

# Universidad de Guadalajara

## FACULTAD DE CIENCIAS



"Utilización del *Bacillus subtilis* para  
la valoración de un antibiótico (AVO-  
PARCINA) en la industria farmacéutica.

---

### TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A

SILVIA JUDITH GONZALEZ SANCHEZ

GUADALAJARA, JALISCO, JUNIO 1989

---

" UTILIZACION DEL BACILLUS SUBTILIS PARA  
LA VALORACION DE UN ANTIBIOTICO ( AVU ---  
PARCINA ) EN LA INDUSTRIA FARMACEUTICA.

TESIS PRESENTADA POR:  
SILVIA JUDITH GONZALEZ SANCHEZ.

DIRIGIDA POR:  
Q.F.B. ROSA MA. PUEBLA PEREZ.

## **C O N T E N I D O**

- 1        INTRODUCCION**
- 2        ANTECEDENTES**
- 3        HIPOTESIS**
- 4        OBJETIVOS**
- 5        MATERIAL Y METODOS**
- 6        RESULTADOS**
- 7        CONCLUSIONES**
- 8        BIBLIOGRAFIA**

## INTRODUCCION

El hombre fue primero inducido a estudiar a los microorganismos debido a los cambios que se presentaban en los alimentos de fácil descomposición y otros materiales que deseaba preservar. Aún antes de que los microorganismos fueran conocidos, se postuló una relación causa-efecto entre estos seres invisibles y ciertas enfermedades. Los microorganismos fueron incluso utilizados extensamente sin que las personas se percataran de su presencia. Tal es el caso de muchos productos alimenticios, en particular, los productos lácteos y las bebidas fermentadas; también se utilizaron en la manufactura del lino y en la producción de pólvora. Antes de que se inventara el microscopio y la observación de los microorganismos se hiciera realidad, transcurrieron siglos de infructuosa especulación y discusión relacionados a la existencia de las formas invisibles vivientes.

Los microorganismos siempre han sido populares entre los científicos porque grandes poblaciones requieren de poco espacio; además, se reproducen en cuestión de minutos o de horas y efectúan los procesos químicos de la vida innumerables veces y tan rápidamente como las formas de vida más evolucionadas. Tales propiedades le permiten al bacteriólogo mantener "una cepa reproductora" en un pequeño estante ó en un refrigerador. El geneticista puede tener a los descendientes de una especie en mil generaciones en tan sólo unos cuantos días, siendo capaz de realizar experimentos en días ó semanas, que ordinariamente le llevaría toda una vida si utilizara plantas ó animales superiores. En un cultivo intensivo de microorganismos, millares de ellos darán lugar a otros tantos, en un tiempo de generación de minutos, horas ó un día.

Este crecimiento rápido, ha influido en la imaginación de personas que están buscando las formas de aliviar la futura escasez de alimentos o remediar la deficiencia proteica de muchas dietas observadas en la actualidad. Los microorganismos viven en una gran variedad de materiales, incluyendo productos de desecho de muchos otros seres vivos. También crecen en materia orgánica de poco valor económico, tales como aceite crudo al cual se le ha suplementado con minerales. Por lo tanto, los microorganismos ofrecen la esperanza de limpiar algunos desórdenes que el hombre ha hecho en el medio ambiente y de proveer alimentos de alto grado proteico a bajo costo, ya sea para el ganado o para el consumo humano. Posiblemente estos dos logros puedan combinarse. En algunas ocasiones el químico utiliza los microorganismos para llevar a cabo algún cambio estructural en un compuesto orgánico de elevado peso molecular: dicho cambio sería difícil de realizar por los métodos químicos convencionales. (14)

Por otra parte, la idea de producir grandes cantidades de proteínas virales, animales y humanas, utilizando bacterias, se ha hecho realidad, pues muchos de los nuevos productos como antibióticos, hormonas, anticuerpos, proteínas, etc. son consecuencia de su síntesis. (5)

Una de las bacterias utilizadas en la experimentación es el *Bacillus subtilis*, organismo que forma esporas y sólo se desarrolla en presencia de oxígeno libre. En su mayoría son formas saprófitas, prevaletentes en el suelo, aire, heno, polvo, agua, leche y sobre vegetales diversos. Es un microorganismo NO PATOGENO (hasta donde se conoce actualmente) que se reproduce fácilmente, lo que lo hace atractivo para ser usado en áreas de detección, experimentación y desarrollo. (2)

El microorganismo *Bacillus subtilis* es utilizado ampliamente en la evaluación de antibióticos.

Los antibióticos, definidos etimológicamente, son algo que produce la destrucción de la vida, de manera que, cualquier agente mecánico, físico ó químico capaz de matar sería un antibiótico, pero no puede tomarse en cuenta dicho concepto.

Todo microorganismo que crece en un medio natural, está sujeto a relaciones favorables ó desfavorables debido a la presencia de otros microorganismos. Dos gérmenes asociados pueden ejercer influencia favorable uno sobre el otro (simbiosis), ó desfavorable (antibiosis); toda sustancia producida por un microorganismo en condiciones de antibiosis se le denomina antibiótico.

Teniendo en cuenta los conceptos de Waksman, un antibiótico se define como una sustancia química derivada ó producida por microorganismos que tiene la capacidad, a bajas concentraciones, de inhibir el desarrollo ó destruir a otros microorganismos. (11)

Además de su uso en el campo de la medicina, algunos antibióticos como por ejemplo la avoparcina, se incorporan en el forraje de animales domésticos pues, se ha comprobado que ayudan en el aumento de peso de los mismos, propiedad muy útil en la engorda de ganado vacuno, porcino y aves de corral.

No se sabe aún si tal efecto es debido a la destrucción de gérmenes nocivos, a la estimulación del desarrollo de bacterias útiles (por ejemplo las productoras de vitaminas) ó a algún efecto directo sobre el animal mismo. (13)

Algunos autores estiman como grave inconveniente la presencia de antibióticos en la carne ó leche de éstos animales, ya que podrían sensibilizar al consumidor del alimento a la droga, y si en fecha posterior requieren de terapéutica con la misma, podrían presentarse reacciones indeseables. (7)

## ANTECEDENTES

Todos los antibióticos deben estar sujetos a rigurosas pruebas de control de calidad. La eficacia de éstos fármacos se demuestra con la inhibición del crecimiento que efectúan sobre microorganismos específicos bajo condiciones especiales.

Los cambios sutiles debidos a su disminución en la actividad antimicrobiana que aún no se pueden demostrar por métodos químicos, sí son demostrables mediante valoraciones de tipo microbiológico, utilizando cultivos de microorganismos de reconocida calidad. En el caso de éste estudio, se utilizó el microorganismo NO PATOGENO *Bacillus subtilis* debido a su gran sensibilidad a los antibióticos.

### DESCRIPCION DEL MICROORGANISMO BACILLUS SUBTILIS

Es un organismo que pertenece a la familia Bacillaceae, aerobio obligado que sólo se desarrolla en presencia de oxígeno libre. (2)

FORMA: Bastones grandes, rectos ó curvos con extremos redondeados.

AGRUPAMIENTO CELULAR: Aislado, casi nunca se agrupa formando cadenas.

GRAM POSITIVO: Tiñe uniformemente.

ESPORAS: Endosporas de 0.8 a 1.5-1.8 micras. Ecuatoriales, subterminales, ovals. La superficie de las esporas libres tiñe tenuemente. En la germinación, la capa esporular rompe ecuatorialmente y después de la emergencia

gencia de la célula vegetativa, la lisis de la cubierta esporular es muy lenta.

TEMPERATURA OPTIMA DE DESARROLLO: 37°C

TERMODURICOS: Las esporas resisten ebullición durante horas.

HABITAT: Organismos saprófitos, prevaecientes en el suelo, - aire y sobre vegetales diversos. (2)

La energía utilizada en el metabolismo es en su mayor parte de procedencia respiratoria siendo el oxígeno el aceptor terminal de electrones.

Descomponen pectinas y polisacáridos de tejidos vegetales y algunas cepas producen putrefacción en tubérculos de papas.

En medio complejo que contenga glucosa y en condiciones anaerobias, el crecimiento y la fermentación son débiles.

La entrada de oxígeno permite un crecimiento abundante - con formación de 2,3 butanodiol acetofn y bióxido de carbono como sus principales productos.

Oxidan carbohidratos y proteínas en forma bastante compleja.

