

**DETECCIÓN DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS POR  
ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELÉCTRICAS**

**EVALUACIÓN DE LA ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELÉCTRICA COMO  
TÉCNICA PARA LA DETECCIÓN DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM  
NEGATIVAS**

**ERIKA VIVIANA GODOY ALARCÓN**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar por el título de Química**

**Director**

**David Alejandro Miranda Mercado**

**Físico, Ing. Electrónico, M.sc. en Área Electrónica, PhD en Química Aplicada.**

**Codirectores**

**Ángel Manuel Meléndez Reyes**

**Químico, PhD. en Ciencias Químicas.**

**Stelia Carolina Méndez Sanchez**

**Química, PhD. en Ciencias Bioquímicas.**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE QUÍMICA**

**BUCARAMANGA**

**2017**

# DETECCIÓN DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS POR ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELÉCTRICAS

## Dedicatoria

*A Dios quien me ha permitido llegar hasta este momento y cumplir mis sueños*

*A mi madre, Josefina, por ser mi ejemplo de vida y mi mejor amiga, por enseñarme a luchar  
siempre por lo que quiero*

*A mi padre, Alfonso, por su amor, por su ejemplo de valentía y tenacidad, por sus consejos, los  
cuales me han convertido en la mujer que soy ahora*

*A mi hermana, Daniela, por ser la compañía de mi vida*

*A Luis Carlos por el apoyo incondicional*

*A Mónica, mi mejor amiga y colega, a quien admiro y llevaré siempre en mi corazón*

# DETECCIÓN DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS POR ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELÉCTRICAS

## **Agradecimientos**

Quiero agradecer a los profesores David Miranda, Ángel Meléndez y Stelia Méndez, por la orientación, por su constante apoyo en el desarrollo de este proyecto y por sus enseñanzas académicas y personales.

Al grupo de investigación en Ciencia de Materiales Biológicos y Semiconductores (CIMBIOS) por permitirme llevar a cabo este proyecto, por la confianza y porque en él encontré una gran familia. Al Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología (GIBIM) por la asesoría y acompañamiento en el trabajo con bacterias, en especial a los microbiólogos Jenniffer y Marlon.

Al laboratorio de electroquímica por los importantes aportes a este proyecto, al Centro de Investigación Científica y Tecnológica en Materiales y Nanociencia (CMN) por la disponibilidad de sus instalaciones y equipos.

A la Universidad Industrial de Santander, a la escuela de química y a todos los profesores que me acompañaron en todo este proceso de formación, por brindarme el entorno académico adecuado para mi desarrollo como profesional.

# DETECCIÓN DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS POR ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELÉCTRICAS

## Contenido

	Pág
Introducción	14
1. Antecedentes	15
1.1 Tinción de Gram	16
1.2 Medidas de impedancia eléctrica	17
1.3. Medidas de impedancia eléctrica en una celda de cuatro electrodos	19
2. Hipótesis y objetivo de la investigación	21
2.1. Objetivo general	21
2.2. Objetivos específicos	21
3. Metodología experimental	22
3.1. Soluciones y medios de cultivo	22
3.2. Limpieza de los electrodos de oro	23
3.3. Cultivo de bacterias	23
3.4. Conteo de colonias	24
3.5. Medidas de impedancia eléctrica	24
3.6. Tratamiento de los datos para la diferenciación de las bacterias	26
3.7 Limpieza de la celda y disposición de residuos biológicos	27
4. Resultados y discusión	28
4.1 Determinación de la concentración cristal violeta	30
4.2 Impedancia de soluciones electrolíticas	31
4.3. Impedancia de bacterias en suspensión	33

# DETECCIÓN DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS POR ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELÉCTRICAS

5.	Conclusiones	39
6.	Recomendaciones	41
	Referencias bibliográficas	42
	Bibliografía	47
	Anexo I	53

# DETECCIÓN DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS POR ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELÉCTRICAS

## Glosario de términos

<b>Abreviación</b>	<b>Significado</b>
PBS	Solución Buffer de Fosfato Salino
TSB	Caldo hidrolizado de caseína de soja
CV	Cristal violeta
LG	Lugol de Gram (1:5 KI/I <sub>2</sub> )
BHI	Infusión de cerebro corazón

# DETECCIÓN DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS POR ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELÉCTRICAS

## Lista de tablas

**Tabla 1.** *Etiquetas de las soluciones medidas por espectroscopia de impedancia eléctrica. PBS: solución 1X de buffer de fosfatos salino; TSB: caldo hidrolizado de caseína de soja; CV: solución de cristal violeta  $4 \times 10^{-5}$  mM; Lugol: solución de Gram (1:5 KI/I<sub>2</sub>).* 26

# DETECCIÓN DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS POR ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELÉCTRICAS

## LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1** Diferencia estructural de las paredes bacterianas de las Gram negativas (izquierdo) y Gram positivas (derecho). 15
- Fig. 2.** Esquema de los caminos que sigue la corriente eléctrica a altas y bajas frecuencias en una suspensión bacteriana. 20
- Fig. 3.** a) Arreglo de las conexiones para realizar las medidas de impedancia eléctrica en una celda de cuatro electrodos. b) Alimentación de la celda de medición con una micropipeta. c) montaje experimental. RE: electrodo de referencia, S: electrodo sensor, WE: electrodo de trabajo y CE: electrodo auxiliar. 25
- Fig.4.** Etapas principales de la metodología experimental. 28
- Fig. 5.** (a) Primer y (b) último ciclo voltamperométrico ( $v = 100\text{mV/s}$ ) característico de un electrodo de Au en  $0.5\text{ M H}_2\text{SO}_4$ . 29
- Fig. 7.** Diagramas de Bode de la magnitud de la impedancia eléctrica para una serie de disoluciones de cristal violeta, partiendo de una a) solución patrón  $24\text{mM}$ , y diluciones b)  $1/100$ , c)  $1/10000$  y d)  $1/600000$ . 31
- Fig. 8.** Diagrama de (I-IV) la magnitud de la impedancia y (I'-IV') la conductividad de soluciones estériles, ambas en función de la frecuencia para: I) PBS, II) PBS + TSB, III) PBS + TSB + CV y IV) PBS + TSB + CV + L. 32
- Fig. 9.** (a) Conteo representativo de bacterias en placa y (b) curva característica de crecimiento CFU/mL vs el tiempo de incubación para *S. Aureus* y *E. coli*. 33

## DETECCIÓN DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS POR ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELÉCTRICAS

**Fig.11.** Diagrama de Bode del ángulo de fase de *E.coli* y *S. Aureus* en suspensión de PBS, TSB y CV a diferentes tiempos de incubación a) 0 h, b) 1 h, c) 2 h y d) 3 h. 35

**Fig. 12.** Diagrama de Bode de la magnitud de la impedancia de *S. Aureus* y *E.coli* en suspensión de PBS, TSB, CV y lugol a diferentes tiempos de incubación A) 0h, B) 1h, C) 2h y D) 3h. 36

**Fig. 13.** Razón de cambio de la magnitud de la impedancia a diferentes frecuencias para las cepas *E. coli* y *S. aureus* en presencia de cristal violeta y lugol. 38

**Fig. 14.** Coeficientes de correlación lineal en función de la frecuencia de la razón de cambio de la magnitud de la impedancia para las cepas *E. coli* y *S. aureus* en presencia de cristal violeta y lugol 39

# DETECCIÓN DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS POR ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELÉCTRICAS

## RESUMEN

**TÍTULO:** EVALUACIÓN DE LA ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELÉCTRICA COMO TÉCNICA PARA LA DETECCIÓN DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y NEGATIVAS

**AUTORES:** Erika Viviana Godoy Alarcón\*\*

**PALABRAS CLAVES:** Espectroscopia de impedancia eléctrica, bacterias Gram positivas y negativas, tinción de Gram, celda de cuatro electrodos.

