

# **Uso del ácido fórmico como antibacteriano alternativo**

**Materia: Biología.**

**Recuento de palabras: 3505**

## **Contenido**

1-Introducción.....	3
2-Investigación.....	8
2.1-Consideraciones previas al experimento.....	8
2.2-Experimento principal.....	11
2.3-Discusión.....	15
Conclusión.....	19
Anexo .....	20
Bibliografía .....	24

## 1-Introducción

La creciente demanda de alimentos cárnicos y productos lácteos ha causado que la industria ganadera adquiera una dimensión colosal. La cría masiva de animales en espacios cerrados ha creado un gran problema: las enfermedades contagiosas. Para el control de estas enfermedades se ha aumentado el uso de antibióticos en piensos, hoy en día aproximadamente el 80% de los antibióticos producidos son destinados a animales criados para el consumo humano (World Health Organisation, 2017).

Desde el descubrimiento de la penicilina en 1929 se han desarrollado numerosos antibióticos con diferentes mecanismos de acción, algunos siendo específicos para ciertos tipos de patógenos. La penicilina por ejemplo, debe su efectividad al anillo  $\beta$ -lactámico que posee, pues se une a la enzima transpeptidasa de las bacterias, lo que aumenta la permeabilidad de las paredes celulares y provoca su muerte por rotura osmótica (Bylikin, Horner, Murphy, & Tracy, 2014). Otros antibióticos como las quinolonas y las fluoroquinolonas inhiben la actividad de la enzima ADN girasa y atacan las enzimas ADN-topoisomerasas, respectivamente, impidiendo una división correcta del ADN y por lo tanto la división de las bacterias (Kohanski, Dwyer, & Collins, 2010).

El uso de antibióticos a una escala industrial mundial ha derivado en un aumento paralelo de la resistencia de patógenos a los antibióticos ya que la selección natural ha causado que muchas de las bacterias con una resistencia natural se hayan reproducido con mayor éxito o transmitan su resistencia a otras bacterias mediante el intercambio de plásmidos, causando así una resistencia creciente en sus poblaciones (World Health Organisation, 2017).

Mucho se ha especulado sobre el surgimiento de ‘*superfermedades*’ humanas resistentes a tratamientos actuales originadas en el abuso de antibióticos agresivos en el pienso animal (Branswell, 2017) (ver Figura 1).

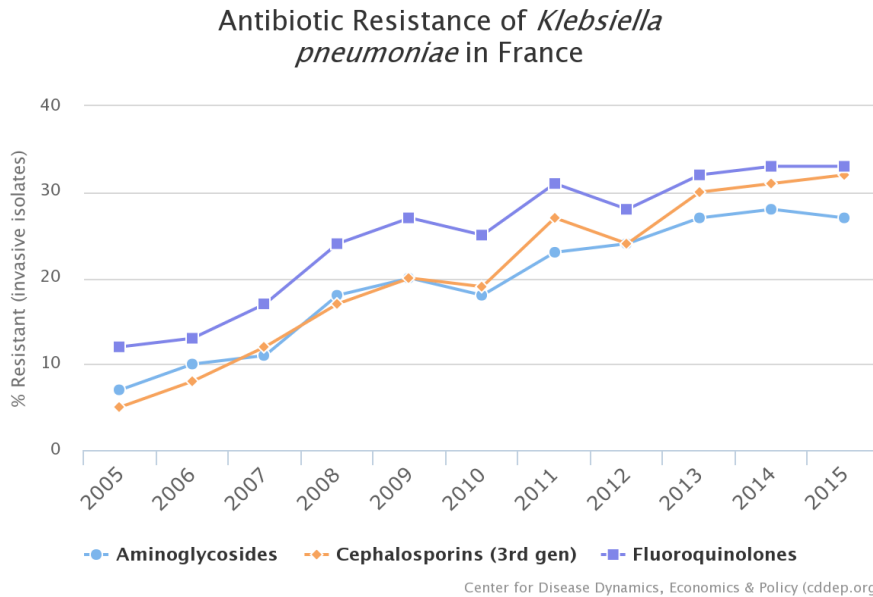


Figura 1. Gráfico del aumento de porcentaje de la bacteria patógena *Klebsiella pneumoniae*, resistente a los antibióticos aminoglucósidos, cefalosporinas de tercera generación y fluoroquinolones en Francia en los años 2005-2015. Gráfica tomada de <https://www.biotech.com/resources/application-notes/monitoring-the-growth-of-e-coli-with-light-scattering-using-the-synergy-4-multi-mode-microplate-reader-with-hybrid-technology/>

Un ejemplo de esto se dio en los estados centrales de EEUU en 1983, donde 18 personas fueron contaminadas con una versión MDR (*multi-drug resistant*) resistente a múltiples medicamentos de la bacteria *Salmonella* a partir de la ingestión de carne de vaca tratada con antibióticos.

Es por esto que se hace necesaria la investigación de nuevos antibióticos, pues una mayor gama de estos decrecería la probabilidad de resistencia. Investigaciones recientes han puesto el punto de mira en los ácidos orgánicos para el tratamiento industrial de piensos (Mroz, 2007). El mecanismo de acción de estos ácidos se basa en su entrada por difusión a través de las paredes bacterianas y destruir el citoplasma o inactivar enzimas esenciales para la bacteria como las

descarboxilasas y las catalasas. Además de esto, se ha descubierto que los ácidos orgánicos podrían potenciar los mecanismos de protección innatos del estómago de los cerdos (Mroz, 2007).