El principal producto de almacenamiento celular es un glucógeno parecido a carbohidrato.

REACCIONES DE IDENTIFICACION: Catalasa positiva  
Hidrólisis de caseína  
No descompone tirosina  
Hemólisis variable  
No produce lecitinasa  
Produce un antibiótico polipeptídico llamado bacitracina. (2)

**PODER PATOGENO:** La mayor parte de las cepas no son patógenas - pero pueden producir a veces conjuntivitis, iridocoroiditis ó panoftalmia en el hombre. Es porádicamente en enfermedades caquéticas inva de el torrente circulatorio. Rara vez causa - septicemia en animales inmaduros. (9)

**PUEDEN CAUSAR PROBLEMAS EN:**

**CARNE:** Licúan rápidamente la gelatina.

**PRODUCTOS TEXTILES:** Tiñen u originan cambios de color en el - material por la formación del pigmento ó esporas coloreadas. Atacan directamente a las fibras con la consecuente pérdida de la resistencia.

**USOS BENEFICOS:** En el curado del tabaco actúa mejorando aroma y textura. Produce cambios oxidativos en los que se pierde alrededor del 28% de nicotina y aumenta el de ácido cítrico.

Productor de algunos antibióticos.(1)

#### APLICACIONES DEL BACILLUS SUBTILIS EN LA VALORACION MICROBIOLOGICA DE ANTIBIOTICOS

El Bacillus subtilis es un microorganismo que se utiliza para valoraciones microbiológicas de antibióticos debido a su gran sensibilidad a dichos fármacos.

El crecimiento de éste microorganismo se inhibe en forma proporcional a concentraciones determinadas del antibiótico.

La inhibición del crecimiento puede ser cuantificada y éste principio es el que se aprovecha para valorar la potencia de acción real de un antibiótico al comparar contra una curva estándar obtenida a partir de concentraciones conocidas de un antibiótico puro.

La actividad antimicrobiana se mide in vitro para determinar:

- 1.- La potencia de un agente antibacteriano en solución;
- 2.- Su concentración en los líquidos del cuerpo ó en tejidos,
- 3.- La sensibilidad de un microorganismo dado a concentraciones conocidas del medicamento.

La determinación de éstas cantidades puede realizarse por uno de los siguientes dos métodos principales: dilución y ó difusión. (11)

Utilizando un microorganismo estándar apropiado de prueba, y una muestra conocida de medicamento para la comparación, pueden emplearse estos métodos para estimar tanto la potencia del antibiótico en la muestra como la "sensibilidad" del microorganismo.

A) PRUEBAS DE DILUCION: En éstas pruebas se incorporan cantidades graduadas de las sustancias antimicrobianas en medios bacteriológicos líquidos ó sólidos; los medios se inoculan después con las bacterias de prueba y se incuban. El punto final se toma como la cantidad de sustancia antimicrobiana requerida para inhibir el crecimiento, o para matar a las bacterias de prueba. Las pruebas de sensibilidad por dilución en agar, consumen más tiempo y su uso está limitado a circunstancias especiales. Las pruebas de dilución en caldo eran fastidiosas y se emplean poco; sin em-

bargo, el advenimiento de series preparadas de diluciones de caldo para numerosos medicamentos diferentes, en placas para microtitulación, ha incrementado y simplificado mucho éste mé todo. La ventaja de las pruebas de microtitulación con diluciones de caldo consiste en permitir el informe de un resultado cuantitativo que indique la cantidad necesaria de un medicamento dado para inhibir (o matar) los microorganismos probados.

B] METODO DE DIFUSION: Este método consiste en colocar un disco de papel filtro, una copa porosa o un cilindro sin fondo, conteniendo cantidades medidas de medicamento sobre un medio sólido que ha sido sembrado previamente en forma abundante con el microorganismo de prueba. Después de la incubación, se toma el diámetro de la zona clara de inhibición que rodea al depósito del medicamento, como medida de el poder inhibitor de ella contra ese microorganismo de prueba en particular.

Es obvio que este método está sujeto a muchos factores físicos y químicos, además de la simple interacción del medicamento y los microorganismos ( por ejemplo, naturaleza del medio, difusibilidad, tamaño molecular y estabilidad del medicamento). Sin embargo, la estandarización de éstas condiciones permite un ensayo cuantitativo de la potencia del medicamento ó de la sensibilidad del microorganismo.

Cuando se determina la sensibilidad bacteriana por el método de difusión, la mayor parte de los laboratorios emplean discos de papel filtro impregnados con antibióticos; a partir del disco se produce por difusión un gradiente de concentración del antibiótico en el medio. Como la difusión

es un proceso continuo, el gradiente de concentración nunca es estable por largo tiempo; sin embargo, puede lograrse alguna estabilización permitiendo que la difusión se inicie antes de que comience el crecimiento bacteriano. La dificultad principal está en las diferentes velocidades de crecimiento para los diversos microorganismos y debe corregirse variando la densidad del inóculo.

La interpretación de los resultados de las pruebas de difusión debe estar basada en comparaciones entre los métodos de dilución y difusión. Tales comparaciones han llevado a establecer estándares internacionales de referencia. Las líneas de regresión pueden expresar la relación entre el logaritmo de la concentración mínima inhibitoria en las pruebas de dilución y el diámetro de las zonas de inhibición en las pruebas de difusión.

El uso de un disco sencillo para cada antibiótico con estandarización cuidadosa en las condiciones de la prueba, permite el informe de S(susceptible) ó R(resistente) para un microorganismo al comparar el tamaño de la zona de inhibición contra un estándar del mismo medicamento (método de Kirby-Bauer). (11)

#### FACTORES QUE PUEDEN AFECTAR LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN LA VALORACION MICROBIOLOGICA DE UN ANTIBIOTICO.

- 1.- pH DEL MEDIO: Algunos medicamentos son más activos a pH ácido; otros a pH alcalino.
- 2.- COMPONENTES DEL MEDIO: El sulfonato de polianetol sódico y otros detergentes aniónicos inhiben a los aminoglucósidos notoriamente. Las proteínas séricas fijan a las penicilinas en grado variable, yendo desde 40% para la metici

lina hasta 98% para la dicloxacilina.

- 3.- ESTABILIDAD DE LOS MEDICAMENTOS: A la temperatura de la incubadora, varios agentes antimicrobianos pierden su actividad. La clorotetraciclina se inactiva rápidamente y la penicilina más lentamente, mientras que los aminoglucósidos, el cloramfenicol ó la polimixina B son bastante estables por largos periodos.
- 4.- TAMANO DEL INOCULO: En general, cuanto más grande sea el inóculo bacteriano, más baja será la "sensibilidad" aparente del microorganismo. Las grandes poblaciones bacterianas se inhiben en forma menos rápida y completa que las pequeñas; además, la posibilidad de que se produzca en forma accidental una mutante resistente es mucho mayor en las grandes poblaciones.
- 5.- DURACION DE LA INCUBACION: En muchos casos los microorganismos no mueren cuando se exponen en un tiempo corto a los agentes antimicrobianos, sino que solamente se inhibe su multiplicación. Cuanto más tiempo se prolonga su incubación, mayor es la oportunidad que tienen de presentarse las mutantes resistentes o mayor es la oportunidad de los miembros menos sensibles de la población bacteriana de empezar a multiplicarse tan pronto como el medicamento se descompone.
- 6.- ACTIVIDAD METABOLICA DE LOS MICROORGANISMOS: En general, los microorganismos que crecen rápida y activamente son más sensibles a la acción de los medicamentos que aquellos que se encuentran en la fase de reposo. Las bacterias "persistentes" son aquellas metabólicamente inactivas, las cuales sobreviven a exposiciones largas a los me

dicamentos, pero cuya descendencia es completamente susceptible al mismo medicamento. Una forma especializada de microorganismos "persistentes" pueden ser las formas L - de las bacterias. Bajo el tratamiento con ciertos medicamentos que inhiben la formación de la pared celular, las formas deficientes en la misma pueden desarrollarse en algunos tejidos que poseen propiedades osmóticas adecuadas (por ejemplo, médula de riñón). Estos protoplastos pueden persistir en los tejidos mientras se administra el medicamento (por ejemplo, penicilina) y posteriormente regresar a las formas bacterianas intactas, dando lugar a recaídas de la enfermedad.