**DESCRIPCIÓN:** El diagnóstico empírico de infecciones bacterianas lleva a un consumo indiscriminado de antibióticos, que ha genera uno de los problemas de salud pública más preocupantes actualmente por la resistencia a los antibióticos. Una de las primeras pruebas diagnósticas que se realizan es la tinción de Gram, la cual permite diferenciar entre bacterias Gram positivas y Gram negativas, su identificación facilita la selección del tipo de antibiótico a suministrar. La tinción de Gram, por ser un método óptico, depende de la complejidad de la muestra, el contraste óptico y de la destreza del bioanalista. En este trabajo se planteó un método de detección por espectroscopia de impedancia eléctrica basado en la tinción de Gram mediante el cual fue posible diferenciar entre las bacterias bacterias *E. coli* (Gram negativa) y *S. aureus* (Gram positiva). Al aplicar el método propuesto se observaron diferencias en el comportamiento de la razón de cambio de la magnitud de la impedancia eléctrica con el tiempo de incubación de las bacterias Gram positivas y negativas por un periodo de 3h. Este comportamiento es atribuido a la interacción entre el cristal violeta y el lugol ( $I_2/I^-$ ) con la pared de cada tipo de bacteria y con las especies del medio extracelular. Por tanto, se desarrolló un método para distinguir entre bacterias Gram positivas y negativas, lo que abre la posibilidad de diferenciar una mayor cantidad de cepas y de muestras más complejas que las empleadas en este trabajo.

---

\*Proyecto de grado (proyecto de investigación)

\*\* Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: David A. Miranda. Codirectores:

Ángel M. Meléndez. Stelia C. Méndez

DETECCIÓN DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS POR  
ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELÉCTRICAS

**ABSTRACT**

**TITLE:** Evaluation of Electrical Impedance Spectroscopy as a technique for detection of Gram-positive and Gram-negative bacteria\*

**AUTHORS:** Erika Viviana Godoy Alarcón\*\*

**KEYWORDS:** Electrical Impedance Spectroscopy to the detection of Gram-positive and Gram-negative bacteria

**DESCRIPTION:** The indiscriminate consumption of antibiotics is a public health problem because of the increase in the antibiotic resistance. There are two types of bacteria, the Gram-positive and Gram-negative. The identification of bacteria type let to reduce the indiscriminate consumption of antibiotics. The Gram stain test is used to identify the bacteria type, but the correct classification depends upon the sample complexity, optical contrast and the expertise of the bioanalyst. In this research, is proposed a method to detect Gram-positive and Gram-negative bacteria using Gram stain and electrical impedance spectroscopy instead of the optical detection. The method was tested with E. coli (Gram-negative) and S. aureus (Gram-positive). The principal result was the detection of both types of bacteria.

---

\*Degree project

\*\* Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Metalúrgica y Ciencia de Materiales. Adviser: David A. Miranda . Coadviser: Ángel M. Meléndez. Stelia C. Méndez

# DETECCIÓN DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS POR ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELÉCTRICAS

## Introducción

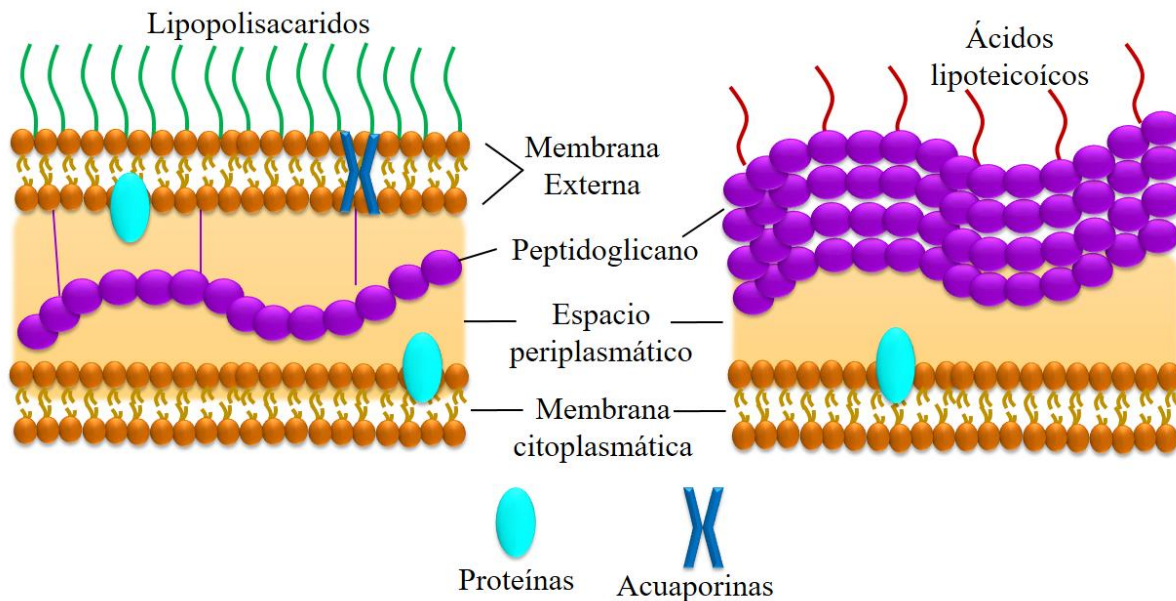
El diagnóstico no oportuno de las infecciones bacterianas puede ocasionar el desarrollo de microorganismos resistentes, debido a que se suministran cócteles de antibióticos para atacar un amplio espectro de bacterias [1]. Esto se ha convertido en un problema de salud pública, ya que disminuye la expectativa de vida del paciente y su tratamiento implica costos adicionales al país, por el aumento en los periodos de hospitalización, atención más intensiva y la utilización de antibióticos de primera línea [2,3]. La identificación de bacterias patógenas es crítica en el diagnóstico y tratamiento de las infecciones de este tipo. Debido a que el mecanismo de acción de la mayoría de antibióticos se basa en debilitar la pared bacteriana, una de las primeras pruebas diagnósticas que se realiza convencionalmente es la tinción de Gram, que permite distinguir entre bacterias Gram positivas y Gram negativas. Esta etapa de identificación es muy importante ya que del resultado obtenido depende la elección adecuada del antibiótico para combatir la infección [4].

Al ser un método óptico, la tinción de Gram tiene la desventaja de depender de la habilidad del analista, ya que se basa en la vista para identificar los diferentes contrastes entre las bacterias y la muestra de fondo tras el proceso de tinción [5]. Por tanto, aquí se plantea un método que se basa en la espectroscopia de impedancia eléctrica en modo galvanostático, y la interacción entre la pared celular de las Gram positivas y negativas con los principales componentes de la tinción de Gram, el cristal violeta y lugol, cuando están presentes en una suspensión de bacterias. Para realizar las medidas de impedancia eléctrica se empleó una celda de cuatro electrodos tipo Morón [6] y se evaluaron las cepas *Staphylococcus Aureus* resistente a la meticilina (Gram positiva) y *Escherichia Coli O157:H7* (Gram negativa).

# DETECCIÓN DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS POR ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELÉCTRICAS

## 1. Antecedentes

Las bacterias son microorganismos unicelulares que pueden estar presentes en el cuerpo humano provocando enfermedades, a esta clase de bacterias se les conoce como bacterias patógenas. De acuerdo a la estructura de la pared celular, las bacterias se clasifican en dos grandes grupos: las bacterias Gram positivas y las Gram negativas [7]. La diferencia estructural entre estos grupos se basa en la composición química de la pared celular (Fig. 1).



**Fig. 1** Diferencia estructural de las paredes bacterianas de las Gram negativas (izquierdo) y Gram positivas (derecho).