Entre sus diversos usos, el ácido fórmico es utilizado como un potente antimicrobiano, de hecho, ya se han visto intentos de introducirlo en la Unión Europea como preservativo para los piensos animales (EFSA, 2014). Recientes investigaciones también han demostrado que insectos como la hormiga *Lasius neglectus* utilizan su ácido fórmico mezclándolo con resina de árboles como cóctel antibiótico natural (Timothée Brüttsch, 2017), aplicándolo en objetos en sus lugares de convivencia como palos y piedras (ver Figura 2).



Figura 2-*Lasius neglectus* manipulando resina de árbol- foto tomada de <http://www.sciencemag.org/news/2017/03/chemist-ants-brew-antibiotic-cocktail-protect-their-colony>

La presente investigación tratará de responder a la pregunta: **¿Tiene el aumento de concentración de ácido fórmico un efecto significativo sobre el crecimiento en la población de *Escherichia coli* DH5a?**

Nuestro sujeto de estudio para esta investigación será la *Escherichia coli* DH5a, cepa desarrollada por el biólogo Douglas Hannah, usada comúnmente para investigaciones biológicas dado que se conoce su secuencia genética completa y es de fácil manejo en clonaciones (MicrobeWiki, 2015)

La bacteria *Escherichia coli* es una bacteria bacilo gram negativo caracterizado por su rápida división mediante fisión binaria, así consiguiendo una nueva generación cada 30 minutos aproximadamente en condiciones óptimas de 35°C (Zhu, 2007) y en un pH neutral ligeramente básico (7.4) (Zhu, 2007), esto hace de esta bacteria un sujeto perfecto para esta investigación ya que en pocas horas es posible obtener una gran población (ver Figura 3).

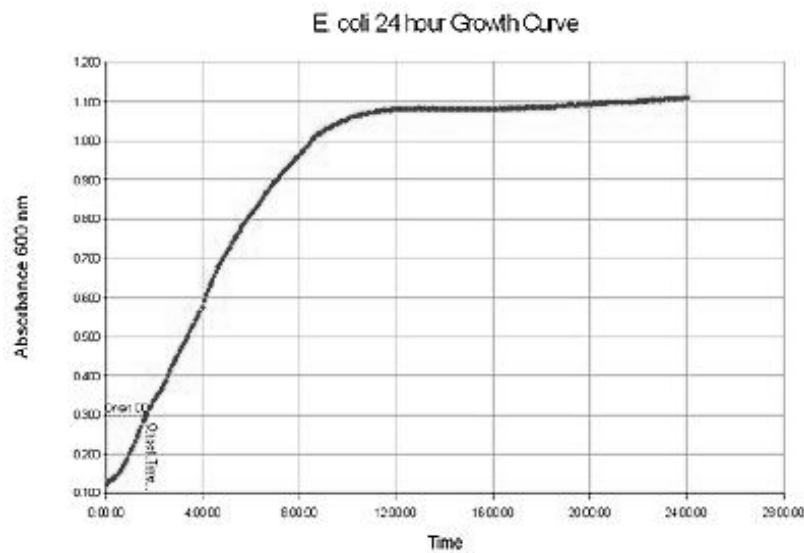


Figura 3 : crecimiento de la bacteria E.coli DH5a en placa Petri en condiciones óptimas, tomada de <https://www.biotek.com/resources/application-notes/monitoring-the-growth-of-e-coli-with-light-scattering-using-the-synergy-4-multi-mode-microplate-reader-with-hybrid-technology/>

Asimismo, es un organismo modelo muy fácil de conseguir, cultivar y conservar. Además de esto, nuestros resultados podrán dar una indicación general del efecto del ácido fórmico sobre otras especies de bacteria genéticamente similares.

Nuestra elección en las concentraciones de ácido fórmico usadas provienen de una serie de ensayos preliminares. Mi objetivo fue determinar una concentración lo bastante alta para causar un efecto sobre el crecimiento de las bacterias pero lo bastante bajo como para no matar a todas las bacterias directamente y así estudiar el efecto gradual. En mi prueba inicial, utilicé una concentración de 0,013M ya que esta es similar a la del líquido trofaláctico (líquido similar a la saliva) de la hormiga *Lasius neglectu* (Timothée Brütsch, 2017), pero éste no mostró tener un efecto notable sobre el crecimiento de la población de bacterias en comparación a mi control. Es por eso que elegí la serie de concentraciones de: 0,02/0,05/0,08/0,1/0,13 M por falta de literatura previa tratando estas concentraciones.

Se medirá el crecimiento de las bacterias mediante la absorbancia del medio de cultivo en el que crecerán. Según la Ley de Beer “la intensidad de un haz de luz monocromática, que incide perpendicular sobre una muestra, decrece exponencialmente con la concentración de una muestra” (Escudero, 2014). De esto podemos deducir que a mayor absorbancia de luz por parte de la muestra, mayor concentración de bacterias.

### Hipótesis

Dada la premisa de que el ácido fórmico puede destruir el citoplasma e inhibir las enzimas descarboxilasas y las catalasas, se espera que concentraciones crecientes de ácido fórmico tengan un efecto negativo sobre el desarrollo de la población de *E.coli* DH5a. En otras palabras, a mayor concentración de ácido fórmico, menor será el aumento de población de *E.coli*.

## 2-Investigación

### 2.1-Consideraciones previas al experimento

Para la acidificación del medio necesitaríamos ácido fórmico lo suficientemente concentrado como para acidificar el medio sin añadir demasiado volumen al medio de cultivo y así no diluir el sustrato de bacterias, es por eso que usamos ácido fórmico de concentración 85% (volumen).

