto número 6.
11. Introducir las muestras en una incubadora a temperatura ambiente, pero con la exposición a la luz roja, verde y UV.
12. Monitorear el crecimiento.

### **6.5 Método por Vaciado de Placa para Cuenta de Colonias.**

1. Se utiliza agua destilada como diluyente, se preparan 9 matraces Erlenmeyer de 25 mL con 9 mL de diluyente estéril.

2. Se identifican 9 cajas Petri estériles por duplicado, con la misma codificación de las diluciones en los matraces.
3. En ambiente estéril tomar con una pipeta estéril 1 mL de la suspensión de *Pseudomona aeruginosa sp.* y se deposita en uno de los matraces con el diluyente. Eliminar la pipeta y colocarla en un recipiente con desinfectante.
4. Agita vigorosamente la muestra. Esta dilución representa una relación 1: 10.
5. Tomar 1 mL de la dilución anterior con una pipeta nueva y estéril, y trasferir el contenido a otro matraz. Mezclar vigorosamente y colocar la pipeta en solución desinfectante. Esta dilución representa una relación 1: 100.
6. Distribuir alícuotas de 1 mL con una pipeta nueva al siguiente matraz quedando una dilución en relación 1:1000. Colocar la pipeta en solución desinfectante.
7. Repetir el procedimiento mezclando la dilución 1:1000 y empleando una nueva pipeta distribuir alícuotas al matraz de la siguiente dilución. Este proceso se hace sucesivamente con las siguientes diluciones hasta obtener un total de 9 diluciones  $\left(\frac{1}{10^9} \text{ o } 10^{-9}\right)$ .
8. Adicionar a cada caja Petri 1 mL de cada una de las diluciones anteriores correspondientes, adicionar a cada una de ellas aproximadamente 20 mL del medio de cultivo eosina azul de metileno previamente fundido y



mantenido a 45 – 50 °C. Tapar la caja y mezclar rotando suavemente el contenido sobre la mesa con la precaución de no derramar el contenido.

9. Permitir solidificar a temperatura ambiente posteriormente incubar a temperatura ambiente durante 1 semana.
  
10. Contar las colonias bajo la cámara cuanta colonias. Para que sea válido, el conteo debe de estar entre 20 y 200/caja. El número de colonias por caja (*UFC*) equivale a 1 mL de la muestra inoculada. Se calcula la cantidad de colonias por mL y por g de muestra por medio de la siguiente formula:

$$\frac{UFC}{mL} = (\text{promedio de colonias contadas}) (\text{recíproco de la dilución})$$

### 6.5.1 Esquema de Dilución.

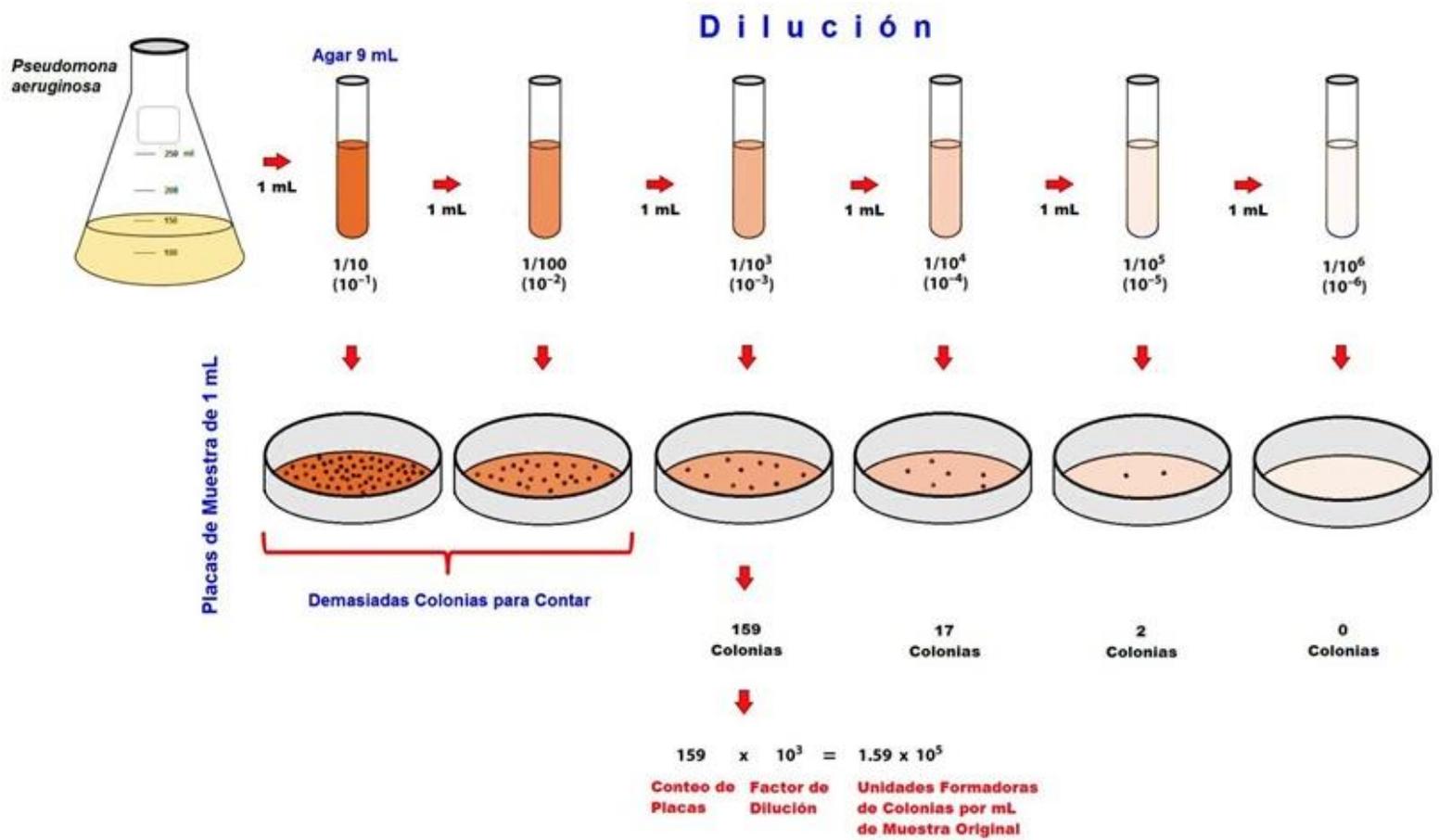


Imagen 6. Diluciones y cuentas en placa (Elaboración Propia).