Las Gram positivas presentan una membrana citoplasmática a la cual se enlaza una capa gruesa de peptidoglicano que consiste en lípidos y aminoazúcares, a dicha capa se encuentra enlazada una

## DETECCIÓN DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS POR ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELÉCTRICAS

alta concentración de ácidos teicoicos y lipoteicoicos que están expuestos al medio extracelular [8]. Las Gram negativas tienen tres estructuras que rodean a la bacteria; primero, una delgada capa de peptidoglicano que se encuentra entre dos membranas lipídicas, segundo, la membrana citoplasmática y tercero, la membrana externa. Además, en la membrana externa se encuentran enlazados lipopolisacáridos, a los cuales se les atribuye su patogenicidad [9].

Las cepas *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina son un tipo de bacteria Gram positiva que puede estar presente en la piel, tejidos blandos, orina y aparato respiratorio; esta es uno de los principales patógenos que provocan enfermedades nosocomiales [10]. Por otra parte, la *Scherichia coli O157:H7* es una cepa de tipo Gram negativa que se encuentra principalmente en los rumiantes, y puede ser transmitida al ser humano por consumir alimentos o tomar agua contaminada con heces de animales portadores; se puede transmitir de una persona a otra por vía fecal-oral [11].

### 1.1 Tinción de Gram

El método convencional para diferenciar entre bacterias Gram positivas y Gram negativas es la tinción de Gram, que aprovecha la capacidad que tienen las bacterias para retener el colorante primario, cristal violeta [12]. El protocolo tradicional de la tinción de Gram consta de los siguientes pasos:

- 1) Fijación de las células sobre una lámina empleando una llama.
- 2) Tinción de las bacterias con una solución de cristal violeta (CV), el cual difunde pasivamente en la célula y se une electrostáticamente a las superficies iónicas disponibles de la pared bacteriana.

## DETECCIÓN DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS POR ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELÉCTRICAS

3) Adición de un mordiente denominado Lugol, que es una solución del par redox yoduro de potasio/yodo, el cual ataca a algún constituyente celular alterándolo de tal modo que el cristal violeta pueda enlazarse más efectivamente a las células [13].

4) Lavado de las bacterias teñidas con alcohol y posterior teñido con safarina (colorante rojo).

Se ha propuesto recientemente que durante la tinción de Gram, el cristal violeta cruza la membrana externa de las Gram negativas y es incapaz de atravesar la membrana celular, por lo que permanece atrapado en la capa de peptidoglicano al igual que en las Gram positivas [14]. El mecanismo tradicionalmente aceptado de la interacción del cristal violeta con las bacterias se basa en que el cristal violeta puede llegar hasta citoplasma [15].

### 1.2 Medidas de impedancia eléctrica

La impedancia eléctrica de una fase condensada determina su oposición al flujo de corriente alterna. Cuando se excita un material con una señal sinusoidal de corriente,  $i(t) = I_0 \sin(2\pi ft)$ , dicho material responde con una señal sinusoidal de voltaje,  $V(t) = V_0 \sin(2\pi ft + \phi)$ , que tiene la misma frecuencia  $f$ . La relación entre las señales de corriente y voltaje está dada por la ecuación (1) y corresponde con la impedancia eléctrica,

$$Z = Z' + jZ'' = \frac{V_0 e^{j\phi}}{I_0} = |Z| e^{j\phi} \quad (1)$$

donde  $Z'$  y  $Z''$  son la parte real e imaginaria de la impedancia, respectivamente,  $V_0$  es la amplitud de la señal sinusoidal de voltaje e  $I_0$  de la corriente y  $\phi$  es el desfase entre la señal de respuesta y la señal suministrada.

## DETECCIÓN DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS POR ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELÉCTRICAS

La impedancia eléctrica es una cantidad compleja que se compone de una parte real,  $Z'(\omega)$ , y otra imaginaria,  $Z''(\omega)$ . Cuando el desfase entre la señal suministrada y la de respuesta es igual a cero, sólo se considera la parte real y la impedancia eléctrica presenta un comportamiento completamente resistivo. Pero cuando el desfase es diferente de cero, se debe considerar también la parte imaginaria de la impedancia eléctrica, que se relaciona con fenómenos de acumulación de cargas [16].

Cuando se estudia la impedancia eléctrica de una fase condensada se suelen hacer experimentos en los cuales se utilizan excitaciones sinusoidales con diferentes frecuencias. A la representación de la impedancia en función de la frecuencia se le conoce como espectro de impedancia eléctrica. Los espectros de impedancia eléctrica se pueden representar bien sea como diagramas de la magnitud, fase, parte real o parte imaginaria en función de la frecuencia (diagramas de Bode) o como una gráfica de la parte imaginaria en función de la parte real con la frecuencia como parámetro implícito (diagrama de Nyquist) [16].

La impedancia eléctrica ha sido empleada en el área de la microbiología para detectar células biológicas, generalmente en una celda de 2 electrodos, con base en sus propiedades eléctricas y electrofisiológicas, las cuales son: 1) las propiedades aislantes de la membrana o pared celular, 2) la naturaleza altamente iónica del citoplasma y 3) la actividad metabólica [17]. Esta última llevó al desarrollo de lo que hoy se conoce como “microbiología de impedancia” [19], que consiste en la medición de los cambios de la conductividad en un medio de cultivo líquido, debido a la liberación de metabolitos con carácter iónico, así como del intercambio iónico en la membrana celular [20]. Debido a los altos límites de detección que se obtienen con la microbiología de impedancia ( $>10^6$  CFU/g), se han desarrollado y comercializado dispositivos automatizados

## DETECCIÓN DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS POR ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELÉCTRICAS

basados en medidas de impedancia eléctrica que permite determinar la cantidad de bacterias de acuerdo a su crecimiento poblacional [21,22]. Se ha sugerido que el perfil de la respuesta de impedancia eléctrica en el tiempo de crecimiento, obtenida en una suspensión bacteriana, podría ser característico del organismo, del medio de cultivo [20] y de la composición química de la pared bacteriana [23].

### 1.3. Medidas de impedancia eléctrica en una celda de cuatro electrodos

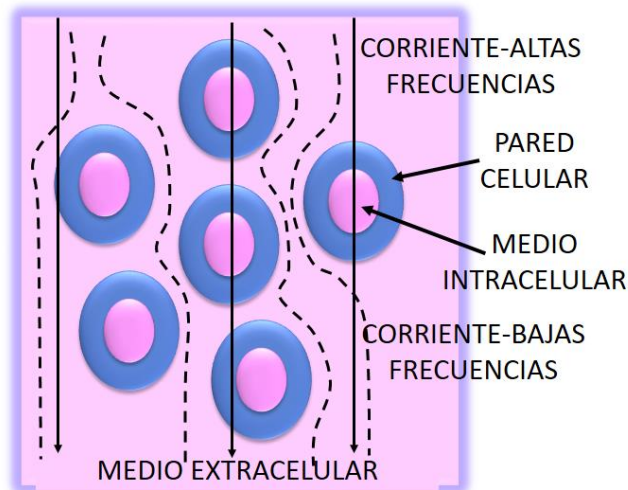
En 1958 van der Pauw propuso una técnica para medir la resistividad de un material sólido en cuatro contactos óhmicos [24], y cuatro décadas después Morón utilizó este principio para determinar la conductividad eléctrica de una solución electrolítica [25]. La celda de medición propuesta por Morón es un cilindro en el cual se localizan cuatro electrodos paralelos entre sí; en dos electrodos se suministra la señal sinusoidal de corriente y por los otros dos se mide la señal sinusoidal de voltaje. La configuración de la celda de cuatro electrodos se ha utilizado ampliamente para las medidas de impedancia eléctrica de soluciones electrolíticas, debido a que mediante este arreglo se reducen los efectos de impedancia de polarización en los electrodos [6,26]. Debido a que en esta técnica la perturbación se impone en un amplio intervalo de frecuencias, la información obtenida en un diagrama de Bode es analizada principalmente en dos regiones de frecuencia, altas y bajas, que se determinan de acuerdo al sistema evaluado [27]. Para células en suspensión<sup>1</sup>, en la región de bajas frecuencias se obtiene información del medio extracelular, debido a que las membranas celulares aíslan eléctricamente al medio intracelular. Desde el punto de vista eléctrico,

---

<sup>1</sup> En suspensiones celulares las células se encuentran libres y dispersas en el medio de cultivo y tienen la capacidad de proliferar sin necesidad de un anclaje. Las células del torrente sanguíneo, las células tumorales y la mayoría de bacterias forman suspensiones celulares en medios líquidos [28].