Para poder añadir la cantidad justa para que el medio tuviese la molaridad deseada, tuve que llevar a cabo una serie de cálculos estequiométricos. A continuación se muestra un ejemplo de cómo se obtuvo la cantidad de ácido fórmico que debía echarle al medio de cultivo con 0,02mol.

Primero tuve que averiguar molaridad del concentrado de ácido fórmico.

Si asumimos que por cada litro de concentrado hay 0,85L de ácido fórmico.

- $Masa\ de\ a.\ f.\ por\ Litro = volumen\ por\ litro(cm^3) \times$   
 $densidad\ de\ ácido\ fórmico(\frac{g}{cm^3})$
- $Masa\ de\ a.\ f.\ por\ litro = 850cm^3 \times 1,22g/cm^3 = 1037g\ por\ litro$
- $Moles\ en\ disolución = \frac{Masa\ en\ disolución\ (g)}{Masa\ molar\ (\frac{g}{mol})} = \frac{1037g}{46,03g/mol} = 22,5\ moles$
- $Moles\ en\ disolución = Molaridad = \frac{Moles\ en\ disolución}{Volumen\ de\ disolución(L)} = \frac{22,5\ moles}{1litro} = \mathbf{22,5M}$

Con esta información podré hacer el resto de mis cálculos.

Partiendo de la fórmula

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$



Donde:

$C_i$  es la concentración inicial,  $V_i$  es el volumen inicial,  $C_f$  es la concentración final y  $V_f$  es el volumen final.

Como debemos asegurar que el resto de las condiciones en las que crezcan las bacterias sean iguales, deberemos modificar ligeramente la fórmula para que todos los tubos de ensayo tengan el mismo volumen de medio de cultivo LB

$$C_i \times V_i = C_f \times (0,01 + V_i)$$

Donde el volumen final ha sido reemplazado por el volumen de medio de cultivo (0,01 litros) más el volumen de ácido fórmico que le añadiremos ( $V_i$ ).

Reemplazando  $C_i$  por 22,5;  $C_f$  por 0,02 y buscando el valor de  $V_i$  averiguamos que el volumen de ácido que se debe añadir al medio de cultivo para que tenga una concentración de 0,02M es de **8,90 $\mu$ l.**

En la siguiente tabla se encuentran mis resultados para todas las concentraciones:

Concentración del medio (M)	Volumen de ácido fórmico a añadir al medio ( $\mu$ l)
0,02	8,90
0,05	22,20
0,08	35,60
0,10	44,40
0,13	57,80

Es extremadamente importante en este experimento el esterilizar el material que vayamos a utilizar. Para asegurarnos de que en nuestro cultivo crezcan únicamente *E. coli* y ningún otro tipo

de microorganismos como hongos u otros tipos de bacteria. Siempre que estemos trabajando con medio de cultivo o bacterias, deberemos limpiar la zona de trabajo con etanol, esperar a que seque y posteriormente dejar una llama puesta con el mechero bunsen. Idealmente utilizaríamos una campana de flujo laminar para asegurarnos de que el aire que está en contacto con nuestras bacterias y medios de cultivo esté estéril, sin embargo no disponemos de este material por lo tanto dejamos una llama encendida durante la manipulación de bacterias para crear una atmósfera de esterilidad en nuestra zona de trabajo, con lo que tendremos que trabajar en todo momento cerca de la llama. Para la esterilización de los tubos Falcón (los que contendrán los medios de cultivo con las bacterias), se utilizó la técnica de autoclave. La técnica de esterilización vía autoclave se basa en exponer al material a alta presión y temperatura para eliminar cualquier elemento contaminante en nuestro experimento. Los pasos seguidos para esto se encuentran en el anexo.

Previamente al experimento, se preparó un medio de cultivo para *E. coli* a partir de una disolución de 4% de Agar LB en polvo. Esta disolución es un cultivo estándar para muchos tipos de bacteria. Las medidas de concentración de medio de cultivo se tomaron de las instrucciones indicadas en el recipiente. Será necesario esterilizar el medio mediante autoclave para eliminar cualquier organismo competidor con las *E. coli*. Los pasos seguidos para la preparación del medio de cultivo se encuentran en el anexo. Prepararemos suficiente medio para poder hacer todos los ensayos con el mismo y así asegurar que no haya una diferencia en la concentración de sustrato.

Un aspecto crucial en el éxito del experimento es el mantenimiento de ciertas condiciones constantes en todos los ensayos. Como han demostrado investigaciones anteriores, la

temperatura óptima de nuestro organismo se encuentra en los 35°C (Zhu, 2007), cualquier gran variación en esta temperatura tendrá un efecto significativo sobre los resultados que obtendré ya que afectaran a la tasa enzimática de las enzimas en la *E. coli*. Para asegurarme de que se mantiene una temperatura constante a lo largo de mis ensayos, utilizaré un agitador con regulación termostática para asegurar que se mantenga esta temperatura.

Durante el ensayo se utilizará en todo momento el espectrofotómetro Milton Roy Spectronic 1001 para mantener cualquier error sistemático del aparato constante. Para obtener un dato exacto sobre el aumento en absorbancia, deberé calibrar el espectrofotómetro con una muestra sin bacterias de cada concentración de ácido fórmico para comparar el aumento. Para esto preparé cinco medios sin bacterias con las diferentes concentraciones.