## 7 Resultados.

### 7.1 Monitoreo de Temperatura.

Debido a que las incubadoras se mandaron hacer en madera con la característica de poder colocar una instalación para los focos de colores que son necesarios para esta investigación, desafortunadamente no se tenía el tiempo y los recursos para que, de la misma forma que la luz, implementar un sistema de calefacción.

Debido a la situación antes mencionada se decidió llevar un monitoreo de temperatura de las incubadoras, este monitoreo se llevó acabo de 7:00 a 22:00, con intervalos de toma de lectura de 3 horas, desafortunadamente no era posible tomar lecturas de temperatura en el horario de la 1:00 y 4:00, debido que no hay personal laborando en dicho horario.

El monitoreo consistió en tomar lecturas de temperatura con intervalos de 3 horas, en total en un día se obtienen 6 lecturas, mismas que serán promediadas. Este proceso se debe realizar durante 25 días como mínimo (Feigenbaum, 1995) para que sea válido estadísticamente y así tener 25 lecturas promediadas de 6 lecturas durante un día.

Esta información se analizó en una grafica ( $\bar{X} - R$ ) elaborada por mí en Excel para calcular los valores de ( $Cp$ ) ecuación 1, el objetivo de calcular este valor fue el determinar la capacidad potencial de control de la temperatura y la variación natural de está entre la variación tolerada, esta última tomada arbitrariamente en función a la temperatura ambiente (22 – 24) como especificación. Esta especificación se consideró la tolerancia  $\pm 1^\circ\text{C}$  de



temperatura establecida para incubadoras con termostato de acuerdo a la NOM-092-SSA1-1994 BIENES Y SERVICIO. MÉTODO PARA LA CUENTA DE BACTERIAS AEROBIAS EN PLACA. Debido a que el valor de ( $Cr$ ) no considera el hecho de evaluar si el proceso de control de temperatura se encuentra en el centro de la media, también se calcularon los valores de ( $Cpk$ ) ecuación 2, que representa el valor medio del proceso de control de la temperatura.

$$Cr = \frac{6\sigma}{LSE - LIE}$$

Donde:

$Cr$  = Desviación Estandar

$\sigma$  = Desviación Estandar

$LSE$  = Especificación de Tempertura Superior

$LIE$  = Especificación de Tempertura Inferior

Ecuación 1. Formula para calcular la capacidad potencial del proceso.

$$Cpk = \frac{LSE - \bar{X}}{3\sigma} \quad Cpk = \frac{\bar{X} - LIE}{3\sigma}$$

Donde:

$Cr$  = Desviación Estandar

$\sigma$  = Desviación Estandar

$LSE$  = Especificación de Tempertura Superior

$LIE$  = Especificación de Tempertura Inferior

Ecuación 2. Fórmulas para calcular el valor de Cpk.



En la gráfica 1, se muestra el monitoreo de la temperatura en la incubadora sin luz, se obtuvo un valor de  $C_r$  de 0.81, el valor deseado debe ser menor a 1 (Feigenbaum, 1995), mientras que los valores del  $C_{pk}$  para el límite inferior fue de 1.61 y 0.86 para el límite superior, el valor deseado para estos índices debe ser mayor a 1 (Feigenbaum, 1995). Un valor mayor a 1 en el  $C_{pk}$  indicaría que la de temperatura se encuentra en control, un valor negativo en estos índices indicaría que la media del proceso no cumple con las especificaciones.

En la gráfica 2, se muestra el monitoreo de temperatura en la incubadora con luz roja, se obtuvo un valor de  $C_r$  de 0.93, los valores de  $C_{pk}$  para el límite inferior fue de 0.88 y 1.28 para el límite superior.

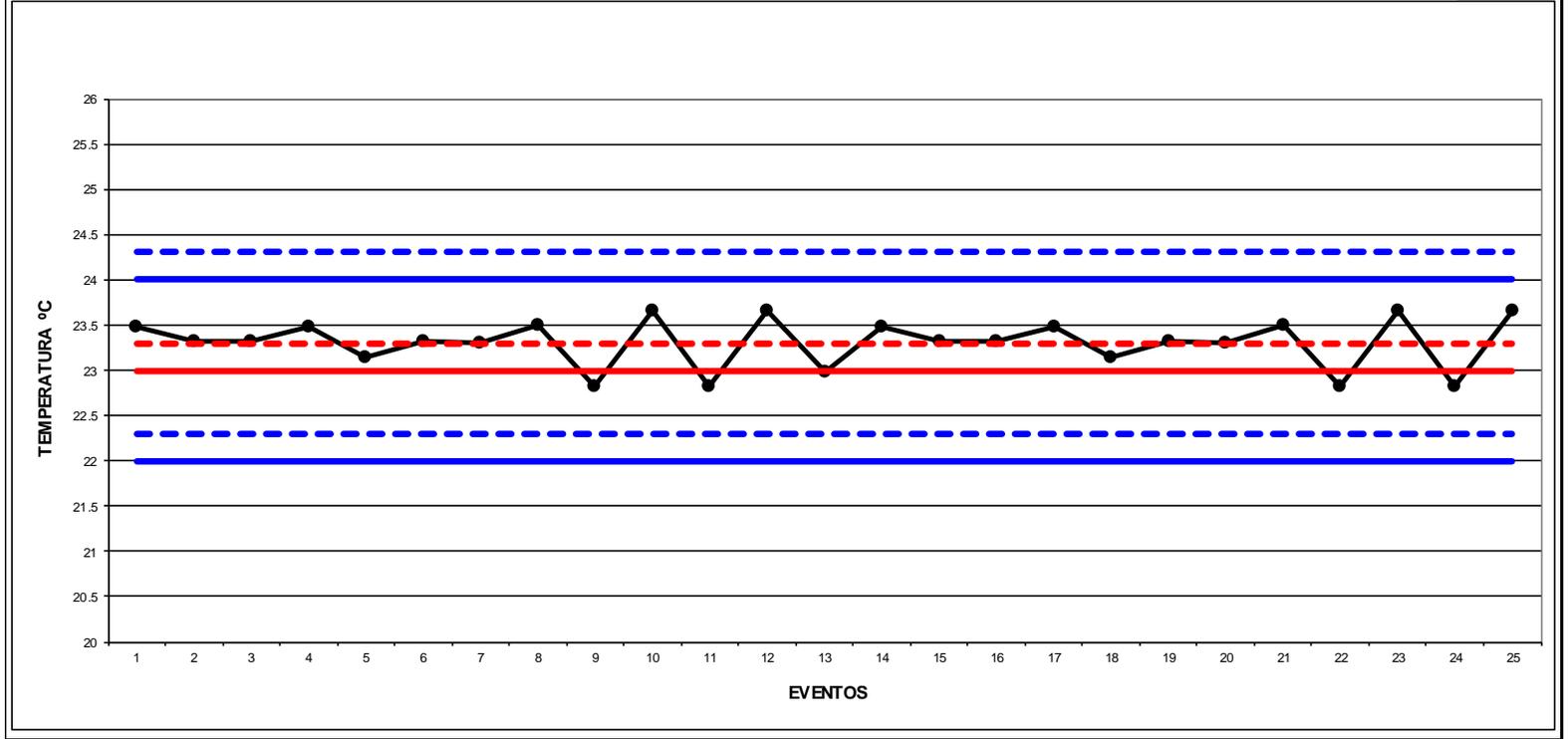
En la gráfica 3, se muestra el monitoreo de temperatura de la incubadora con luz verde, se obtuvo un valor de  $C_r$  de 0.47, los valores de  $C_{pk}$  para el límite inferior fue de 1.08 y 3.16 para el límite superior.