## DETECCIÓN DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS POR ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELÉCTRICAS

las membranas celulares se comportan como un capacitor no ideal [29], por lo cual en esta región se obtienen mayores valores de impedancia. A medida que la frecuencia aumenta, las corrientes de desplazamiento<sup>2</sup> que se generan a través de la membrana celular permiten obtener información tanto del medio extracelular como del intracelular [30] (Fig. 2).



**Fig. 2.** Esquema de los caminos que sigue la corriente eléctrica a altas y bajas frecuencias en una suspensión bacteriana.

Por tanto, en este documento se propone una nueva metodología para distinguir entre bacterias Gram positivas y Gram negativas por medidas de impedancia eléctrica en una celda de cuatro electrodos a diferentes tiempos de incubación, con base en la interacción que experimenta la pared bacteriana con cristal violeta y lugol.

---

<sup>2</sup> Una corriente de desplazamiento es una cantidad que está relacionada con un campo eléctrico que varía en el tiempo. Esto puede ocurrir en un dieléctrico donde existe un campo eléctrico. No es una corriente física, en un sentido estricto, que ocurre cuando una carga se encuentra en movimiento o cuando la carga se transporta de un sitio a otro [31].

# DETECCIÓN DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS POR ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELÉCTRICAS

## 2. Hipótesis y objetivo de la investigación

Para el desarrollo de esta investigación se planteó la siguiente hipótesis:

Es posible disminuir los tiempos de detección de bacterias Gram positivas y negativas, con relación al método tradicional de la tinción de Gram, a través de la medición de las propiedades eléctricas de una suspensión de bacterias en presencia de cristal violeta y Lugol por espectroscopia de impedancia eléctrica.

### 2.1. Objetivo general

Evaluar la espectroscopia de impedancia eléctrica como técnica para la detección de bacterias Gram positivas y Gram negativas

### 2.2. Objetivos específicos

-Evaluar la concentración adecuada de cristal violeta para la detección de bacterias por espectroscopia de impedancia eléctrica.

-Obtener cultivos de bacterias de una especie Gram positiva y una especie Gram negativa en una concentración de población bacteriana apropiada para ser detectada por espectroscopia de impedancia eléctrica.

-Determinar si la adición del par redox  $I_2/I^-$  (lugol) afecta la sensibilidad de detección de bacterias por espectroscopia de impedancia eléctrica.

### 3. Metodología experimental

#### 3.1. Soluciones y medios de cultivo

Todas las soluciones utilizadas fueron preparadas con agua tipo I (18.2 M $\Omega$  cm) obtenida de un equipo Milli-Q y se emplearon reactivos de alta pureza. Se preparó una solución estéril de buffer de fosfato salino (PBS) 10X compuesta de 1.38 mM NaCl, 30.0 mM KCl, 81 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 15mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; el pH de la solución se ajustó a 7.4 con NaOH. Una solución buffer de fosfatos salino PBS 1X fue preparada diluyendo 10 veces la solución concentrada de PBS 10X. Se empleó una solución comercial preparada de lugol de Gram (1:5 KI/ I<sub>2</sub>). Además, se prepararon diluciones acuosas seriadas de cristal violeta en PBS1X a partir de la una solución patrón 24 mM, la cual es la concentración de cristal violeta empleada en la tinción de Gram [32]. Se realizaron 3 diluciones seriadas con PBS1X de la solución patrón: 1/100, 1/10000, 1/600000.

El medio de cultivo sólido agar-BHI fue preparado a partir de agar bacteriológico (Oxoid) y caldo infusión cerebro corazón (Brain Heart Infusion, pH 7.4  $\pm$  0.2 a 25°C). El medio de cultivo líquido fue caldo hidrolizado de caseína de soja TSB (Tryptic Soy Broth, pH 7.3  $\pm$  0.2, Bacto). Ambos medios fueron preparados disolviéndolos en agua caliente en las cantidades indicadas por el proveedor. Los medios de cultivo y el PBS fueron esterilizados en autoclave durante 15 minutos a 121°C y 14.5 atm.

## DETECCIÓN DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS POR ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELÉCTRICAS

### 3.2. Limpieza de los electrodos de oro

Electrodos de oro (99.9%) se sumergieron en una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30% v/v) en una proporción 3:1 durante 10 min, para remover las impurezas orgánicas presentes en la superficie. Además, se realizó una limpieza electroquímica por voltamperometría cíclica en una solución 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, en una ventana de potencial de -1.0 a 1.6 V vs Ag/AgCl (3.0 M) y a una velocidad de barrido de 10 mV/s. Tras realizar 20 ciclos, se obtuvo el perfil característico del oro [33]. La limpieza química y electroquímica garantiza que los electrodos de oro presenten siempre superficies similares, a través del perfil voltamperométrico.

### 3.3. Cultivo de bacterias

Las cepas *Escherichia coli* O157:H7 (*E. coli*) y *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (*S. aureus*), fueron proporcionadas por el grupo de investigación en bioquímica y microbiología (GIBIM) de la Universidad industrial de Santander. Se siguieron los controles de bioseguridad según la norma técnica colombiana NTC 4092 [34]. Se empleó el método de siembra por estría [35], introduciendo el asa con el inóculo de la cepa pura en una caja Petri con BHI, y se incubó a 37°C por 24h. Se tomaron dos colonias del medio sólido con un asa y se introdujeron en un tubo con 3 mL de medio líquido TSB, para incubarlas a 37°C por 12h y 200 rpm (Tubo A). Transcurridas las 12 h, se preparó un nuevo inóculo (tubo B) diluyendo 1/10 el preinóculo (Tubo A) en TSB. Bajo las condiciones antes mencionadas se obtiene una población bacteriana de 1x10<sup>8</sup> CFU/mL. El cultivo del tubo B fue diluido 1/1000 con TSB para obtener una población bacteriana en el intervalo de 1x10<sup>3</sup> a 1x10<sup>4</sup> CFU/mL. A partir de esta dilución se prepararon 4 inóculos, tomando 100μL de la dilución y adicionado 100 μL de TSB, y se depositaron en los pozos A1, B1, C1 y D1 de la caja de 96 pozos.