## 2.2-Experimento principal

1. Es recomendable sacar los contenedores de LB que vayamos de usar y colocarlos en el agitador (que estará calentando nuestra inoculación inicial a 35°C) previamente al experimento para que las bacterias tomadas de la inoculación inicial no sufran un shock térmico ante el cambio de temperatura.
2. Se recomienda también esterilizar bordes de los contenedores de LB y tubos Falcon con la llama del mechero Bunsen entre paso y paso cuando se estén manipulando abiertamente.
3. Abrir la caja de puntas de pipeta 100µl dentro de la atmósfera estéril (cerca de la llama del mechero Bunsen).
4. Colocar la punta en la pipeta de 100µl.

5. Medir 10 ml de LB líquido con la bureta y colocarlo en el Falcon.
6. Introducir la cantidad de ácido fórmico que indicada en la tabla.
7. Medir 1µl de la inoculación inicial e introducirlo en el Falcon con el LB.
  - a. Se debe agitar ligeramente el contenedor de la inoculación inicial.
  - b. Al tomar 1µl con la pipeta se debe echar y tomar el líquido varias veces a la vez que se mueve la punta de la pipeta hacia arriba y hacia abajo para asegurar que la suspensión de bacterias sea lo más homogéneo posible.
8. Cerrar la tapa del Falcon y agitar la mezcla.
9. Extraer 1ml y colocarlo en una cubeta.
  - a. Es importante que el cristal de la cubeta esté nítido para que la lectura de la absorbancia sea correcta
10. Cerrar tapa y colocar Falcon en el agitador.
11. Poner el agitador a 120 rpm y 35°C.
12. Tomar muestras de 1ml al cabo de:
  - a. 1 hora
  - b. 2 horas
  - c. 3 horas
  - d. 4 horas
  - e. 24 horas

#### Materiales

- Agitador
- Cubetas tipo Falcón

- Pipeta (10ml)
- Pera
- Solución Agar LB para medios líquidos
- Ácido fórmico (85%)
- Pipetas de precisión 100µl+ puntas estériles
- Pipeta de precisión 1ml+ puntas estériles
- Olla exprés
- Calentador
- Agua de grifo
- Agua desionizada
- Cronómetro
- 90 cubetas de 1ml
- Cultivo de E.coli DH5α
- Bata
- Guantes de nitrilo
- Campana de extracción Mechero Bunsen
- Espray de etanol
- Papel de cocina
- Lejía
- Cilindro de medición 1L
- Erlenmeyer 100ml
- Balanza

- Algodón
- Papel de aluminio

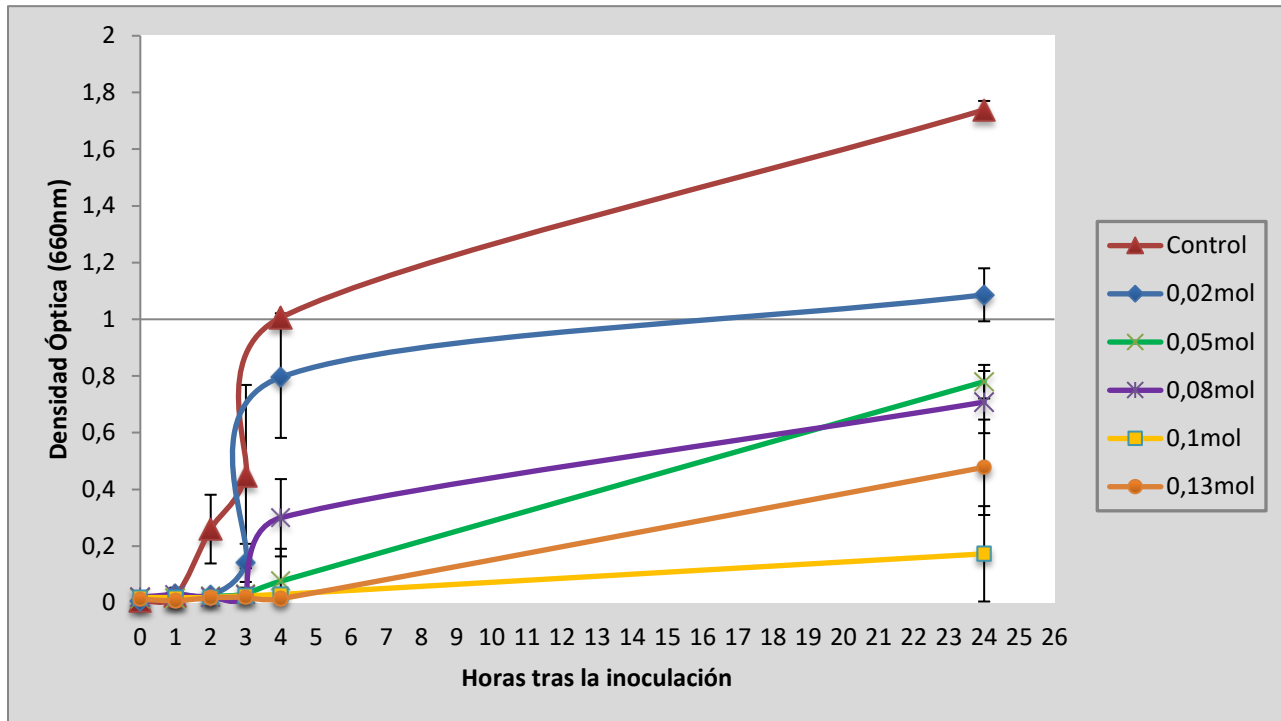
Durante el diseño del experimento, se tomaron en cuenta una serie de factores de seguridad como el llevar puestos en todo momento guantes y gafas de protección y trabajar con el ácido fórmico bajo una campana de extracción para evitar su inhalación.