#### ANTIBIOTICO AVOPARCINA

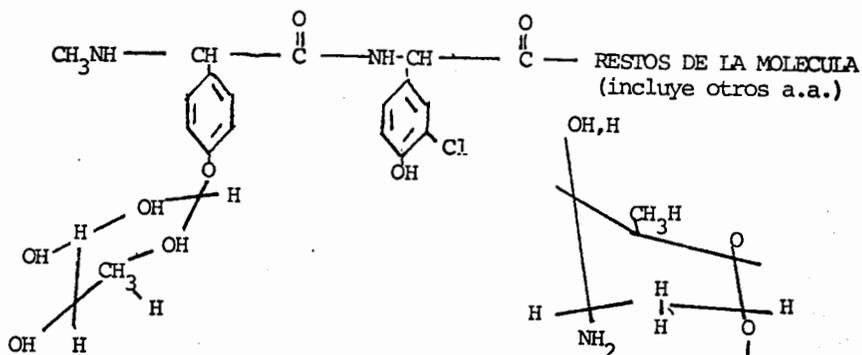
Los antibióticos tienen en la actualidad, además del uso terapéutico, un amplio uso como estimulantes de crecimiento utilizados en dosis mínimas, que mejoran la conversión alimenticia de los animales y promueven una mejor ganancia de peso. Es éste el uso que en la actualidad se le está dando a la "AVOPARCINA" de la cual hablaremos a continuación:

La AVOPARCINA es un antibiótico de tipo glucopéptido, - producido por fermentación de una cepa de *Streptomyces candidus*.

NOMBRE GENERICO: Avoparcina

SINONIMIA: CL-81, CL-588 y AV-290

ESTRUCTURA MOLECULAR:



PESO MOLECULAR: Aproximadamente 1,500 determinado por osometría de presión a vapor y por membrana.

COMPOSICION PORCENTUAL PROMEDIO: Determinada por análisis microanalítico.

C =	53.11
H =	6.04
O =	3.04
N =	6.12
Cl =	3.34
N-CH <sub>3</sub> =	0.60

La avoparcina es un polvo blanco, amorfo e higroscópico, soluble en agua, metilformamida, dimetilsulfóxido y ligeramente soluble en metanol.

En la siguiente tabla se reseña la concentración mínima inhibitoria (microgramos/ml.), de AVOPARCINA, contra una serie de microorganismos cultivados en condiciones adecuadas. Estos datos muestran la actividad antibacteriana específica de la AVOPARCINA contra las bacterias Gram-positivas.

Igualmente se puede observar que a niveles de 100 mcg/ml ó menos, es inactiva contra las bacterias Gram-negativas. (13)

CONCENTRACION INHIBITORIA MINIMA DE AVOPARCINA (mcg/ml.)

MICROORGANISMO	CONDICIONES DE CULTIVO	
	AEROBIAS	ANAEROBIAS
GRAM POSITIVAS		
<i>Staphylococcus aureus</i> Rose	6.25	6.25
<i>S. aureus</i> Smith	5.00	5.00
<i>S. pyogenes</i> C-203	0.78	0.78
<i>Bacillus cereus</i> No. 4	-	1.00
<i>B. globijii</i>	1.00	0.50
<i>B. subtilis</i> ATC 6633	1.56	0.78
<i>Corynebacterium xerosis</i> NRRL B	0.39	0.39
<i>Enterococcus</i> GK	3.12	3.12
<i>Sarcina lutea</i>	1.56	1.00
<i>Clostridium sporogenes</i>	-	0.39
<i>C. welchii</i>	-	0.39
<i>C. septicum</i>	-	0.50
GRAM NEGATIVAS		
<i>Escherichia coli</i> U311	>100	>100
<i>Klebsiella pneumoniae</i> A	"	"
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC9484	"	"
<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 10145	"	"
<i>Salmonella gallinarum</i>	"	"
<i>Salmonella typhosa</i> 6539	"	"
<i>Shigella shiga</i>	"	"

Se puede observar la relevante actividad de Avoparci na contra los gérmenes del género *Clostridium*, teniendo en cuenta que se relaciona éste tipo de bacterias, con efectos depresivos inespecíficos de crecimiento, aparte de su responsabilidad más directa, en enfermedades tales como enteritis necrótica y ulcerativa que atacan tan frecuentemente a los animales domésticos, destinados para consumo humano.(13)

La Avoparcina es atóxica por ingestión y virtualmente atóxica en administración parenteral. Este antibiótico no se absorbe en el tracto intestinal y se elimina rápidamente. Su no absorción se ha confirmado por la ausencia de niveles detectables en sangre en el hombre, perro, rata y pollos.

Una vez que la Avoparcina es eliminada del organismo, se degrada fácilmente y con rapidez en componentes inactivos.(13)

## H I P O T E S I S

Debido a que en nuestro medio se dispone de escasa información práctica y teniendo en cuenta que son muy pocos los microorganismos que pueden utilizarse en la valoración microbiológica de antibióticos, además conociendo las ventajas que - desde el punto de vista de seguridad, facilidad en su reproducción y economía que tiene el *Bacillus subtilis* sobre otros microorganismos, consideramos propio el realizar la valoración microbiológica del antibiótico AVOPARCINA utilizando dicho microorganismo el cual no es patógeno (hasta donde se conoce actualmente) y además se reproduce fácilmente, motivos - que lo hacen atractivo para ser usado en áreas de detección, experimentación y desarrollo.

## O B J E T I V O S

1. Describir características y propiedades del micro organismo Bacillus subtilis que lo hacen ser de gran utilidad en la investigación, experimentación y desarrollo.
2. Utilizar el microorganismo Bacillus subtilis en la valoración microbiológica de un antibiótico, describiendo la metodología y aplicándola prácticamente para valorar "AVOPARCINA" en una industria farmacéutica.

## MATERIAL Y METODOS

El ensayo microbiológico para la determinación del anti--biótico Avoparcina, se realizó por medio del método de difu--sión y está basado en la inhibición del crecimiento que la Avo--parcina produce sobre el microorganismo de prueba, que en éste caso es el Bacillus subtilis.

De el AVOTAN 50 (mezcla de cascarilla de arroz y Avopar--cina al 5%) se extrajo la Avoparcina con una mezcla de acetona, ácido clorhídrico y agua. Después de centrifugar, al extracto clarificado se le determinó su actividad antibiótica.(15)

### PREPARACION DEL MICROORGANISMO DE PRUEBA (SUSPENSIÓN DE ESPORAS)

Se proliferó el Bacillus subtilis en un tubo con agar le--che inclinado, por un lapso de tiempo de 18 a 20 horas en un in--cubador a temperatura de 35-37°C, éste incubador con un flujo - de aire controlado para prevenir el secado del agar.

Se suspendió el crecimiento obtenido, en 5 ml de agua des--tilada estéril para recolectar el microorganismo.

Se utilizaron 0.15 ml de la suspensión de esporas de Ba--cillus subtilis para cada 1000 ml de agar preparado.

### PREPARACION DE LAS SOLUCIONES ESTANDAR:

SOLUCION MADRE: Se pesaron 50 mg. de estándar de Avoparci--

na la cual tiene una concentración de 1000 mcg/mg. y se colocaron en un matraz volumétrico de 50 ml., se aforó con agua destilada para obtener una concentración final que fuese de 1000 mcg/ml y se conservó esta solución por no más de dos semanas en el refrigerador a 4°C.

De la solución obtenida se tomaron 8 ml y se pasaron a un matraz volumétrico de 100 ml aforando con solución buffer de fosfato de potasio monobásico a pH de 4.5.

La concentración final de ésta solución es de 80 mcg/ml (solución patrón).

SOLUCIONES ESTANDAR: Estas soluciones se hicieron a partir de la solución patrón del estándar y se aforaron a 100 ml con buffer pH 4.5 de fosfato de potasio monobásico como sigue:

SOLUCION A: Se tomaron 10 ml de la solución patrón y se aforaron a 100 ml obteniendo así la concentración final de 8.0 mcg/ml.

SOLUCION B: Se tomaron 5.0 ml de la solución patrón y se aforaron a 100 ml obteniendo la concentración de 4.0 mcg/ml.

SOLUCION C: Se tomaron 2.5 ml de la solución patrón y se aforó a 100 ml obteniendo la concentración de 2.0 mcg/ml

Las soluciones D y E, se hicieron a partir de la solución de trabajo A, de la manera siguiente:

SOLUCION D : Se tomaron 12.5 ml de la solución A y se aforaron a 100 ml, obteniendo así la concentración de 1.0 mcg/ml.