# DETECCIÓN DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS POR ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELÉCTRICAS

## 3.4. Conteo de colonias

El conteo de bacterias se realizó empleando el método de recuento en placa [36]. Con el propósito de determinar la población bacteriana del pozo A1, se realizaron diluciones seriadas 1/10 a partir del inóculo ubicado en el pozo A1, tomando 20  $\mu\text{L}$  de este pozo y diluyendo consecutivamente con 180  $\mu\text{L}$  de una solución de NaCl al 0.85% p/p en los pozos siguientes, hasta obtener las diluciones 1/10, 1/100, 1/1000 y 1/10000. Posteriormente, se tomaron 10  $\mu\text{L}$  de cada dilución y se sirvieron en cada uno de los cuadrantes de una caja Petri con BHI por triplicado. Se dejó incubar a 37°C por 16 h y se contaron las colonias en cada cuadrante, empezando por la dilución menor, de tal manera que se utilizó para el cálculo de CFU/mL aquel cuadrante con 3 a 30 colonias, de acuerdo a la 3.

$$\frac{CFU}{mL} = (N^\circ \text{ colonias})(\text{dilución})(\text{volumen servido}) \quad (3)$$

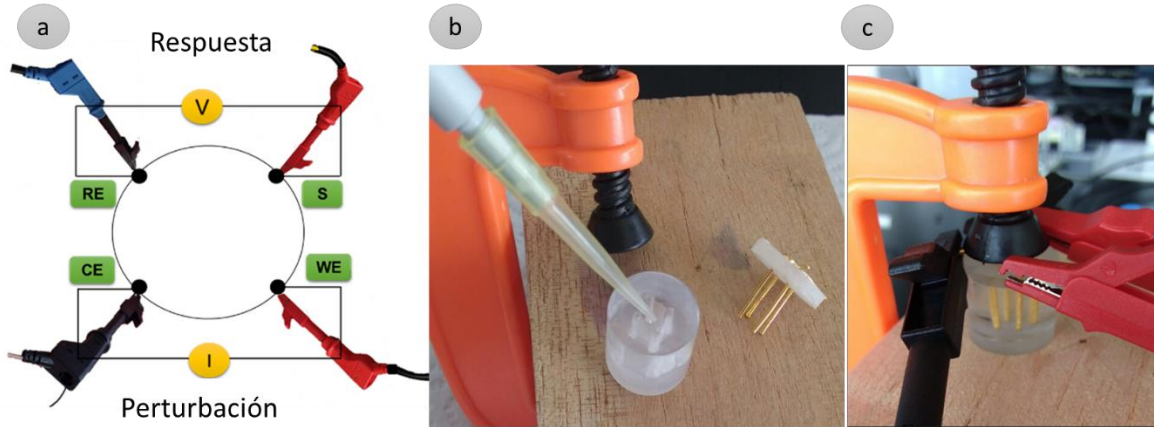
Un procedimiento similar se realizó para un tiempo de incubación de 1 h, 2 h y 3 h, en las filas B, C y D, respectivamente. Es importante mencionar que se realizó una quinta dilución seriada (1/100000) para un tiempo de incubación de 2 h y 3 h.

## 3.5. Medidas de impedancia eléctrica

Se realizaron medidas por triplicado de espectros de impedancia eléctrica galvanostática con un potencióstato/galvanostato Autolab PGSTAT204, controlado por el software Nova 1.11, suministrando una señal de corriente de amplitud 10  $\mu\text{A}$ , en un intervalo de frecuencias de 10 Hz a 1 MHz. Las medidas se realizaron en una celda cilíndrica de cuatro electrodos, de 1 cm de profundidad y 1 cm de diámetro (Fig. 3), con una capacidad de 300  $\mu\text{L}$ . Las dimensiones de los

## DETECCIÓN DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS POR ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELÉCTRICAS

electrodos de oro (99.9 % pureza) fueron: 1 cm de largo y 1mm de diámetro. La configuración de los electrodos se muestra en la Fig. 3.



**Fig. 3.** a) Arreglo de las conexiones para realizar las medidas de impedancia eléctrica en una celda de cuatro electrodos. b) Alimentación de la celda de medición con una micropipeta. c) montaje experimental. RE: electrodo de referencia, S: electrodo sensor, WE: electrodo de trabajo y CE: electrodo auxiliar.

En el caso de las soluciones de cristal violeta, las mediciones de impedancia eléctrica se realizaron en orden de mayor a menor concentración, iniciando por la solución patrón de cristal violeta 24 mM. Por otra parte, se realizaron medidas de impedancia eléctrica de las soluciones presentadas en la Tabla 1. En cada medida se agregó un volumen total de 240 $\mu$ L, de tal manera que en las soluciones electrolíticas preparadas (Tabla 1), se adicionaron ya sea 40  $\mu$ L de TSB o 20 $\mu$ L de lugol hasta completar el volumen con la solución de PBS. Para las medidas de impedancia de las bacterias en suspensión se realizó el mismo procedimiento antes mencionado, sólo que las bacterias se encontraban en suspensión en el TSB. Partiendo de los inóculos preparados en los pozos A1, B1, C1 y D1, se realizó el conteo y se midió la impedancia eléctrica al tiempo inicial de la preparación del inóculo (pozo A1 a  $t = 0$  h) y después de 1 h para B1, 2 h para C1 y 3 h para

## DETECCIÓN DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS POR ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELÉCTRICAS

D1, que de aquí en adelante se denominarán 0h, 1h, 2h y 3 h. Las mediciones anteriores se realizaron para las cepas, *E. coli* y *S. aureus*, obteniendo los diagramas de Nyquist y de Bode.

**Tabla 1.** *Etiquetas de las soluciones medidas por espectroscopia de impedancia eléctrica. PBS: solución IX de buffer de fosfatos salino; TSB: caldo hidrolizado de caseína de soja; CV: solución de cristal violeta 4 x10<sup>-5</sup> mM; Lugol: solución de Gram (1:5 KI/I2).*

<i>Etiqueta</i>	<i>Solución</i>
<b>I</b>	PBS
<b>II</b>	PBS + TSB
<b>III</b>	PBS + TSB + CV
<b>IV</b>	PBS + TSB + CV + Lugol

Por otra parte, la magnitud de la conductividad se determinó a partir de los datos de la magnitud de los datos de la impedancia eléctrica, con la siguiente expresión [6]:

$$\rho(\omega) = \frac{\pi h}{\ln(2)} Z(\omega) \quad (2)$$

donde  $\rho(\omega)$  es la resistividad eléctrica dependiente de la frecuencia de la señal de perturbación empleada para la medida de impedancia eléctrica  $Z(\omega)$  de la solución electrolítica, y  $h = 10^{-3}$  m corresponde a la altura del líquido en la celda cilíndrica.

### 3.6. Tratamiento de los datos para la diferenciación de las bacterias

A partir de los datos de impedancia eléctrica obtenidos de la suspensión de las cepas *E. coli* y *S. Aureus*, para cada una de las frecuencias de la señal sinusoidal de excitación, entre 10Hz y 1MHz,

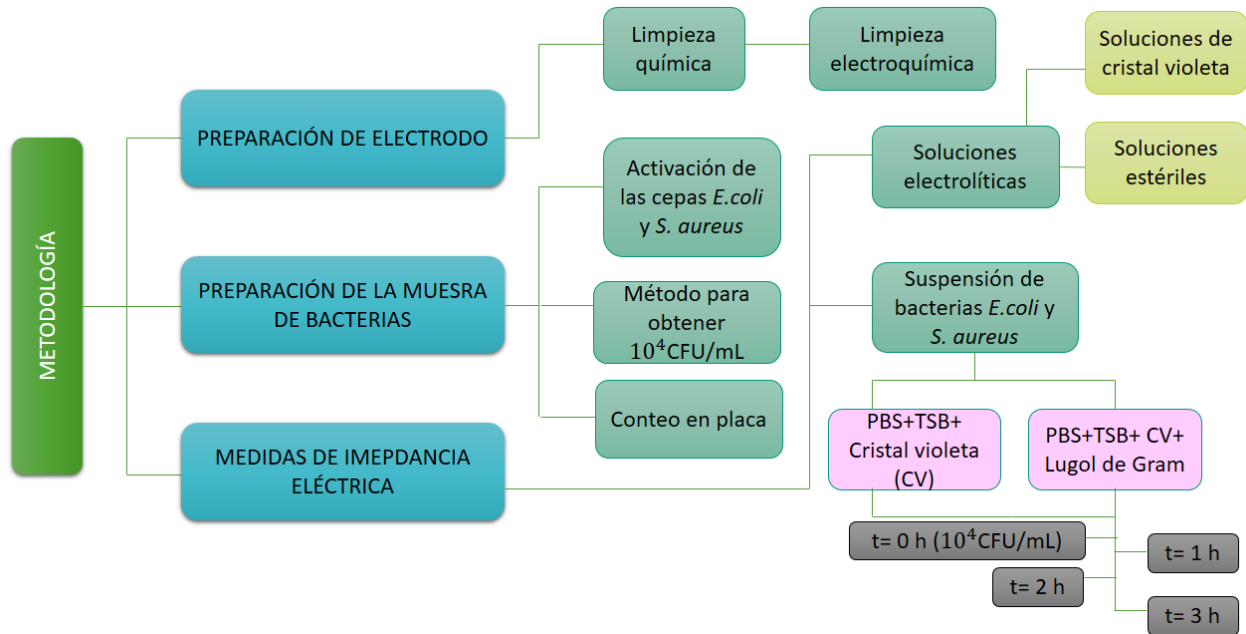
## DETECCIÓN DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS POR ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELÉCTRICAS

se hicieron regresiones lineales de los cuatro valores de la magnitud de impedancia eléctricas medidos en diferentes instantes de tiempo de incubación, 0h, 1h, 2h y 3h. La razón de cambio de la magnitud de la impedancia calculada en la regresión lineal (pendiente de la línea obtenida), fue graficada en función de la frecuencia. También se graficó el coeficiente de regresión lineal en función de la frecuencia.

### **3.7 Limpieza de la celda y disposición de residuos biológicos**

Al finalizar cada medida de impedancia del inciso anterior (3.5), la muestra con bacterias contenida en la celda se dispuso en una solución de hipoclorito concentrado, los electrodos y la celda se sumergieron en una solución de hipoclorito y alcohol durante 20 minutos. Pasado este tiempo, los electrodos y la celda se lavaron con alcohol seguido de abundante agua y se dejaron en exposición ultra violeta dentro de la cabina de bioseguridad durante 5 minutos antes de realizar la nueva medida de impedancia. Terminado el proceso de medición, las soluciones de lavado (soluciones de hipoclorito y alcohol) se dejaron dentro de la cabina durante 24 h, y finalmente se desecharon de acuerdo al protocolo definido por la Universidad para disponer de sustancias químicas.

# DETECCIÓN DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS POR ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELÉCTRICAS

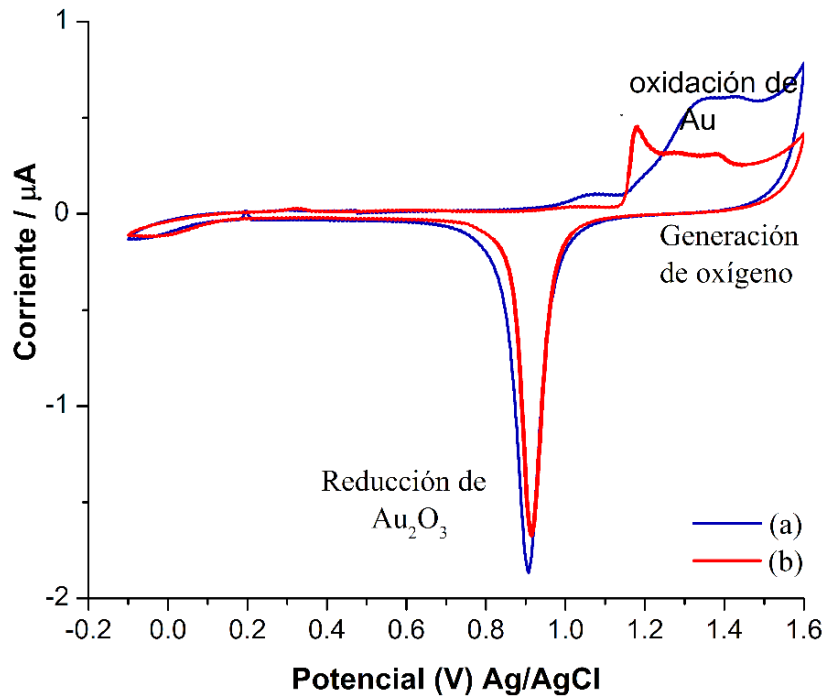


**Fig.4.** Etapas principales de la metodología experimental.

## 4. Resultados y discusión

Para garantizar que las superficies de los cuatro electrodos usados presenten el mismo estado superficial se realizó limpieza electroquímica con la aplicación de varios ciclos voltamperométricos consecutivos de oxidación-reducción hasta obtener el comportamiento característico de Au en 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> [33], como se muestra en la Fig. 5. La eliminación, por medio de la limpieza electroquímica, de las impurezas en la superficie de los electrodos reduce la aparición de efectos termoeléctricos que alteran las propiedades eléctricas del material [6].

## DETECCIÓN DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS POR ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELÉCTRICAS



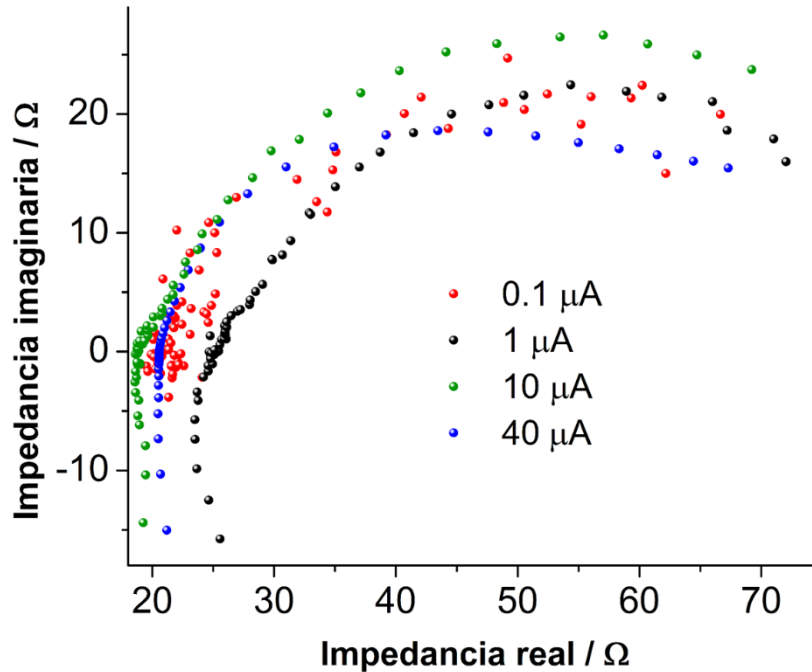
**Fig. 5.** (a) Primer y (b) último ciclo voltamperométrico ( $v = 100\text{mV/s}$ ) característico de un electrodo de Au en  $0.5\text{ M H}_2\text{SO}_4$ .

Con el fin de determinar la corriente más apropiada para realizar las medidas de impedancia eléctrica se evaluaron las corrientes  $0.1$ ,  $1.0$ ,  $10$  y  $40.0\ \mu\text{A}$ . Estos valores fueron seleccionados con base en estudios previos donde se utilizó un montaje experimental similar al empleado en este trabajo [6]. En la Fig. 6 se muestran los gráficos de la parte imaginaria de la impedancia eléctrica en función de su parte real (diagrama de Nyquist); cada curva corresponde a las propiedades eléctricas de una solución PBS 1X medida a diferentes amplitudes de corriente de excitación.

Si se selecciona un valor de amplitud de corriente muy bajo, para el cual se observa ruido en la medición, se obtiene un alto error de medición y si se selecciona una amplitud muy grande, entonces, pueden ocurrir transformaciones en el sistema no deseadas [37]. Dado que, para los valores más bajos de la señal de excitación,  $0.1$  y  $1.0\ \mu\text{A}$ , se observa la presencia de ruido, se

## DETECCIÓN DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS POR ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELÉCTRICAS

seleccionó  $10 \mu\text{A}$  como amplitud para la señal de excitación de corriente a utilizar en las medidas de impedancia eléctrica galvanostática.