**CONTROL ESTADÍSTICO PARA LA INCUBADORA SIN LUZ**

|                            |                              |                                  |  |                          |                     |          |            |            |
|----------------------------|------------------------------|----------------------------------|--|--------------------------|---------------------|----------|------------|------------|
| INCUBADORA<br>SIN LUZ      | PERIODO<br>ABRIL-MAYO        | EQUIPO DE MEDICIÓN<br>TERMOMETRO | CARACTERÍSTICA VERIFICADA<br>TEMPERATURA | TAMAÑO DE MUESTRA<br>N/A | GRAFICA No<br>X - R |          |            |            |
| FRECUENCIA<br>CADA 3 HORAS | ESPECIFICACION<br>22 A 24 °C |                                  |  |                          | LSE = 24            | X = 23.3 | LSC = 24.3 | Cr = 0.81  |
|                            |                              |                                  |  |                          | LIE = 22            | S = 0.27 | LIC = 22.3 | Cpk = 1.61 |

|       |      |      |      |      |      |      |      |      |        |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|--------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|       | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9      | 10   | 11   | 12   | 13   | 14   | 15   | 16   | 17   | 18   | 19   | 20   | 21   | 22   | 23   | 24   | 25   |
| FECHA | ###  | ###  | ###  | ###  | ###  | ###  | ###  | ###  | 11-abr | ###  | ###  | ###  | ###  | ###  | ###  | ###  | ###  | ###  | ###  | ###  | ###  | ###  | ###  | ###  | ###  |
| 07:00 | 23   | 24   | 22   | 23   | 22   | 23   | 24   | 23   | 22     | 25   | 24   | 24   | 24   | 23   | 24   | 22   | 23   | 22   | 23   | 24   | 23   | 22   | 25   | 24   | 24   |
| 10:00 | 24   | 24   | 23   | 24   | 22   | 23   | 22   | 23   | 24     | 23   | 22   | 25   | 24   | 24   | 24   | 23   | 24   | 22   | 23   | 22   | 23   | 24   | 23   | 22   | 25   |
| 13:00 | 25   | 24   | 24   | 24   | 23   | 24   | 22   | 23   | 22     | 23   | 24   | 23   | 22   | 25   | 24   | 24   | 24   | 23   | 24   | 22   | 23   | 22   | 23   | 24   | 23   |
| 16:00 | 23   | 22   | 25   | 24   | 24   | 24   | 23   | 24   | 22     | 23   | 22   | 23   | 24   | 23   | 22   | 25   | 24   | 24   | 24   | 23   | 24   | 22   | 23   | 22   | 23   |
| 19:00 | 23   | 24   | 23   | 22   | 25   | 24   | 24   | 24   | 23     | 24   | 22   | 23   | 22   | 23   | 24   | 23   | 22   | 25   | 24   | 24   | 24   | 23   | 24   | 22   | 23   |
| 22:00 | 23   | 22   | 23   | 24   | 23   | 22   | 25   | 24   | 24     | 24   | 23   | 24   | 22   | 23   | 22   | 23   | 24   | 23   | 22   | 25   | 24   | 24   | 24   | 23   | 24   |
| X =   | 23.5 | 23.3 | 23.3 | 23.5 | 23.1 | 23.3 | 23.3 | 23.5 | 22.8   | 23.7 | 22.8 | 23.7 | 23.0 | 23.5 | 23.3 | 23.3 | 23.5 | 23.1 | 23.3 | 23.3 | 23.5 | 22.8 | 23.7 | 22.8 | 23.7 |
| R =   | 2    | 2    | 3    | 2    | 3    | 2    | 3    | 1    | 2      | 2    | 2    | 2    | 2    | 2    | 2    | 3    | 2    | 3    | 2    | 3    | 1    | 2    | 2    | 2    | 2    |
|       |      |      |      |      |      |      |      |      |        |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | 2.09 |



Grafica 1. Monitoreo de temperatura de la incubadora sin luz, en la gráfica se observa la temperatura (línea negra), los límites inferior y superior de especificación de temperatura (líneas azules), los límites estadísticos reales inferior y superior del proceso (línea azul punteada), la media de especificación (línea roja) y la media real estadística de temperatura (línea roja punteada).