SOLUCION E : Se tomaron 6.25 ml de la solución A y se aforó a 100 ml obteniendo una concentración de 0.5 mcg/ml.

PREPARACION DE LAS MUESTRAS DE AVOTAN ( EXTRACCION DE LA AVOPARCINA)

Estos productos como el AVOTAN 50 son una mezcla de Avoparcina con cascarilla de arroz y es como se encuentran en el mercado, su concentración en éste caso es de 50 ppm de AVOPARCINA.

El procedimiento para la extracción del principio activo del AVOTAN 50 es el siguiente:

Se pesaron en la balanza analítica 5 gramos de muestra y se colocaron en un matraz volumétrico de 250 ml.

Se adicionaron 100 ml de reactivo ácido acetona (65% acetona, 2.5% HCl y 32.5% H<sub>2</sub>O destilada) y se agitó por un tiempo de 30 minutos en un agitador recíproco (New Brunswick mod. G-26).

Se checó el pH del extracto y si éste resultó mayor de 2.5 entonces se ajustó de 1.0 a 2.5 con HCl concentrado.

Una vez ajustado, se colocaron 30 ml del extracto en un tubo para centrifuga provisto de tapón de baquelita y se

centrifugó a 3000 rpm por un lapso de 10 minutos.

Se decantó el sobrenadante en un tubo roscado y se procedió a la dilución del extracto hasta llegar a una concentración final de 2.0 mcg/ml basándose en la potencia estimada ó teórica.

Esta potencia estimada es la concentración de AVOPARCINA (50 ppm) a la que se debe llegar cuando se fabrica el AVOTAN 50, es decir, la potencia estimada para que el producto se encuentre dentro de las especificaciones de control de calidad.(15)

#### PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO

Se pesó la cantidad necesaria de medio No. 1 para ensayo de antibióticos (MERCK). Una vez esterilizado en autoclave durante 20 minutos a una temperatura de 120°C y presión de 1.5 lb/cm<sup>2</sup>, se enfrió para iniciar la adición del microorganismo a una temperatura no mayor de 52 °C.

#### INOCULACION DEL MICROORGANISMO DE PRUEBA:

Se inoculó el agar previamente enfriado a la temperatura indicada, con la cantidad probada de suspensión de esporas (generalmente 0.15 ml / 1000 ml de agar) de Bacillus subtilis.

Se mezcló perfectamente el agar inoculado en un agitador magnético antes de ser vaciado a las placas.

## PREPARACION DE LAS PLACAS

Se utilizaron 10 placas para la obtención de la curva estándar, o sea, dos por cada una de las concentraciones estándar y dos placas más también por cada una de las soluciones problema.

Se distribuyó uniformemente en cada placa 25 ml de agar No. 1 para antibióticos ya inoculado y se dejó solidificar en una superficie plana.

Una vez que se solidificó el agar inoculado con el *Bacillus subtilis*, se hicieron las perforaciones sobre el agar de cada placa. La ubicación de las perforaciones fué equidistante una de la otra.

Posteriormente se adicionaron 0.1 ml de las soluciones A, B, C, D y E (soluciones estándar) y 0.1 ml de las soluciones procedentes de las muestras a valorar (soluciones problema) a cada uno de los orificios en las respectivas placas que previamente fueron marcadas.

Una vez que se llenaron las placas con las soluciones tanto estándar como problema, se transportaron cuidando que no hubiera derramamiento de las soluciones ya que, éste hecho podía darnos resultados erróneos.

Se incubaron las placas, tanto las correspondientes al estándar como las de las muestras, por un lapso de 16 a 20 horas a 35-37°C. Una vez terminado el tiempo de incubación, se sacaron las placas y se dejaron a temperatura ambiente para proceder a la lectura.

Se midieron las zonas de inhibición de crecimiento para cada una de las placas con la ayuda de un Vernier y se promediaron los valores.

## RESULTADOS

Los valores de los diámetros de los halos de inhibición de crecimiento tanto para cada una de las soluciones estándar como para las soluciones problema, se pueden observar en las tablas correspondientes.

En las gráficas se dispuso el promedio total de los diámetros de los halos de inhibición formados -- por la adición de las soluciones estándar A, B, C, D y E, contra la concentración del antibiótico en microgramos o unidades por mililitro.

Se trazó la curva estándar así como también la recta ideal que abarcara la mayoría de los puntos. Para calcular los puntos extremos de la recta se utilizaron las siguientes ecuaciones estadísticas que incluyen los valores experimentales obtenidos:

$$L = \frac{3A + 2B + C - E}{5} \qquad H = \frac{3E + 2D + C - A}{5}$$

L = Valor de la zona de inhibición calculada para la concentración más baja de la curva.

H = Valor de la zona de inhibición calculada para la concentración más alta de la curva.

2

Se graficaron los valores obtenidos para L y H y se unieron los puntos con una línea recta.

Para obtener el resultado de las muestras, se leyó directamente la potencia de cada preparación - por valorar, en la curva patrón.

Para obtener la potencia microbiológica del - AVOTAN 50, se aplicó la siguiente fórmula:

$$\%AVOPARCINA = \frac{A \times B}{C}$$

en donde:

A = Lectura en gráfica (mcg/ml)

B = Peso de la muestra (gramos)

C = Concentración de la dilución C (mcg/ml)

Los resultados de los cálculos de la potencia - microbiológica de los lotes de AVOTAN 50 analizados se pueden ver en las págs. 26,30,34,38 y 42.

LECTURA EN CMS. DE LOS HALOS DE INHIBICION FORMADOS CON

LA ADICION DE LAS SOLUCIONES STANDARD

AVOTAN 50      LOTE: 01

		S O L U C I O N E S									
		A	B	C	D	E					
P L A C A S	1	1.76	1.66	1.54	1.44	1.29					
		1.80	1.65	1.54	1.43	1.29					
		1.80	1.68	1.55	1.43	1.30					
		1.73	1.68	1.54	1.44	1.29					
		1.78	1.65	1.56	1.54	1.29					
		1.79	1.65	1.56	1.54	1.29					
2	1.79	1.65	1.53	1.41	1.30						
	1.77	1.64	1.53	1.41	1.30						
	1.76	1.68	1.52	1.43	1.29						
	1.75	1.68	1.52	1.43	1.29						
	1.76	1.66	1.54	1.43	1.28						
	1.76	1.66	1.54	1.43	1.28						

## LECTURA EN CMS. DE LOS HALOS DE INHIBICION FORMADOS CON LA

## ADICION DE LAS SOLUCIONES PROBLEMA

AVOTAN 50      LOTE: 01

		S	O	L	U	C	I	O	N	E	S
		S/L 1	S/L 2	S/L 3	S/L 4	S/L 5	S/L 6	S/L 7	S/L 8	S/L 9	S/L 10
P L A C A S	1	1.92	1.54	1.53	1.53	1.56	1.55	1.58	1.53	1.56	1.55
		1.95	1.55	1.53	1.56	1.56	1.55	1.58	1.51	1.54	1.55
		1.90	1.58	1.55	1.56	1.56	1.54	1.56	1.51	1.51	1.50
		1.93	1.57	1.55	1.56	1.54	1.50	1.56	1.54	1.54	1.50
		1.90	1.54	1.57	1.54	1.52	1.52	1.56	1.54	1.53	1.52
		1.90	1.55	1.57	1.51	1.51	1.56	1.56	1.58	1.57	1.57
2	1.94	1.56	1.56	1.52	1.52	1.52	1.52	1.50	1.54	1.54	
	1.96	1.58	1.54	1.53	1.52	1.56	1.53	1.53	1.55	1.52	
	1.91	1.58	1.54	1.53	1.52	1.58	1.51	1.50	1.52	1.52	
	1.92	1.56	1.54	1.56	1.50	1.55	1.50	1.50	1.54	1.50	
	1.93	1.55	1.56	1.58	1.52	1.53	1.53	1.57	1.52	1.51	
	1.93	1.55	1.56	1.53	1.54	1.51	1.53	1.50	1.52	1.52	

S/L = SUBLOTE

AVOTAN - 50

LOTE 01PROMEDIOS DE LECTURAS DE LOS HALOS DE INHIBICIONPROMEDIOS DE CURVA STANDARD:

<u>DILUCION</u>	<u>LECTURA PROMEDIO</u> (CM)
A	1.77
B	1.66
C	1.53
D	1.43
E	1.29

PROMEDIOS DE SOLUCIONES PROBLEMA:

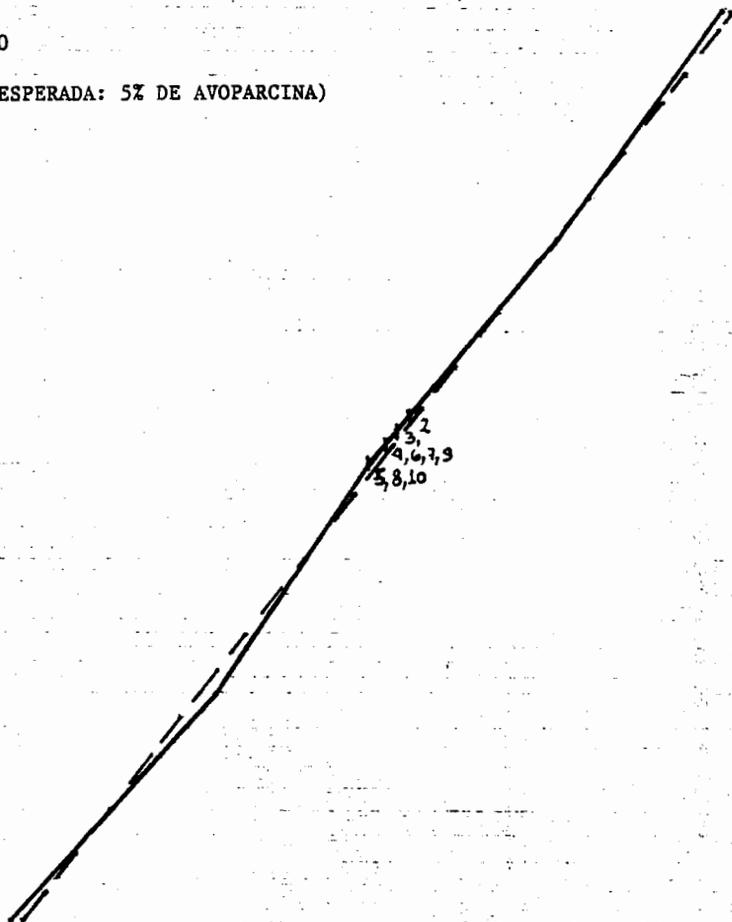
<u>SUBLOTE</u>	<u>LECTURA PROMEDIO</u>	<u>POTENCIA MICROBIOLÓGICA</u>
1	1.92	(repetir)
2	1.56	5.82
3	1.55	5.60
4	1.54	5.30
5	1.53	5.00
6	1.54	5.30
7	1.54	5.30
8	1.53	5.00
9	1.54	5.30
10	1.53	5.00

PROMEDIO LOTE = 5.29

AVOTAN 50

(CONCENTRACION ESPERADA: 5% DE AVOPARCINA)

LOTE: 01



LECTURA EN CMS. DE LOS HALOS DE INHIBICION FORMADOS CON LA  
ADICION DE LAS SOLUCIONES STANDARD

AVOTAN 50      LOTE: 02

		S O L U C I O N E S									
		A	B	C	D	E					
P L A C A S	1	1.80	1.60	1.50	1.30	1.20					
		1.75	1.60	1.50	1.30	1.20					
		1.85	1.60	1.40	1.40	1.20					
		1.85	1.60	1.40	1.35	1.20					
		1.85	1.60	1.50	1.30	1.20					
		1.85	1.65	1.50	1.30	1.20					
P L A C A S	2	1.80	1.60	1.45	1.35	1.15					
		1.80	1.60	1.45	1.35	1.20					
		1.80	1.70	1.50	1.35	1.15					
		1.85	1.60	1.45	1.30	1.20					
		1.85	1.65	1.40	1.35	1.20					
		1.80	1.60	1.45	1.35	1.20					

LECTURA EN CMS. DE LOS HALOS DE INHIBICION FORMADOS CON LA  
ADICION DE SOLUCIONES PROBLEMA

AVOTAN 50 LOTE: 02

		S	O	L	U	C	I	O	N	E	S
		S/L 1	S/L 2	S/L 3	S/L 4	S/L 5	S/L 6	S/L 7	S/L 8	S/L 9	S/L 10
P L A C A S	1	1.55	1.50	1.55	1.50	1.50	1.55	1.45	1.50	1.45	1.50
		1.55	1.50	1.50	1.45	1.50	1.55	1.45	1.50	1.45	1.50
		1.55	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.45	1.55
		1.50	1.55	1.50	1.45	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.45
		1.55	1.50	1.50	1.50	1.55	1.50	1.45	1.50	1.45	1.50
		1.50	1.50	1.50	1.45	1.55	1.50	1.50	1.50	1.45	1.50
P L A C A S	2	1.50	1.55	1.55	1.45	1.50	1.50	1.50	1.45	1.50	1.50
		1.50	1.55	1.50	1.45	1.50	1.50	1.50	1.45	1.50	1.50
		1.50	1.50	1.50	1.45	1.50	1.50	1.50	1.45	1.50	1.45
		1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.45
		1.50	1.50	1.50	1.50	1.55	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
		1.50	1.50	1.55	1.50	1.55	1.50	1.45	1.45	1.50	1.50

S/L = SUBLOTE

AVOTAN - 50

LOTE 02

PROMEDIOS DE LECTURAS DE LOS HALOS DE INHIBICION

PROMEDIOS DE CURVA STANDARD:

<u>DILUCION</u>	<u>LECTURA PROMEDIO (CM)</u>
A	1.82
B	1.62
C	1.48
D	1.33
E	1.19

PROMEDIOS DE SOLUCIONES PROBLEMA:

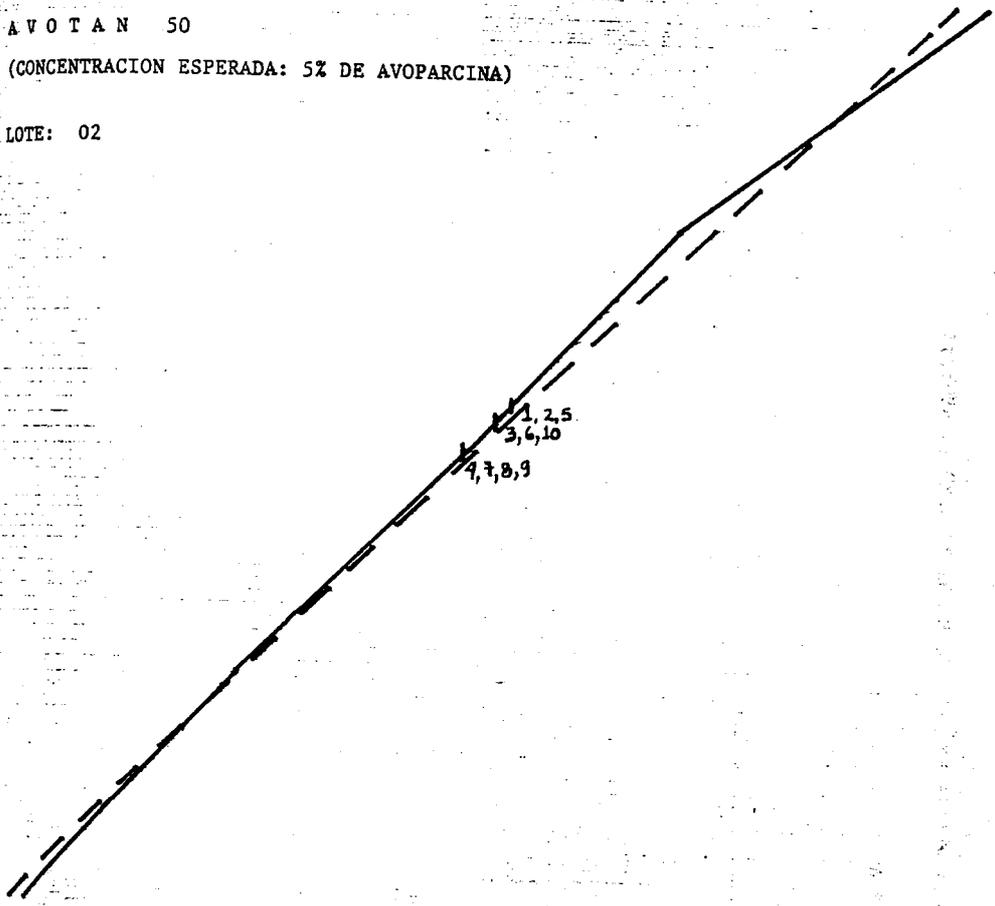
<u>SUBLOTE</u>	<u>LECTURA PROMEDIO (CM)</u>	<u>POTENCIA MICROBIOLÓGICA (%)</u>
1	1.51	5.75
2	1.51	5.75
3	1.50	5.50
4	1.48	5.00
5	1.51	5.75
6	1.50	5.50
7	1.48	5.00
8	1.48	5.00
9	1.48	5.00
10	1.50	5.50