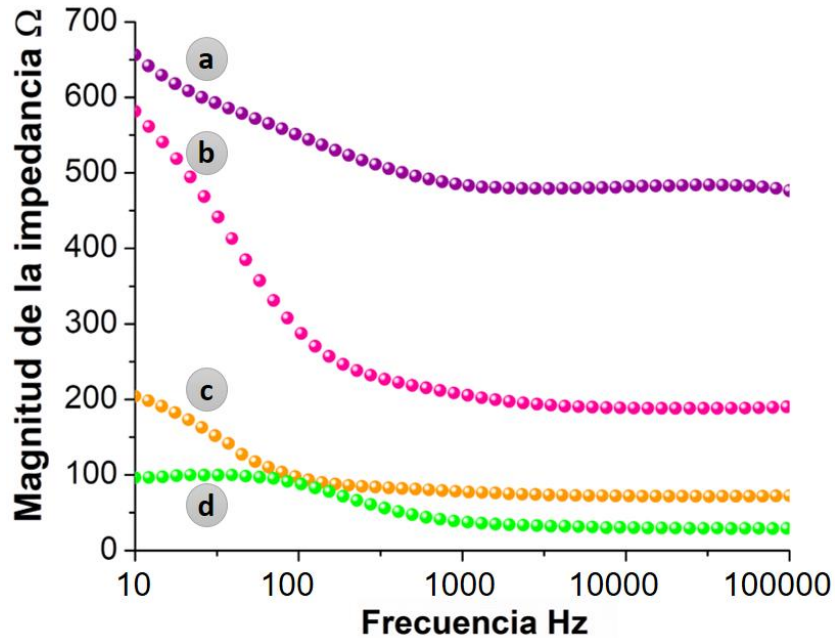
**Fig. 6.** Diagramas de Nyquist de PBS obtenidos suministrando distintas corrientes indicadas en la figura.

### 4.1 Determinación de la concentración cristal violeta

Con el fin de determinar la concentración de CV adecuada para detectar bacterias en suspensión, se midió la impedancia eléctrica de soluciones de cristal violeta de distinta concentración, partiendo de una concentración de CV  $24\text{mM}$  que corresponde a la utilizada en la tinción de Gram. En la Fig. 7 se presentan curvas representativas de la magnitud de la impedancia eléctrica de las soluciones de CV. Los valores de la magnitud de la impedancia eléctrica decrecen conforme la concentración de cristal violeta disminuye. Teniendo en cuenta los valores de la magnitud de impedancia eléctrica de las soluciones electrolíticas del medio fisiológico PBS 1X y el medio de

## DETECCIÓN DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS POR ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELÉCTRICAS

cultivo TSB (Fig. 6), las cuales son cercanas a  $100 \Omega$ , se escogió una concentración  $4.0 \times 10^{-5} \text{mM}$ , la cual es 6000000 veces menor que la concentración empleada en la tinción de Gram.

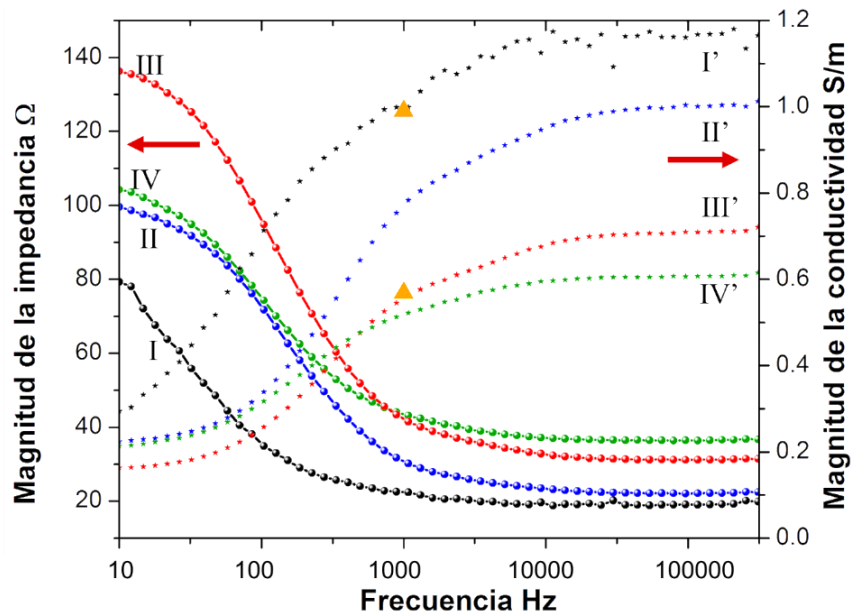


**Fig. 7.** Diagramas de Bode de la magnitud de la impedancia eléctrica para una serie de disoluciones de cristal violeta, partiendo de una a) solución patrón 24mM, y diluciones b) 1/100, c) 1/10000 y d) 1/600000.

### 4.2 Impedancia de soluciones electrolíticas

Se realizaron medidas de impedancia eléctrica para determinar cómo se ven afectadas las propiedades eléctricas del medio fisiológico PBS al agregar (Tabla 1): II) el medio de crecimiento bacteriológico (TSB), III) cristal violeta y IV) Lugol ( $\text{KI/I}_2$ ). En la Fig.8I-IV se muestra el diagrama de Bode de la magnitud de la impedancia eléctrica y de la magnitud de la conductividad Fig. 8I'-IV' en función de la frecuencia para las diferentes soluciones de PBS y agregados. La magnitud de la conductividad fue obtenida a partir de los datos de la magnitud de la impedancia empleando el inverso de la ecuación (3).

## DETECCIÓN DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS POR ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELÉCTRICAS



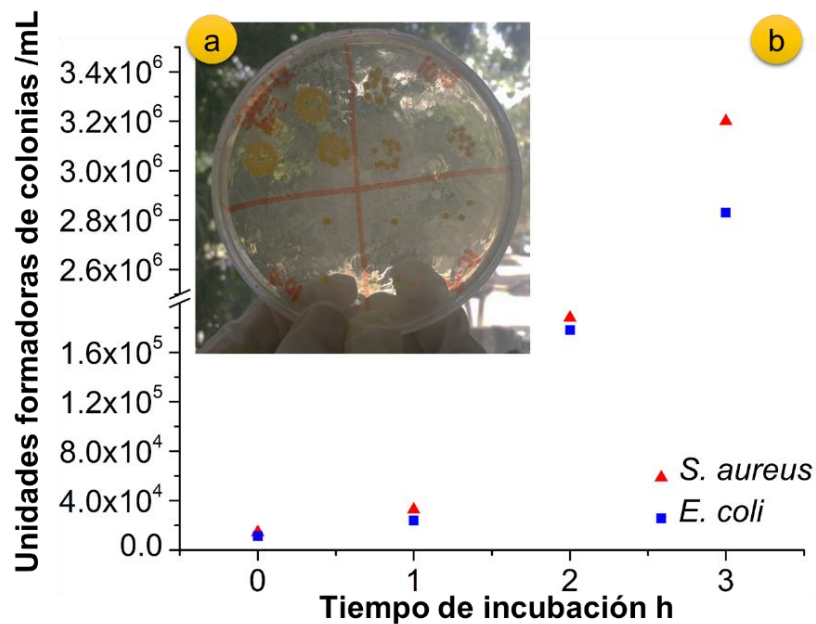
**Fig. 8.** Diagrama de (I-IV) la magnitud de la impedancia y (I'-IV') la conductividad de soluciones estériles, ambas en función de la frecuencia para: I) PBS, II) PBS + TSB, III) PBS + TSB + CV y IV) PBS + TSB + CV + L.