El ácido fórmico no puede entrar en contacto con el medio ambiente, ya que es altamente tóxico para los seres vivos (NIOSH, 1997). Al tratarse de un ácido en tales concentraciones, se extrajeron pequeñas cantidades de ácido del recipiente en un cubilete separado para minimizar la cantidad de ácido sobrante que se desechaba tras su uso. Además de esto, el ácido fórmico sobrante se diluyó en grandes cantidades de agua antes de desecharse.

Un estudio sobre las propiedades patogénicas de la *E. coli* DH5a determinó que no existía peligro de infección al estar en contacto con ellas (H. Chart, 2000). Sin embargo es considerada ser moderadamente tóxica para el agua (MCLAB, 2013), es por esto que tras el uso de las bacterias se disponga de ellas llenando los tubos Falcon con un poco de lejía y dejándolo un reposar un día para verterlo en el lavabo.

## 2.3-Discusión

Gráfica 1: Valores de absorbancia a 660nm de la *E. coli* DH5a en diferentes concentraciones durante un período de 24 horas



Los resultados determinaron que el aumento de ácido fórmico tuvo un efecto significativo sobre el crecimiento de las *E. coli* durante un período de 24 horas (ver Anexo: Tabla 1).

Las bacterias control tuvieron aumento de absorbancia a 660 nanómetros de 1,732.

Las bacterias con **0,02M** de ácido fórmico en el medio tuvieron una **reducción del 37,5%** en la diferencia de absorbancia con respecto al control.

Las bacterias con **0,05M** de ácido fórmico en el medio tuvieron una **reducción del 55,9%** en la diferencia de absorbancia con respecto al control.

Las bacterias con **0,08M** de ácido fórmico en el medio tuvieron una **reducción del 60,3%** en la diferencia de absorbancia con respecto al control.

Las bacterias con **0,1M** de ácido fórmico en el medio tuvieron una reducción del **91,1%** en la diferencia de absorbancia con respecto al control.

Las bacterias con **0,13M** de ácido fórmico en el medio tuvieron una reducción del **73,1%** en la diferencia de absorbancia con respecto al control.

Es notable que las últimas dos concentraciones no siguiesen el patrón esperado ya que el medio de cultivo con una concentración de 0,1M tuvo un mayor efecto sobre la reducción del crecimiento de la absorbancia que el de 0,13M. Sin embargo, la variabilidad puede explicar este resultado, pues en la Gráfica 1 las barras de error muestran un solapamiento evidente en las medidas de 24 horas de concentraciones mayores a 0,02M.

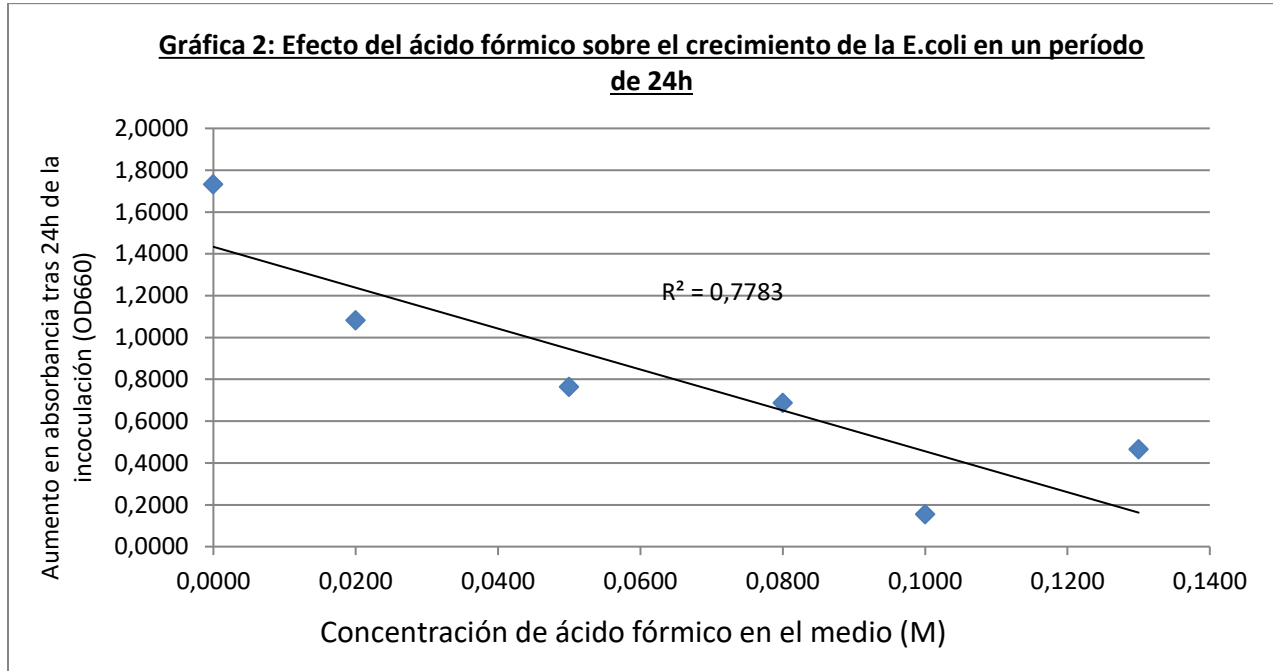
La variabilidad porcentual suele ser alta en la mayoría de los datos. La desviación estándar más baja se puede ver en los ensayos con 0,1M de ácido fórmico con 11-61% de desviación estándar porcentual. Sin embargo, en el ensayo con 0,05M se observa una desviación estándar de 134% en los datos de la cuarta hora. Esto indica que algunos datos son menos significativos.