PROMEDIO LOTE = 5.39

AVOTAN 50

(CONCENTRACION ESPERADA: 5% DE AVOPARCINA)

LOTE: 02



1, 2, 5  
3, 6, 10  
7, 8, 9

## LECTURA EN CMS. DE LOS HALOS DE INHIBICION FORMADOS CON LA

## ADICION DE LAS SOLUCIONES STANDARD

AVOTAN 50 LOTE: 03

		S O L U C I O N E S									
		A	B	C	D	E					
P L A C A S	1	1.65	1.55	1.52	1.25	1.31					
		1.70	1.60	1.52	1.30	1.31					
		1.70	1.60	1.52	1.30	1.31					
		1.70	1.55	1.53	1.30	1.29					
		1.70	1.55	1.53	1.35	1.29					
		1.70	1.60	1.53	1.35	1.29					
2	1.70	1.60	1.52	1.38	1.27						
	1.70	1.55	1.48	1.38	1.27						
	1.75	1.55	1.50	1.38	1.27						
	1.75	1.55	1.51	1.36	1.26						
	1.70	1.55	1.51	1.36	1.26						
	1.75	1.60	1.50	1.35	1.26						

LECTURA EN CMS. DE LOS HALOS DE INHIBICION FORMADOS CON LA  
ADICION DE LAS SOLUCIONES PROBLEMA

AVOTAN 50 LOTE: 03

		S	O	L	U	C	I	O	N	E	S
		S/L 1	S/L 2	S/L 3	S/L 4	S/L 5	S/L 6	S/L 7	S/L 8	S/L 9	S/L 10
P L A C A S	1	1.52	1.52	1.52	1.53	1.51	1.52	1.51	1.51	1.51	1.51
		1.50	1.52	1.54	1.53	1.51	1.53	1.52	1.53	1.52	1.52
		1.50	1.54	1.52	1.53	1.53	1.52	1.52	1.53	1.52	1.52
		1.51	1.54	1.51	1.53	1.53	1.51	1.51	1.51	1.52	1.52
		1.51	1.55	1.51	1.53	1.53	1.50	1.51	1.52	1.52	1.52
		1.50	1.53	1.52	1.56	1.52	1.52	1.54	1.52	1.52	1.52
2	1.49	1.52	1.49	1.50	1.54	1.53	1.52	1.51	1.52	1.51	
	1.52	1.50	1.54	1.53	1.53	1.51	1.52	1.52	1.51	1.51	
	1.50	1.50	1.52	1.53	1.53	1.51	1.51	1.53	1.50	1.51	
	1.51	1.46	1.49	1.52	1.53	1.51	1.52	1.52	1.52	1.50	
	1.50	1.47	1.50	1.50	1.54	1.51	1.50	1.50	1.50	1.50	
	1.50	1.52	1.50	1.50	1.54	1.52	1.51	1.51	1.52	1.52	

S/L = SUBLOTE

AVOTAN - 50

LOTE 03PROMEDIOS DE LECTURAS DE LOS HALOS DE INHIBICIONPROMEDIOS DE CURVA STANDARD:

<u>DILUCION</u>	<u>LECTURA PROMEDIO</u> (CM)
A	1.71
B	1.60
C	1.51
D	1.34
E	1.28

PROMEDIOS DE SOLUCIONES PROBLEMA:

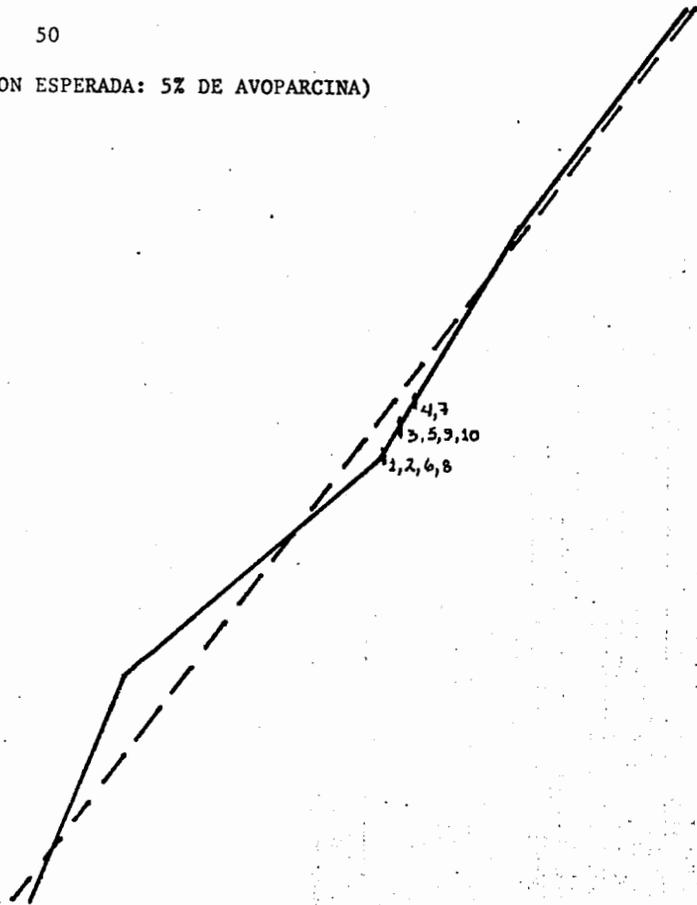
<u>SUBLOTE</u>	<u>LECTURA PROMEDIO</u> (CM)	<u>POTENCIA MICROBIOLOGICA</u> (%)
1	1.51	5.00
2	1.51	5.00
3	1.52	5.25
4	1.53	5.50
5	1.52	5.25
6	1.51	5.00
7	1.53	5.50
8	1.51	5.00
9	1.52	5.25
10	1.52	5.25

PROMEDIO LOTE = 5.20

AVOTAN 50

(CONCENTRACION ESPERADA: 5% DE AVOPARCINA)

LOTE: 03



LECTURA EN CMS. DE LOS HALOS DE INHIBICION FORMADOS CON LA

ADICION DE LAS SOLUCIONES STANDARD

AVOTAN 50 LOTE: 04

		S O L U C I O N E S									
		A	B	C	D	E					
P L A C A S	1	1.78	1.64	1.49	1.43	1.33					
		1.78	1.64	1.49	1.43	1.33					
		1.80	1.61	1.53	1.43	1.31					
		1.80	1.63	1.49	1.43	1.31					
		1.78	1.61	1.49	1.43	1.31					
		1.78	1.66	1.49	1.45	1.32					
		1.79	1.66	1.46	1.44	1.32					
2	1.77	1.66	1.49	1.43	1.32						
	1.75	1.66	1.48	1.43	1.32						
	1.78	1.66	1.49	1.41	1.31						
	1.80	1.67	1.49	1.41	1.30						
	1.76	1.66	1.48	1.42	1.32						