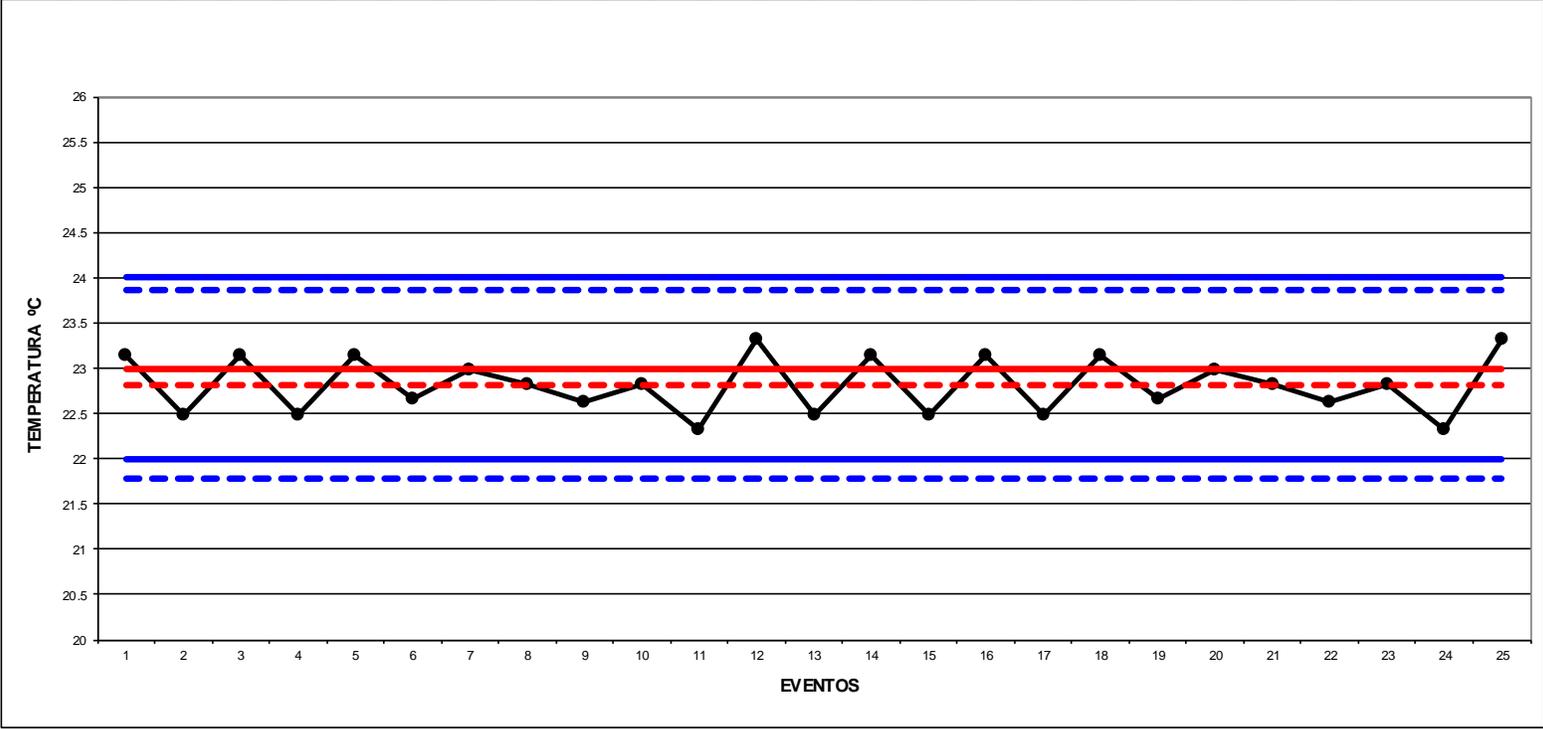


**CONTROL ESTADÍSTICO PARA LA INCUBADORA CON LUZ ROJA**

|                            |                              |                                  |  |                         |                     |          |            |            |  |
|----------------------------|------------------------------|----------------------------------|--|-------------------------|---------------------|----------|------------|------------|--|
| INCUBADORA<br>LUZ ROJA     | PERIODO<br>ABRIL-MAYO        | EQUIPO DE MEDICIÓN<br>TERMOMETRO | CARACTERÍSTICA VERIFICADA<br>TEMPERATURA | TAMAÑO DE MUESTRA<br>NA | GRAFICA No<br>X - R |          |            |            |  |
| FRECUENCIA<br>CADA 3 HORAS | ESPECIFICACION<br>22 A 24 °C |                                  |  |                         | LSE = 24            | X = 22.8 | LSC = 23.9 | Cr = 0.93  |  |
|                            |                              |                                  |  |                         | LIE = 22            | S = 0.31 | LIC = 21.8 | Cpk = 0.88 |  |

|       |      |      |      |      |      |      |      |      |        |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|--------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|       | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9      | 10   | 11   | 12   | 13   | 14   | 15   | 16   | 17   | 18   | 19   | 20   | 21   | 22   | 23   | 24   | 25   |
| FECHA | ###  | ###  | ###  | ###  | ###  | ###  | ###  | ###  | 11-abr | ###  | ###  | ###  | ###  | ###  | ###  | ###  | ###  | ###  | ###  | ###  | ###  | ###  | ###  | ###  | ###  |
| 07:00 | 22   | 23   | 23   | 23   | 23   | 23   | 22   | 23   | 21     | 23   | 23   | 25   | 23   | 22   | 23   | 23   | 23   | 23   | 23   | 22   | 23   | 21   | 23   | 23   | 25   |
| 10:00 | 25.0 | 23   | 22   | 23   | 23   | 23   | 23   | 23   | 22     | 23   | 21   | 23   | 23   | 25   | 23   | 22   | 23   | 23   | 23   | 23   | 23   | 22   | 23   | 21   | 23   |
| 13:00 | 23.0 | 23   | 25.0 | 23   | 22   | 23   | 23   | 23   | 23     | 23   | 22   | 23   | 21   | 23   | 23   | 25   | 23   | 22   | 23   | 23   | 22   | 23   | 23   | 22   | 23   |
| 16:00 | 23.0 | 21   | 23.0 | 23   | 25.0 | 23   | 22   | 22   | 23     | 23   | 23   | 23   | 22   | 23   | 21   | 23   | 23   | 25   | 23   | 22   | 23   | 23   | 22   | 23   | 23   |
| 19:00 | 23.0 | 22   | 23.0 | 21   | 23.0 | 23   | 25.0 | 23   | 22     | 23   | 23   | 23   | 23   | 23   | 22   | 23   | 21   | 23   | 23   | 25   | 23   | 22   | 23   | 23   | 23   |
| 22:00 | 23.0 | 23   | 23.0 | 22   | 23.0 | 21   | 23.0 | 23   | 25.0   | 22   | 22   | 23   | 23   | 23   | 23   | 22   | 23   | 21   | 23   | 23   | 23   | 25   | 23   | 22   | 23   |
| X =   | 23.1 | 22.5 | 23.1 | 22.5 | 23.1 | 22.7 | 23.0 | 22.8 | 22.6   | 22.8 | 22.3 | 23.3 | 22.5 | 23.1 | 22.5 | 23.1 | 22.5 | 23.1 | 22.7 | 23.0 | 22.8 | 22.6 | 22.8 | 22.3 | 23.3 |
| R =   | 3    | 2    | 3    | 2    | 3    | 2    | 3    | 1    | 4      | 1    | 2    | 2    | 2    | 3    | 2    | 3    | 2    | 3    | 2    | 3    | 1    | 4    | 1    | 2    | 2    |