La *E.coli* tarda aproximadamente 7 horas en llegar a la fase estacionaria (Jesús Ramírez Santos, 2005), en la que la población cesa de aumentar. El hecho de que todas las líneas finalicen en un punto diferente de la gráfica es indicativo de que el ácido fórmico no causa un retraso en el crecimiento bacteriano ya que esto significaría que tras 24 horas, todas las líneas convergerían en valores de absorbancia similares. Podemos así asumir que el ácido fórmico tiene un efecto permanente sobre la población de *E. coli*.

Durante los ensayos usé papel indicador de pH para observar cómo afectaría la adición de ácido fórmico a la acidez del medio de cultivo. El medio de cultivo control mostró tener un pH neutro



(óptimo para el crecimiento de *la E. coli*), sin embargo, el resto de los ensayos mostraron teñir el papel indicador a un pH de aproximadamente 5. Esto nos demuestra que la efectividad del ácido fórmico como desinfectante podría deberse a su potencia para acidificar disoluciones en cantidades muy pequeñas.



El test de *Pearson* es un valor numérico (R) el cual sirve como indicativo de la dirección e intensidad de una correlación entre una variable x e y. Este valor se calcula de la siguiente manera:

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

**Ecuación 1- Fórmula para el coeficiente de correlación Pearson (David M. Lane)**

Con el programa Excel, se calculó el valor R<sup>2</sup> a partir del valor R del test de *Pearson* de los datos presentados en la Gráfica 2, lo que también nos proporciona un indicador de la dispersión de los

datos y su tendencia. El valor obtenido (0,7783) nos indica una correlación moderadamente fuerte entre el aumento de concentración de ácido fórmico en el medio y la reducción en diferencia de absorbancia en el medio de crecimiento de *E.coli*.

Sin embargo, el valor de R podría haber sido más fuerte si no hubiese sido por la presencia de ciertas anomalías a la tendencia como los dos últimos datos (0,1M y 0,13M).

La duración del experimento y el seguimiento de las bacterias limitó mi experimento ya no disponía de suficiente tiempo como para hacer un seguimiento más minucioso. Esto se ve claramente en el salto temporal de mi último dato. Aunque esto no invalide los resultados, hubiera sido de más ayuda que en el análisis se hubiesen tomado muestras continuamente. Una mejora en esta investigación deberá considerar esto.

La contaminación del medio de cultivo fue un factor decisivo en el éxito de mis resultados. Durante la realización del experimento observé que uno de los frascos Erlenmeyer en los que tenía medio de cultivo había empezado a albergar hongos en su fondo, pude fijarme en esto antes de comenzar el experimento y por lo tanto deseché este medio contaminado. Es importante considerar que la introducción de microorganismos exteriores al medio de cultivo puede haber interferido de alguna manera con el crecimiento de la *E. coli* incluso con las lecturas de turbidez.

Uno de los mayores impedimentos de la técnica de espectrofotometría es que la turbidez del medio es únicamente un indicador del número bruto de bacterias, sin embargo es imposible saber con certeza la proporción de estas bacterias que están vivas o en condiciones necesarias

para su división. Sin embargo, la tasa de división nos puede dar una idea general de esto ya que menos bacterias vivas causarían que la tasa de reproducción bacteriana decrezca.

En otras investigaciones similares, también hubo un descenso en concentración de *E. coli* con un aumento en concentración de ácido fórmico (Timothée Brüttsch, 2017) (Mroz, 2007). Nuestros resultados confirmaron esta tendencia.

Una investigación futura valoraría llevar a cabo el experimento con concentraciones diferentes y con un mayor volumen de medio de cultivo por ensayo para así asegurar unas suspensiones de bacterias más homogéneas para no cometer un error demasiado grande al tomar una muestra para el análisis con espectrofotómetro.

## Conclusión

Volviendo a la pregunta de investigación “**¿Tiene el aumento de concentración de ácido fórmico un efecto significativo sobre el crecimiento en la población de *Escherichia coli* DH5a?**”, los resultados sugieren que la aplicación de cantidades crecientes de ácido fórmico en el medio de cultivo tienen un efecto significativo sobre el desarrollo de las poblaciones de *Escherichia coli* DH5a. En concreto, de acuerdo con lo establecido en la hipótesis, el ácido fórmico provoca la supresión del crecimiento de la población de *Escherichia coli*. Las diferencias más significativas se presentan entre los grupos control, 0,02M y 0,05M. Sin embargo, hay que matizar que entre las concentraciones más altas (0,08M, 0,10M y 0,13M) no existen diferencias significativas en cuanto a su efecto sobre las poblaciones.

## **Anexo**

### ***Preparación del medio de cultivo***

1. Medir 600ml de agua desionizada en el cilindro de medición.
2. Pesar 32g de Agar LB en polvo y colocar el cilindro.
3. Enrasar con agua destilada hasta llegar 800ml.
4. Remover el medio hasta que todo el polvo se haya disuelto.
5. Verter la disolución en 8 Erlenmeyers de 100ml.
6. Tapar la apertura de los Erlenmeyers con algodón y papel de aluminio.
7. Cubrir la olla exprés con una capa de unos 5cm de ancho aproximadamente.
  - a. Es importante que la capa de agua que vaya a hervir el medio de cultivo en los Erlenmeyer no se demasiado ancha ya que esto causará que floten y que por lo tanto se derrame su contenido.
8. Bloquear la olla y calentarla.
9. Esperar 20 minutos tras ebullición.
10. Dejar de calentar y liberar vapor acumulado.
11. Dejar enfriar.
12. Colocar Erlenmeyers en un frigorífico para su conservación.