## LECTURA EN CMS. DE LOS HALOS DE INHIBICION FORMADOS CON LA

## ADICION DE LAS SOLUCIONES PROBLEMA

AVOTAN 50 LOTE: 04

		S O L U C I O N E S									
		S/L 1	S/L 2	S/L 3	S/L 4	S/L 5	S/L 6	S/L 7	S/L 8	S/L 9	S/L 10
P L A C A S	1	1.50	1.50	1.53	1.51	1.52	1.47	1.50	1.51	1.51	1.50
		1.49	1.50	1.52	1.51	1.52	1.47	1.50	1.51	1.51	1.50
		1.49	1.50	1.51	1.51	1.50	1.48	1.51	1.50	1.51	1.50
		1.49	1.51	1.50	1.50	1.50	1.52	1.52	1.50	1.50	1.46
		1.49	1.51	1.51	1.51	1.50	1.50	1.52	1.52	1.50	1.46
		1.52	1.52	1.51	1.51	1.50	1.48	1.52	1.50	1.48	1.49
2	1.52	1.52	1.51	1.51	1.49	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	
	1.50	1.50	1.51	1.50	1.49	1.50	1.50	1.52	1.53	1.47	
	1.50	1.51	1.52	1.49	1.49	1.54	1.50	1.52	1.48	1.49	
	1.50	1.53	1.52	1.50	1.51	1.53	1.51	1.52	1.50	1.49	
	1.51	1.50	1.50	1.50	1.50	1.51	1.51	1.51	1.51	1.50	
	1.49	1.48	1.50	1.50	1.50	1.49	1.51	1.50	1.49	1.50	

S/L = SUBLOTE

AVOTAN - 50

LOTE 04

PROMEDIOS DE LECTURAS DE LOS HALOS DE INHIBICION:

PROMEDIOS DE CURVA STANDARD:

<u>DILUCION</u>	<u>LECTURA PROMEDIO</u> (CM)
A	1.78
B	1.65
C	1.49
D	1.43
E	1.32

PROMEDIOS DE SOLUCIONES PROBLEMA:

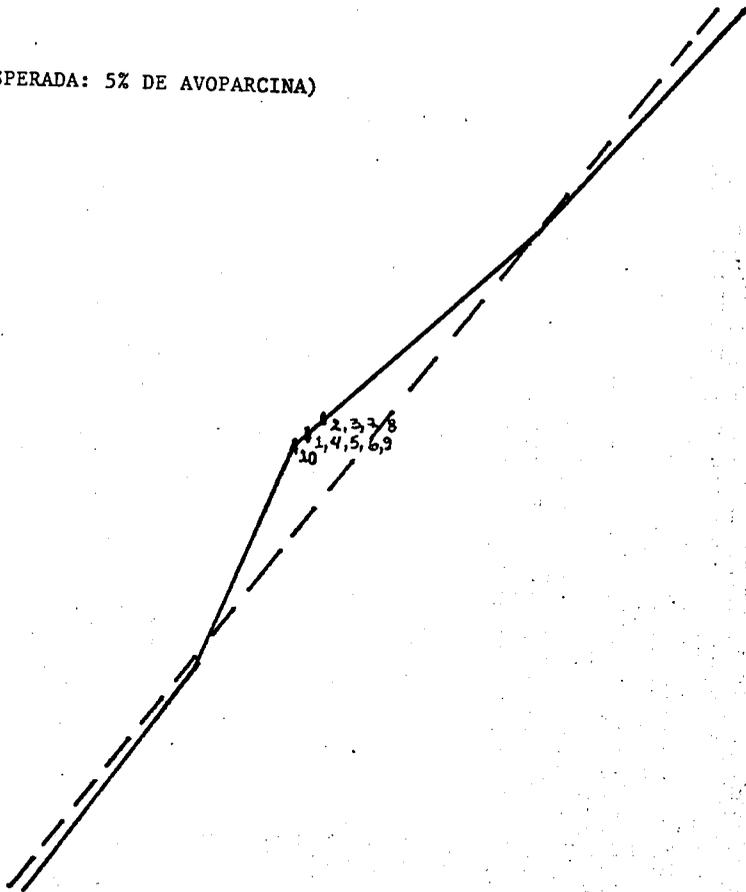
<u>SUBLOTE</u>	<u>LECTURA PROMEDIO</u> (CM)	<u>POTENCIA MICROBIOLÓGICA</u> (%)
1	1.50	5.00
2	1.51	5.25
3	1.51	5.25
4	1.50	5.00
5	1.50	5.00
6	1.50	5.00
7	1.51	5.25
8	1.51	5.25
9	1.50	5.00
10	1.49	5.50

PROMEDIO LOTE = 5.15

AVOTAN 50

(CONCENTRACION ESPERADA: 5% DE AVOPARCINA)

LOTE: 04



LECTURA EN CMS. DE LOS HALOS DE INHIBICION FORMADOS CON LA

ADICION DE LAS SOLUCIONES STANDARD

AVOTAN 50 LOTE: 05

		S O L U C I O N E S									
		A	B	C	D	E					
P L A C A S	1	1.99	1.83	1.66	1.55	1.43					
		1.98	1.84	1.65	1.55	1.40					
		1.98	1.84	1.67	1.54	1.41					
		1.98	1.84	1.63	1.55	1.41					
		1.98	1.84	1.63	1.55	1.40					
		1.98	1.84	1.63	1.57	1.43					
P L A C A S	2	1.98	1.85	1.64	1.53	1.41					
		1.98	1.83	1.64	1.53	1.41					
		1.98	1.83	1.65	1.58	1.41					
		1.98	1.84	1.65	1.54	1.42					
		1.98	1.84	1.65	1.53	1.42					
		1.98	1.84	1.64	1.54	1.41					

LECTURA EN CMS. DE LOS HALOS DE INHIBICION FORMADOS CON LA

ADICION DE LAS SOLUCIONES PROBLEMA

AVOTAN 50 LOTE: 05

		S	O	L	U	C	I	O	N	E	S
		S/L 1	S/L 2	S/L 3	S/L 4	S/L 5	S/L 6	S/L 7	S/L 8	S/L 9	S/L 10
P L A C A S	1	1.65	1.65	1.65	1.65	1.64	1.65	1.66	1.65	1.66	1.65
		1.67	1.66	1.65	1.67	1.65	1.65	1.65	1.65	1.64	1.65
		1.67	1.66	1.65	1.67	1.65	1.65	1.65	1.65	1.64	1.65
		1.68	1.68	1.65	1.67	1.65	1.67	1.65	1.66	1.65	1.65
		1.68	1.63	1.64	1.67	1.66	1.65	1.66	1.65	1.65	1.65
		1.67	1.63	1.65	1.65	1.65	1.65	1.67	1.65	1.64	1.66
P L A C A S	2	1.66	1.66	1.65	1.65	1.64	1.66	1.65	1.64	1.64	1.66
		1.66	1.66	1.65	1.65	1.65	1.66	1.67	1.65	1.65	1.65
		1.66	1.64	1.65	1.67	1.66	1.66	1.67	1.67	1.67	1.65
		1.65	1.64	1.64	1.66	1.66	1.65	1.66	1.66	1.66	1.65
		1.66	1.64	1.65	1.65	1.65	1.65	1.66	1.66	1.65	1.66
		1.66	1.64	1.65	1.67	1.65	1.65	1.65	1.65	1.65	1.66

S/L = SUBLOTE

AVOTAN - 50

LOTE 05

PROMEDIOS DE LECTURAS DE LOS HALOS DE INHIBICION:

PROMEDIOS DE CURVA STANDARD:

<u>DILUCION</u>	<u>LECTURA PROMEDIO</u> (CM)
A	1.98
B	1.84
C	1.65
D	1.54
E	1.41

PROMEDIOS DE SOLUCIONES PROBLEMA:

<u>SUBLOTE</u>	<u>LECTURA PROMEDIO</u> (CM)	<u>POTENCIA MICROBIOLÓGICA</u> (%)
1	1.67	5.38
2	1.65	5.00
3	1.65	5.00
4	1.66	5.20
5	1.65	5.00
6	1.65	5.00
7	1.66	5.20
8	1.65	5.00
9	1.65	5.00
10	1.66	5.20