Cpk = 1.28  
XT = 23



Grafica 2. Monitoreo de temperatura de la incubadora con luz roja, en la gráfica se observa la temperatura (línea negra), los límites inferior y superior de especificación de temperatura (líneas azules), los límites estadísticos reales inferior y superior del proceso (línea azul punteada), la media de especificación (línea roja) y la media real estadística de temperatura (línea roja punteada).



## 7.2 Resultados por el Método de Estría.

### 7.2.1 Análisis de las Muestras a Temperatura Ambiente con Incubación en oscuridad.

Estas muestras serán consideradas como las de control para comparar el crecimiento con las muestras incubadas en luz roja, verde y UV. El día de la incubación se considera como el día 1. Se realizó posteriormente el monitoreo de las muestras incubadas en oscuridad al día 3, 5, 7 y 9, esto debido a que no se espera un crecimiento acelerado, ya que la incubación se realizó a temperatura ambiente en vez de una incubación a la temperatura recomendada para el crecimiento de la *Pseudomona aeruginosa* que es de 37 °C. En la tabla 1, se muestran las imágenes de las placas con dos medios de cultivo diferentes Agar Bilis Rojo Violeta y Eosina Azul de Metileno. En la imagen del día 3 se observa que en ambas placas hay crecimiento en la estría posteriormente se observa que en las placas correspondientes al día 5, 7 y 9 no se muestran cambios en el crecimiento.



Imagen 7. Incubadora sin Luz

**Muestras Incubadas a Temperatura Ambiente y en Oscuridad.**

| Día    | 3  | 5  | 7   | 9  |
|--------|--|--|---|--|
| Bilis  |   |   |   |   |
| Eosina |  |  |  |  |

Tabla 1. Se muestra las placas de cultivo de *Pseudomona aeruginosa* en agar bilis y eosina, las muestras se incubaron en oscuridad y a temperatura ambiente. Las fotos representan el día 3, 5, 7 y 9. Se finaliza el monitoreo a los 9 días de incubación.

### 7.2.2 Análisis de las Muestras a Temperatura Ambiente con Incubación en Luz Roja.

En la tabla 2, se observa en la imagen tomada correspondiente al día 3 que hay crecimiento en la estría en ambas placas, El día de la incubación se considera como el día 1. Se realizó posteriormente el monitoreo de las muestras incubadas en obscuridad al día 3, 5, 7 y 9, esto debido a que no se espera un crecimiento acelerado, ya que la incubación se realizó a temperatura ambiente en vez de una incubación a la temperatura recomendada para el crecimiento de la *Pseudomona aeruginosa* que es de 37 °C. Se muestran las placas con dos medios de cultivo diferentes Agar Bilis Rojo Violeta y Eosina Azul de Metileno. En la imagen del día 3 se observa que en ambas placas hay crecimiento en la estría posteriormente se observa que en las placas correspondientes al día 5, 7 y 9 no se muestran cambios en el crecimiento.

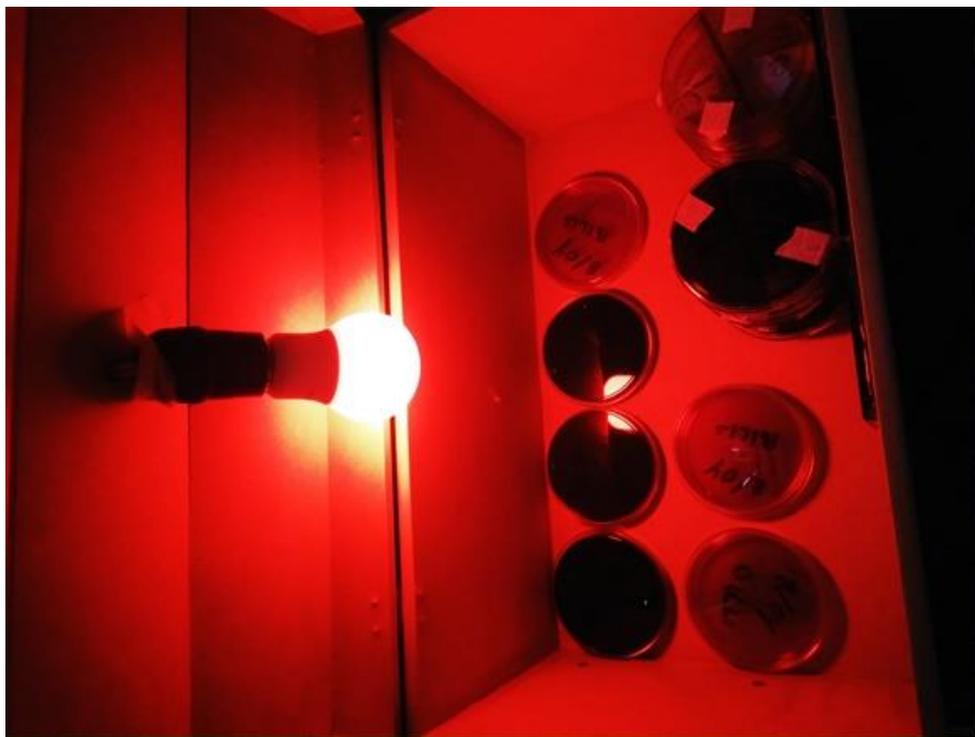


Imagen 8. Incubadora con luz roja.