### ***Esterilización de tubo Falcón***

1. Llenar la olla exprés con agua y colocar todos los tubos Falcón abiertos junto a las tapas dentro.
2. Cerrar la olla bloqueándola.

- a. Es importante que este sellada la olla para que cuando se caliente haya un gran aumento de presión.
3. Calentar el agua y esperar a ebullición.
4. Cronometrar 20 minutos tras ebullición.
  - a. Abrir pestaña de la olla para liberar el vapor acumulado.
  - b. Abrir directamente la olla podría ser peligroso ya que hay una diferencia de presión importante entre el exterior y el interior.
5. Esperar 10 min para que se enfríen los tubos.
  - a. Es importante no abrir todavía la tapa.

Tabla 1: Medidas de absorbancia de tubo de ensayo con medio de cultivo con E. coli y diferentes concentraciones de ácido fórmico durante 24 horas

Concentración de ácido fórmico en el medio / M	Tiempo / h	Absorbancia a 660 nm / densidad óptica ± 0,001					Media	Desviación estándar	Desviación estándar porcentual / %
		1	2	3	4	5			
0	0	0,004	0,001	0,014	0,005	0,007	0,006	0,004	70,231
	1	0,08	0,007	0,024	0,011	0,002	0,025	0,029	115,111
	2	0,5	0,2	0,21	0,17	0,22	0,26	0,121	46,6
	3	0,68	0,052	0,82	0,61	0,065	0,445	0,323	72,538
	4	0,996	0,989	1,002	0,032	1,012	0,806	0,387	48,025
	24	1,765	1,743	1,761	1,678	1,746	1,739	0,031	1,809
0,02	0	0,008	0,002	0,006	0,001	0,004	0,004	0,003	60,982
	1	0,036	0,034	0,031	0,025	0,027	0,031	0,004	13,49
	2	0,017	0,02	0,039	0,015	0,041	0,026	0,011	42,559
	3	0,13	0,096	0,25	0,15	0,078	0,141	0,06	42,704
	4	0,97	0,43	0,9	0,89	0,79	0,796	0,192	24,094
	24	1,17	1,102	0,95	1,17	1,04	1,086	0,084	7,699
0,05	0	0,026	0,011	0,012	0,015	0,016	0,016	0,005	33,307
	1	0,013	0,013	0,014	0,021	0,021	0,016	0,004	23,01
	2	0,015	0,017	0,018	0,044	0,018	0,022	0,011	48,462
	3	0,021	0,027	0,015	0,07	0,023	0,031	0,02	63,406
	4	0,02	0,28	0,022	0,04	0,02	0,076	0,102	133,609
	24	0,69	0,75	0,83	0,81	0,82	0,78	0,053	6,784
0,08	0	0,007	0,006	0,038	0,012	0,038	0,02	0,015	72,649
	1	0,019	0,021	0,039	0,016	0,046	0,028	0,012	42,518
	2	0,015	0,022	0,027	0,01	0,026	0,02	0,007	32,711
	3	0,055	0,017	0,023	0,018	0,026	0,028	0,014	50,329
	4	0,27	0,31	0,25	0,15	0,52	0,3	0,122	40,661
	24	0,65	0,55	0,73	0,82	0,79	0,708	0,098	13,85
0,1	0	0,026	0,007	0,008	0,037	0,015	0,019	0,011	61,45
	1	0,019	0,011	0,012	0,029	0,022	0,019	0,007	35,76
	2	0,021	0,02	0,012	0,021	0,02	0,019	0,003	18,241
	3	0,029	0,018	0,035	0,02	0,025	0,025	0,006	24,218
	4	0,033	0,03	0,033	0,025	0,027	0,03	0,003	10,811
	24	0,168	0,174	0,195	0,194	0,133	0,173	0,023	13,071
0,13	0	0,02	0,006	0,014	0,013	0,009	0,012	0,005	38,372
	1	0,005	0,005	0,01	0,005	0,014	0,008	0,004	46,861
	2	0,026	0,023	0,014	0,008	0,017	0,018	0,006	36,399
	3	0,014	0,005	0,039	0,017	0,023	0,02	0,011	57,687
	4	0,007	0,021	0,012	0,019	0,013	0,014	0,005	35,026
	24	0,37	0,81	0,81	0,42	0,36	0,554	0,21	37,908

Tabla 2: Aumento neto en absorbancia tras 24 horas de inoculación

Concentración de ácido fórmico en el medio(M)	Valor inicial de absorbancia(T0)	Valor final de absorbancia(T24)	Aumento (diferencia entre valor inicial) en la absorbancia
0,0000	0,0062	1,7386	1,7324
0,0200	0,0042	1,0864	1,0822
0,0500	0,0160	0,7800	0,7640
0,0800	0,0202	0,7080	0,6878
0,1000	0,0186	0,1728	0,1542
0,1300	0,0124	0,4780	0,4656