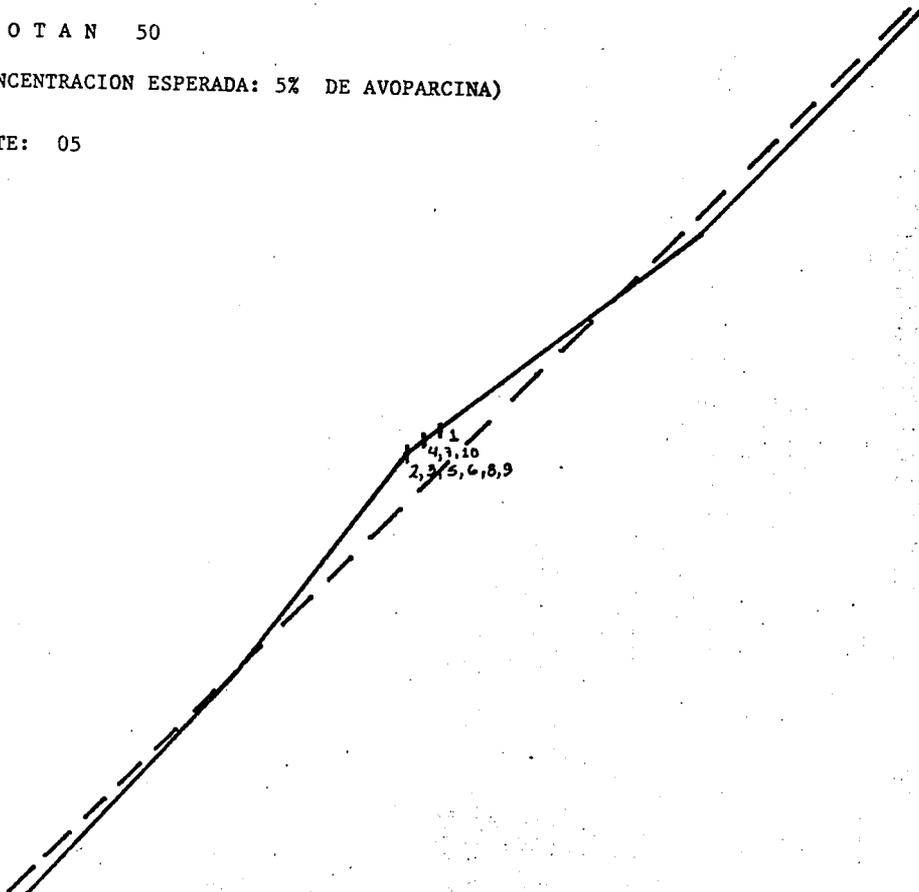
PROMEDIO LOTE = 5.10

GRAFICA NO. 5

AVOTAN 50

(CONCENTRACION ESPERADA: 5% DE AVOPARCINA)

LOTE: 05



1.4 1.5 1.6 1.7 1.8 1.9 2.0 2.1

## CONCLUSIONES

- Como se observó en la presentación de las propiedades de la AVOPARCINA, su espectro antimicrobiano actúa sobre Bacterias Gram +.
- Se encontró que el método utilizado para la valoración microbiológica del antibiótico, fué sensible a variaciones en el medio de cultivo, pH, tamaño del inóculo e incubación.
- Una temperatura de 28°C y con 18 horas de incubación fueron las condiciones óptimas para que el crecimiento del *Bacillus subtilis* fuera de tal manera que las zonas de inhibición de crecimiento se delimitaran perfectamente, permitiendo así el hacer una lectura correcta de los diámetros de los halos de inhibición.
- El manejo cuidadoso de las placas con el antibiótico, es de gran importancia ya que cualquier movimiento brusco que provocara el derramamiento de solución en alguna de las placas, extendió o modificó los halos de inhibición de tal forma que fué imposible el leerlas.
- El tamaño del inóculo nunca fué mayor de 0.15 ml de suspensión de esporas por cada 1000 ml de Agar ya que, así se evitó un crecimiento exagerado del *Bacillus subtilis* en forma de manchones que no permitían la formación bien delimitada del halo de inhibición.

- Debido a la facilidad de manipulación y crecimiento y a los buenos resultados obtenidos en la valoración microbiológica, se determinó que el *Bacillus subtilis* es un microorganismo adecuado para valorar el antibiótico AVOPARCINA.

## B I B L I O G R A F I A

1. B.A. FREEMAN. TRATADO DE MICROBIOLOGIA DE BURROWS. MEXICO. EDITORIAL INTERAMERICANA. 1984. pp 19,150, 172,173,627,633.
2. BERGEY'S. MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY. U.S.A. WILLIAMS, WILKINS. 1975. pp 347,348.
3. BRYAN. BACTERIOLOGIA PRINCIPIOS Y PRACTICAS. MEXICO EDITORIAL CECSA.1979. pp 37,38.
4. CARPENTER PHILIP L. MICROBIOLOGIA. MEXICO. EDITO-- RIAL INTERAMERICANA. 1981. pp 180.
5. DAVIS, DUBELCCO, EISEN, GINSBERG, WOOD. TRATADO DE MI-- CROBIOLOGIA. MEXICO. SALVAT EDITORES. 1979. pp 156, 851,852.
6. FARMACOPEA NACIONAL DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS CUARTA EDICION. 1974. pp 31,42.
7. GENEVIEVE, GRAY YOUNG. MICROBIOLOGIA. EDITORIAL - CECSA. 1982. pp 180,181.
8. JAWETZ, MELNICK, ADELBERG. MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA. MEXICO. EDITORIAL EL MANUAL MODERNO.1987. pp 211, 213.
9. PELCZAR, REID, CHAN. MICROBIOLOGIA. MEXICO. EDITO-- RIAL MC GRAW HILL. 1982. pp 219, 408,721.

10. PELCZAR AND CHAN. LABORATORY EXERCISES IN MICRO BIOLOGY USA MC. GRAW-HILL BOOK COMPANY.1980. pp 123,124.
11. LITTER MANUEL. COMPENDIO DE FARMACOLOGIA. EDITO RIAL EL ATENEO. 1972. pp 538,539.
12. A.J. SALLE. FUNDAMENTAL PRINCIPLES OF BACTERIO- GIA USA MC GRAW-HILL BOOK COMPANY.1974.
13. WIEDMER, H. Y THOMANN, W. THE UTILIZATION OF - AVOPARCIN IN BROILER FEEDING. PROCEEDINGS OF - VTH EUROPEAN POULTRY CONFERENCE. VOL. I. pp 193 to 200. 1976.
14. WALTER MC BEE. INTRODUCCION A LA MICROBIOLOGIA. EDITORIAL CECSA. 1984. pp 13,14.
15. MANUAL TECNICO DE VALORACION DE ANTIBIOTICOS DE CYANAMID COMPANY. WAYNE USA. 1984.
16. ZINSSER. BACTERIOLOGIA. MEXICO. EDITORIAL UTEHA. 1985. pp 177.



**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**  
FACULTAD DE CIENCIAS

Expediente .....

Número ..... 524/89

SRITA. SILVIA JUDITH GONZALEZ SANCHEZ  
P R E S E N T E . -

Manifiesto a usted que con esta fecha ha sido -  
aprobado el tema de Tesis "UTILIZACION DEL BACILUS SUBTILIS  
PARA LA VALORACION DE UN ANTIBIOTICO (AVOPARCINA) EN LA IN-  
DUSTRIA FARMACEUTICA" para obtener la Licenciatura en Biolo-  
gía.

Al mismo tiempo informo a usted que ha sido ---  
aceptada como Directora de dicha Tesis la Q.F.B. Rosa Ma. -  
Puebla Pérez.

A T E N T A M E N T E  
"PIENSA Y TRABAJA"  
Guadalajara, Jal., Mayo 26 de 1989  
EL DIRECTOR

ING. ADOLFO ESPINOZA DE LOS MONTEROS CARDENAS



FACULTAD DE CIENCIAS

EL SECRETARIO

M. EN C. ROBERTO MIRANDA MEDRANO

c.c.p. La Q.F.B. Rosa Ma. Puebla Pérez, Directora de Tesis. Pte.  
c.c.p. El expediente de la alumna.

'mjsd

Boulevard a Tlaquepaque y Corregidora, S. R.

Teléfono 10 30 54 y 10 30 00

Guadalajara, Jal., Mayo 29 de 1989

ING. ADOLFO ESPINOZA DE LOS MONTEROS C.  
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA  
P R E S E N T E .

Por medio de la presente me permito informar a usted que, una vez recibida -  
la tesis "UTILIZACION DEL BACILLUS SUBTILIS PARA LA VALORACION DE UN ANTIBIOTICO  
(AVOPARCINA) EN LA INDUSTRIA FARMACEUTICA" presentada por la C. Silvia Judith -  
González Sánchez y habiendo realizado las observaciones pertinentes, considero  
que se puede imprimir y, solicito a usted de la manera más atenta, permita se -  
realicen los trámites necesarios para el examen respectivo.

Agradeciendo de antemano, aprovecho la ocasión para reiterarle mi considera-  
ción más distinguida.

A T E N T A M E N T E

  
Q.F.B. ROSA MARÍA PUEBLA PEREZ