**Muestras Incubadas a Temperatura Ambiente y en Luz Roja.**

| Día    | 3 | 5 | 7 | 9 |
|--------|---|---|---|---|
| Bilis  |   |   |   |   |
| Eosina |   |   |   |   |

Tabla 2. Se muestra las placas de cultivo de *Pseudomona aeruginosa* en agar bilis y eosina, las muestras se incubaron en luz roja y a temperatura ambiente. Las fotos representan el día 3, 5, 7 y 9. Se finaliza el monitoreo a los 9 días de incubación.

### 7.2.3 Análisis de las Muestras a Temperatura Ambiente con Incubación en Luz Verde.

En la tabla 3, se observa en la imagen tomada correspondiente al día 3 que hay crecimiento en la estría en ambas placas, El día de la incubación se considera como el día 1. Se realizó posteriormente el monitoreo de las muestras incubadas en obscuridad al día 3, 5, 7 y 9, esto debido a que no se espera un crecimiento acelerado, ya que la incubación se realizó a temperatura ambiente en vez de una incubación a la temperatura recomendada para el crecimiento de la *Pseudomona aeruginosa* que es de 37 °C. Se muestran las imágenes de las placas con dos medios de cultivo diferentes Agar Bilis Rojo Violeta y Eosina Azul de Metileno. En la imagen del día 3 se observa que en ambas placas hay crecimiento en la estría posteriormente se observa que en las placas correspondientes al día 5, 7 y 9 no se muestran cambios en el crecimiento.



Imagen 8. Incubadora con luz verde

**Muestras Incubadas a Temperatura Ambiente y en Luz Verde.**

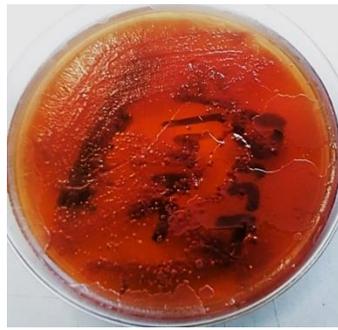
| Dia    | 3  | 5  | 7   | 9  |
|--------|--|--|---|--|
| Bilis  |   |   |   |   |
| Eosina |  |  |  |  |

Tabla 3. Se muestra las placas de cultivo de *Pseudomona aeruginosa* en agar bilis y eosina, las muestras se incubaron en luz verde y a temperatura ambiente. Las fotos representan el día 3, 5, 7 y 9. Se finaliza el monitoreo a los 9 días de incubación.

#### 7.2.4 Análisis de las Muestras a Temperatura Ambiente con Incubación en Luz UV.

En la tabla 4, se observa en la imagen tomada correspondiente al día 3 que hay crecimiento en la estría en ambas placas, El día de la incubación se considera como el día 1. Se realizo posteriormente el monitoreo de las muestras incubadas en obscuridad al día 3, 5, 7 y 9, esto debido a que no se espera un crecimiento acelerado, ya que la incubación se realizó a temperatura ambiente en vez de una incubación a la temperatura recomendada para el crecimiento de la *Pseudomona aeruginosa* que es de 37 °C. Se muestran las imágenes de las placas con dos medios de cultivo diferentes Agar Bilis Rojo Violeta y Eosina Azul de Metileno. En la imagen del día 3 se observa que en ambas placas hay crecimiento en la estría posteriormente se observa que en las placas correspondientes al día 5, 7 y 9 no se muestran cambios en el crecimiento.



Imagen 9. Incubadora con luz UV.

**Muestras Incubadas a Temperatura Ambiente y en Luz UV.**

| Día    | 3 | 5 | 7 | 9 |
|--------|---|---|---|---|
| Bilis  |   |   |   |   |
| Eosina |   |   |   |   |

Tabla 4. Se muestra las placas de cultivo de *Pseudomona aeruginosa* en agar bilis y eosina, las muestras se incubaron en luz UV y a temperatura ambiente. Las fotos representan el día 3, 5, 7 y 9. Se finaliza el monitoreo a los 9 días de incubación.

### 7.3 Resultados por el Método de Vaciado de Placa.

Con este procedimiento se logro hacer un conteo de las unidades formadoras de colonias ( $UFC/mL$ ), para cada una de las experimentaciones en incubación en luz obscura como las muestras de control y se realizó una comparación con las muestras incubadas en luz roja y verde, con estos resultados se pudo determinar el efecto de las luces en las muestras incubadas.

A diferencia del método por estría, con este procedimiento solamente se utilizó eosina y se descartó la luz UV debido a los resultados que se obtuvieron por el método antes dicho, debido a que la siembra con luz UV presento crecimiento inhibido o poco crecimiento, hecho por el cual se tomó la decisión de no correr la prueba de vaciado en placa con luz UV.

En la tabla 5, se muestra las imágenes obtenidas de las diferentes experimentaciones y los valores de las unidades formadoras de colonias. En total se realizaron 3 pruebas en fechas diferentes, la prueba 2 y 3 se realizaron solamente para obtener la confirmación del comportamiento del crecimiento. Por cada prueba se incubaron las muestras sin luz, luz roja y luz verde. Las imágenes mostradas en la tabla corresponden a la corrida 1, donde en la muestra incubada sin luz se obtuvo un valor de  $6.7 \times 10^{-7} UFC/mL$ , en la muestra incubada en luz roja se obtuvo un valor de  $6.6 \times 10^{-7} UFC/mL$  y por último en la muestra incubada en luz verde se obtuvo un valor de  $2.4 \times 10^{-7} UFC/mL$ .