### Medidas de seguridad

Componente	Peligro	Medidas de seguridad	En caso de accidente
Mechero Bunsen	Quemadura, incendiado de químicos	<ul style="list-style-type: none"> <li>Asegurarse de la correcta apertura y cierre de la entrada de gas</li> <li>Gafas de laboratorio puestas</li> <li>Bata puesta</li> <li>Tener a una persona vigilando la llama en todo momento</li> <li>Abrir la llama de seguridad en primer instante</li> <li>Sujetarse el pelo con gomilla o diadema en caso de pelo largo</li> <li>Mantener químicos inflamables lejos de la llama</li> <li>Esperar unos minutos si se limpia el espacio de trabajo con etanol para que disipe enteramente</li> </ul>	Apagar la llama rápidamente y colocar la quemadura bajo agua templada. (WebMD)
Ácido fórmico	Ampollas, graves quemaduras en la piel. (NIOSH, 2015)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Llevar guantes en cualquier momento en el que se manipule</li> <li>Llevar gafas de laboratorio puestas</li> </ul>	Enjuagar quemadura química con abundante agua para neutralizar el ácido. (NIOSH, 2015)
Lejía	Dermatitis, ampollas, enrojecimiento de la piel. Inhalación: enrojecimiento de garganta, tosido, dificultad de respiración . (InfoSafe, 2012)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Manipular en un espacio abierto o con una campana de extracción</li> <li>Llevar gafas y guantes en todo momento</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Inhalación: transportar persona a lugar ventilado</li> <li>Contacto con ojos: lavar los ojos con abundante agua durante al menos 15 minutos (InfoSafe, 2012)</li> </ul>

## Bibliografía

- BioTek. (2008, Enero 15). *BioTek*, Monitoring the Growth of E. coli With Light Scattering Using the Synergy™ 4 Multi-Mode Microplate Reader with Hybrid Technology™. Retrieved Marzo 1, 2018, from BioTek: <https://www.biotek.com/resources/application-notes/monitoring-the-growth-of-e-coli-with-light-scattering-using-the-synergy-4-multi-mode-microplate-reader-with-hybrid-technology/>
- Branswell, H. (2017, Enero 27). *Scientific American*. Retrieved Febrero 28, 2018, from <https://www.scientificamerican.com/article/superbug-resistant-to-last-resort-antibiotic-arises-in-china/>
- Bylikin, S., Horner, G., Murphy, B., & Tracy, D. (2014). *Chemistry course companion*. Oxford, Reino Unido: Oxford.
- David M. Lane, M. H. (n.d.). *Online Stat Book*. Retrieved Marzo 1, 2018, from [http://onlinestatbook.com/2/describing\\_bivariate\\_data/calculation.html](http://onlinestatbook.com/2/describing_bivariate_data/calculation.html)
- EFSA. (2014). *Formic acid for all animal species*. European Food Safety Authority, Parma.
- Escudero, A. H. (2014, Mayo). *Universidad Veracruzana*. Retrieved Febrero 26, 2018, from UV: <https://www.uv.mx/personal/aherrera/files/2014/05/L2.-Ley-de-Bouguer-Lambert-Beer-2.pdf>
- H. Chart, R. S. (2000, Diciembre). An investigation into the pathogenic properties of Escherichia coli strains BLR, BL21, DH5α and EQ1. *Journal of Applied Microbiology*, 89(6), 1048–1058.
- InfoSafe. (2012, Julio). *InfoSafe*. Retrieved Marzo 1, 2018, from InfoSafe: <http://www.msdsonline.com.au/msds/msdsview.asp?Std=1&ID=9649d247-4f1b-4709-8954-de3d280e67ac>



- Jesús Ramírez Santos, G. C. (2005). Microbiología Alam. *Revista Latinoamericana de microbiología*, 47(3-4), 92-101.
- Kohanski, M. a., Dwyer, D. J., & Collins, J. J. (2010, Mayo 4). How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol.*, 8(6), 423–435.
- MCLAB. (2013, Septiembre 16). *www.mclab.com*, 1.0. Retrieved Febrero 26, 2018, from *www.mclab.com*:  
[https://www.mclab.com/mclab\\_pages/Documentsz/Dh5-Alpha%20Competent%20E.%20Coli\\_msds\\_V1.0.pdf](https://www.mclab.com/mclab_pages/Documentsz/Dh5-Alpha%20Competent%20E.%20Coli_msds_V1.0.pdf)
- MicrobeWiki. (2015, Diciembre 17). Retrieved 1 Marzo, 2018, from  
[https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/DH5-Alpha\\_E.coli](https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/DH5-Alpha_E.coli)
- Mroz, Z. (2007). Organic Acids as Potential Alternatives to.
- NIOSH. (1997, Septiembre 4). *www.cdc.gov*. Retrieved Febrero 26, 2018, from Center for Disease Control and Prevention: <https://www.cdc.gov/niosh/ipcsneng/neng0485.html>
- NIOSH. (2015, Julio 22). *CDC*. Retrieved Marzo 2, 2018, from  
<https://www.cdc.gov/niosh/ipcsneng/neng0485.html>
- Timothée Brüttsch, G. J. (2017, Marzo 2017). Wood ants produce a potent antimicrobial agent by applying formic acid on tree-collected resin. *Ecol Evol*.
- WebMD. (n.d.). *WebMd*. Retrieved Marzo 1, 2018, from <https://www.webmd.com/first-aid/thermal-heat-or-fire-burns-treatment#1>
- World Health Organisation. (2017, Noviembre 7). *WHO*, 1.0. Retrieved Febrero 28, 2018, from WHO:  
<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/antibiotics-animals-effectiveness/en/>

Zhu, Y. (2007). CSSF. Retrieved Marzo 1, 2018, from CSSF:  
<http://cssf.usc.edu/History/2007/Projects/J1440.pdf>