### Conteo de Unidades Formadoras de colonias a Temperatura Ambiente

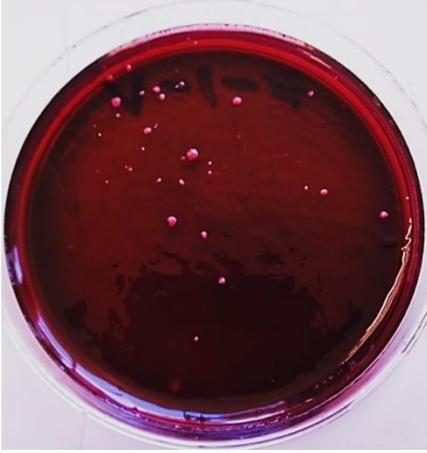
| Prueba | Sin Luz  | Luz Roja  | Luz Verde  |
|--------|--|---|--|
| 1      | <br>$6.7 \times 10^{-7} \text{ UFC/mL}$ | <br>$6.6 \times 10^{-7} \text{ UFC/mL}$ | <br>$2.4 \times 10^{-7} \text{ UFC/mL}$ |
| 2      | $4.6 \times 10^{-7} \text{ UFC/mL}$  | $4.2 \times 10^{-7} \text{ UFC/mL}$   | $2.8 \times 10^{-7} \text{ UFC/mL}$  |
| 3      | $5.2 \times 10^{-7} \text{ UFC/mL}$  | $4.8 \times 10^{-7} \text{ UFC/mL}$   | $2.9 \times 10^{-7} \text{ UFC/mL}$  |

Tabla 5. En la tabla se muestra el conteo de unidades formadoras de colonias, las imágenes corresponden a la prueba número 1, y representan los valores cuantitativos de la prueba 1.

## 7.4 Resultados del Efecto en el Medio de Cultivo.

El objetivo de esta investigación es el de determinar el efecto en el crecimiento que tiene el someter a diferentes tipos de luces a la *Pseudomona aeruginosa* sin embargo, durante el desarrollo de esta investigación observe que los medios de cultivo incubados en luz roja y verde se formaba un condensado en la superficie de la caja Petri, no así en los medios de cultivo que se incubaron en oscuridad. Dado este comportamiento y para descartar que el condensado fuera provocado por la *Pseudomona aeruginosa* y el tipo de luz a la cual estaba expuesta, decidí cambiar las placas Petri incubadas de control de la esterilización del medio de cultivo, este cambio consistió en meter las placas que se encontraban en la incubadora sin luz a la incubadora de luz roja y verde y el resultado fue, que se presentó condensación en la incubadora con luz roja y luz verde, posteriormente estas mismas cajas Petri las metí nuevamente a la incubadora sin luz y el resultado fue que ya no tenían condensado en la parte superior de la placa, en la tabla 6, se presentan imágenes del comportamiento y efecto de la luz roja y verde sobre el medio de cultivo sin inocular.

**Efecto de la Luz en Medio de Cultivo sin Cultivar**



Tabla 6. En la primera columna se muestra una de las placas de control de esterilidad incubada sin exposición a la luz durante 48 hr, la placa no presenta condensado, sin embargo, al introducirla a la incubadora con luz roja después de 48 hr presenta condensado como se muestra en la segunda columna. En la tercera y cuarta columna se muestran las placas en luz roja y verde respectivamente presentando condensado.



Otra característica observada en este fenómeno es que, las muestras en incubación en presencia de luz roja los condensados se presentaban en toda la superficie de la caja Petri, con gotas de agua grandes, mientras que en las placas incubadas en exposición a luz verde, presentaban gotas de agua más finas y compactas y no abarcaban toda la caja Petri.

## 8 Discusión.

Se inocularon tres pruebas; con una más como control: la muestra control es la que se incubo en oscuridad, mientras que la luz roja, verde y UV son las luces en las que se desea determinar si hay crecimiento bajo estas condiciones.

En todos los casos se muestra crecimiento de la *Pseudomona aeruginosa*. Cabe destacar que en la muestra incubada en luz roja y medio de cultivo eosina presenta varias colonias de conformación redondeada muy pronunciadas a diferencia de los demás cultivos como se observa en la imagen de la tabla 7, es importante tener presente, como indica Wu, que los procesos biológicos y ecológicos de las proteínas fotosensibles en bacterias no fotosintéticas; en este caso la *Pseudomona aeruginosa*, en gran medida son desconocidas en la actualidad (Wu, 2018).

Por otro lado en la investigación de Nagendran en *Pseudomona cichorii* JBC1, en exposiciones con luz roja obtuvo como resultado  $8.5 \times 10^8$  UFC/mL, en luz verde  $8.5 \times 10^8$  UFC/mL y en luz blanca  $8.7 \times 10^8$  UFC/mL, todas ellas a una intensidad de  $120 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , mientras que las que se sometieron en la oscuridad tuvieron un crecimiento  $8.7 \times 10^8$  UFC/mL (Nagendran, 2014). En esta



investigación de Nagendran, se concluye que no existe cambio significativo en el crecimiento de la bacteria al ser expuesta a luz roja y verde, estos resultados concuerdan con los obtenidos en mi investigación como se muestra en la tabla 7, en ella se comparan los resultados que obtuve el conteo de las unidades formadoras de colonias en los cultivos con los obtenidos en la investigación de Nagendran.

En el caso de los cultivos expuestos en luz UV, se presenta crecimiento, pero no es tan notorio como en las demás pruebas como se muestra en la tabla 7, esto quiere decir que la luz UV provoca una inhibición del crecimiento de la *Pseudomona aeruginosa*. Esto resultados concuerdan con los resultados de Propst que indica que la exposición de cultivos en luz de 371 nm (muy cercano a UV) y 420 nm (violeta), provoca la foto inactivación del pigmento plocianina (azulado), cuando se emplea luz de 550 nm (verde), 660 nm (rojo) y 740 nm (rojo lejano), se presentaba poco o ningún efecto, (Propst, 1979), estos resultados de Propst coinciden con los resultados obtenidos por Nagendran y por esta investigación.

**Comparativo de los resultados obtenidos con exposición en luz roja, verde y UV y, los resultados de la investigación de Nagendran.**

| Método                           | Sin Luz                                 | Luz Roja                                | Luz Verde                               | Luz UV |
|----------------------------------|---|---|---|--------|
| <b>Estría (Bilis)</b>            |   |   |   |        |
| <b>Estría (Eosina)</b>           |   |   |   |        |
| <b>Vaciado de Placa (Eosina)</b> | <br>$6.7 \times 10^{-7} \text{ UFC/mL}$ | <br>$6.6 \times 10^{-7} \text{ UFC/mL}$ | <br>$2.4 \times 10^{-7} \text{ UFC/mL}$ |        |
| <b>Resultados de Nagendran</b>   | $8.7 \times 10^{-8} \text{ UFC/mL}$     | $8.5 \times 10^{-8} \text{ UFC/mL}$     | $8.5 \times 10^{-8} \text{ UFC/mL}$     |        |

Tabla 7. Comparativo de los resultados obtenidos por el método de estría donde se observa que hay crecimiento teniendo en cuenta que en el medio de cultivo eosina las colonias son más pronunciadas y redondeadas que en el cultivo bilis, además de que las muestras en luz UV presenta poco crecimiento, por estas dos razones para el método de vaciado de placa se excluyó el agar bilis y la incubación en luz UV. El método de vaciado de placa donde se obtiene un conteo de unidades formadoras de colonia y la comparación de estos resultados con los obtenidos en la investigación de Nagendran.



## 9 Conclusiones.

El objetivo de esta investigación fue determinar si el emplear luz roja, verde y UV, podrían favorecer un crecimiento a mayor velocidad en comparación con la incubación sin luz. Se alcanzo el objetivo planteado, pude determinar dicho efecto de las luces sobre el crecimiento, concluyendo que no acelera el crecimiento de la bacteria, incluso el crecimiento de la bacteria fue menor en luz roja, y todavía menor en luz verde, por lo que se puede afirmar, partiendo de la longitud de onda que corresponde a la luz roja y mientras más se avanza en el espectro hacia la luz UV, el crecimiento se va desacelerando, afectando directamente el crecimiento de la *Pseudomona aeruginosa*.

Por otro lado las muestras incubadas por el método de vaciado en placa y que fueron incubadas sin exposición a ningún tipo de luz, las colonias formaron biofilms, esto es importante debido a que la justificación de realizar esta investigación radica en que el Tecnológico de Estudios Superiores de Coacalco tiene una investigación de degradación de tereftalato de polietileno de baja densidad por sus siglas en inglés (LDPE), utilizando la *Pseudomona aeruginosa*, y la formación del biofilm es de suma importancia para lograr la biodegradación.

Si bien el objetivo de esta investigación no era determinar el efecto de la luz roja, verde y UV en el medio de cultivo, lo observado durante el desarrollo en esta investigación, y que no me gustaría dejarlo de lado, es el hecho de que la luz si afecto el medio de cultivo, de forma que la luz roja provocaba una evaporación del agua contenida en el medio de cultivo provocando una condensación al momento de chocar con la tapa parte superior de la caja Petri, este mismo efecto ocurrió en la luz verde, pero con la diferencia en que en luz roja la evaporación fue mayor ya que presento visualmente gotas mas grandes y en toda la extensión de la placa a



diferencia de las que fueron expuestas en luz verde, donde las gotas eran mas pequeñas y no abarcaban toda la superficie de la placa. Una posible explicación a este fenómeno es que la longitud de onda del espectro electromagnético en la región de la luz roja y verde provoca vibración de las moléculas de agua, este efecto provoca que adquieran energía por dicha vibración permitiendo a las moléculas de agua liberarse de la estructura del agar.

## 10 Bibliografía.

- ASTM (2009). Biopelícula de *Pseudomona aeruginosa*. ASTM International Standards Worldwide.

[https://www.astm.org/SNEWS/SPANISH/SPMA09/e3515\\_spma09.html](https://www.astm.org/SNEWS/SPANISH/SPMA09/e3515_spma09.html)

- Brooks G. F., Carroll K. C., Morse S. A., Mietzner T. A. and Butel J. S. (2011). Microbiología Médica, Edición 25. Editorial Mc Graw Hill, Impreso en México. ISBN: 978-607-15-0503-3.
- Castellanos B. C. Manual de Procedimientos de Bioseguridad, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Fila G., Kawiak A. and Grinholc M. S. (2017). Blue light treatment of *Pseudomonas aeruginosa*: Strong bactericidal activity, synergism with antibiotics and inactivation of virulence factors Vol, 8, No. 6, 938-958.
- Ingraham J. L. and Ingraham C. A. (2004). Introducción a la Microbiología. Impreso en España, Editorial Reverte. ISBN 84-291-1870-5.



- La Bauve A. and Wargo M. J. (2015). Growth and Laboratory Maintenance of *Pseudomonas aeruginosa*.
- Mazzali de I. R. (2003). Nivel 2 de Bioseguridad, ISSN 1315-2556, pp 1-5.
- Merino L. A. (2007). *Pseudomona aeruginosa*: una bacteria con personalidades múltiples. ISSN 0325-7154431.
- Murray P. R. And Rosenthal K. S., (2007). Microbiología Medica Quinta Edición. Editorial Elsevier, Impreso en España. ISBN: 978-84-8174-927-4.
- Murray P. R. And Rosenthal K. S., (2009). Microbiología Medica Sexta Edición. Editorial Elsevier, Impreso en España. ISBN: 978-84-8086-465-7.
- Nagendran R. And Lee Y. H. (2014). Green and Red Light Reduces the Disease Severity by *Pseudomonas cichorii* JBC1 in Tomato Plants via Upregulation of Defense-Related Gene Expression,
- Olivas E. E. (2012). Manual de Practicas del Laboratorio de Microbiología. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Instituto de Ciencias Biomédicas
- Propst C. and Lubin L. (1979). Light-mediated Changes in Pigmentation of *Pseudomonas aeruginosa* Cultures, pp. 261-266.
- Ruiz M. L. (2007). Universidad de Barcelona. *Pseudomona aeruginosa*: Aportación al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a su resistencia a los antimicrobianos.
- Ryan K. J. and Ray C. G. (2011). Microbiología Medica Quinta Edición. Editorial Mc Graw Hill, Impreso en México. ISBN: 978-607-15-0554-5.

- Tippens P. E. (2011). Física Conceptos y Aplicaciones Séptima Edición. Editorial Mc Graw Hill, Impreso en México, ISBN: 978-607-15-0471-5.
- Tortora G. J., Funke B. R. and Case C. L. (2007). Introducción a la microbiología, Novena Edición. Editorial, Panamericana. Impreso en Argentina. ISBN 978-950-06-0740-7.
- Wu L., McGrane R. S. And Beattie (2018). Light Regulation of Swarming Motility in Pseudomonas syringae Integrates Signaling Pathways Mediated by a Bacteriophytochrome and a LOV Protein.
- Young H. D., Freedman R. A. and Ford A. L. (2009). Física Universitaria con Física Moderna Volumen 2, Decimosegunda Edición. Impreso en México, Editorial Pearson ISBN: 978-607-442-304-4.