La solución de PBS es la más conductiva en comparación con las soluciones de PBS y agregados, debido a la presencia de electrolitos fuertes  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  y  $\text{Cl}^-$  que incrementan la conductividad de la solución Fig. 8I'. Al adicionar TSB (Fig. 8II') a la solución de PBS, la conductividad disminuye, debido a la presencia de moléculas neutras (dextrosa y aminoácidos) provenientes del TSB y a la interacción entre las distintas especies químicas. La conductividad continúa disminuyendo al volver la solución de PBS más compleja, con la adición de TSB y CV (Fig. 8III') y TSB, CV y lugol (Fig. 8IV'). Sin embargo, sale de los alcances de esta investigación explicar las interacciones entre las especies que ocasionan el aumento de la impedancia. Los resultados fueron comparados con un conductímetro (triángulos presentados de manera comparativa en la Fig. 8).

# DETECCIÓN DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS POR ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELÉCTRICAS

## 4.3. Impedancia de bacterias en suspensión

En la Fig. 9 se presentan las curvas de crecimiento de las cepas *Escherichia coli* O157:H7 (*E. coli*) y *staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (*S. aureus*) obtenidas por el método de conteo en placa. Las curvas exhiben un comportamiento de tipo exponencial, aumentando de  $10^4$  a  $10^6$  CFU/mL en 3 h de incubación, aunque las *S. Aureus* crecen a una velocidad mayor que la *E. coli*.

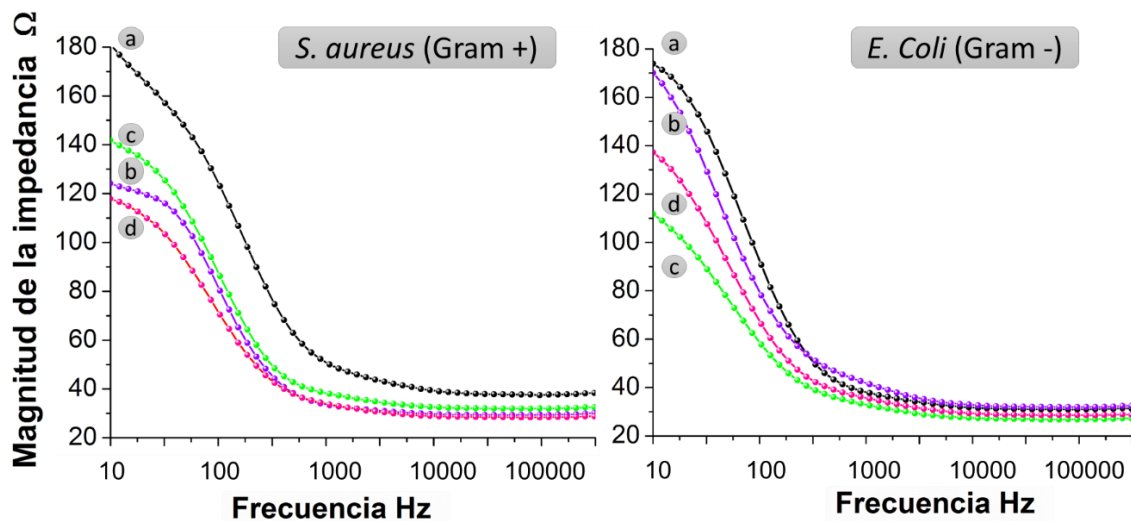


**Fig. 9.** (a) Conteo representativo de bacterias en placa y (b) curva característica de crecimiento CFU/mL vs el tiempo de incubación para *S. Aureus* y *E. coli*.

En la Fig. 10 se presentan los diagramas de Bode de la magnitud de la impedancia para las cepas *E.coli* y *S. Aureus*, en una solución con cristal violeta y los medios fisiológico y bacteriológico (PBS y TSB), de cada uno de los tiempo de incubación 0h, 1h, 2h y 3h, cuyo comportamiento se asocia directamente a un aumento de la población bacteriana (Fig. 10b). En el tiempo cero de incubación (Fig. 10a) y a bajas frecuencias (<1000Hz) se presentan los mayores valores de impedancia para las dos cepas, esto se debe a que al inicio de la medición ( $t = 0$  h) la

## DETECCIÓN DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS POR ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELÉCTRICAS

población bacteriana es la menor y, por tanto, la cantidad de metabolitos de carácter iónico en la solución electrolítica, propios del catabolismo de las bacterias, es la menor comparada con las de mayor tiempo de incubación [20]. Aunque los valores de impedancia tienden a disminuir con el tiempo, su comportamiento es distinto para cada cepa. A altas frecuencias ( $>1000\text{Hz}$ ), la impedancia eléctrica disminuye debido a que se genera una corriente de desplazamiento a través de la pared bacteriana, que hace que los iones del medio intracelular contribuyan con la conducción de la corriente y por ello se observa una disminución de la impedancia, es decir, aumenta la conductividad de la solución [30].

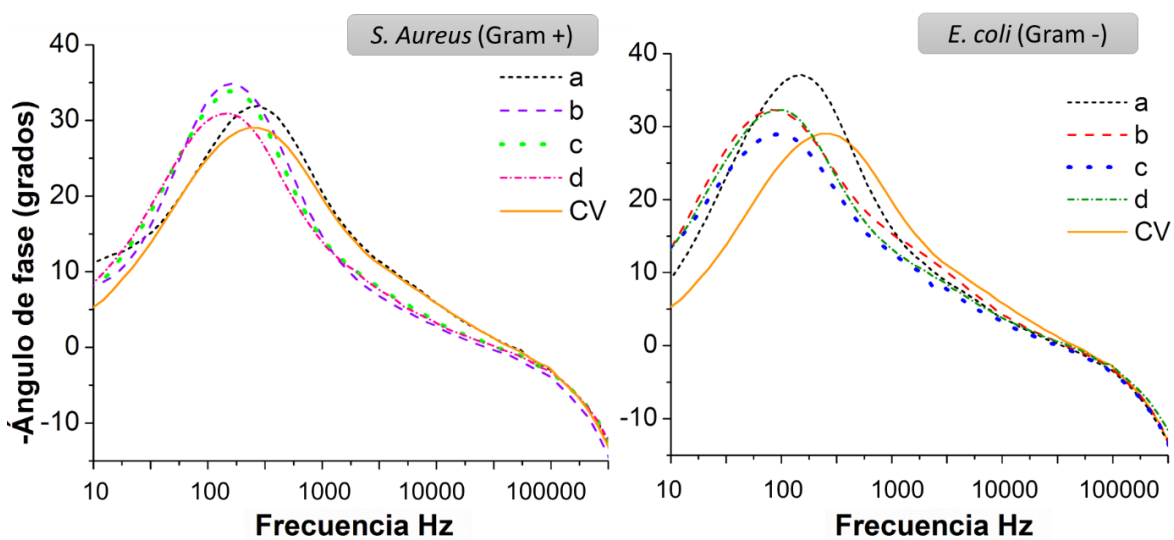


**Fig. 10.** Diagramas de Bode de la magnitud de la impedancia de *E.coli* y *S. Aureus* en suspensión de PBS, TSB y CV a diferentes tiempos de incubación a) 0 h, b) 1h, c) 2h y d) 3 h

Teniendo en cuenta que los valores de impedancia a frecuencias  $>1000\text{ Hz}$  para las dos cepas son similares a los obtenidos con el mismo medio electrolítico sin bacterias (Fig. 10), el medio intracelular no contribuye de forma significativa con la impedancia. Por tanto, de aquí en adelante la discusión se centrará a frecuencias menores a  $1000\text{ Hz}$ . Conforme disminuye la frecuencia en el intervalo de  $1000$  a  $10\text{ Hz}$  los valores de impedancia se incrementan hasta alcanzar un valor

## DETECCIÓN DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS POR ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELÉCTRICAS

máximo a 10 Hz. A esta frecuencia, los valores de impedancia para las dos cepas en el tiempo cero de incubación son de aproximadamente 180  $\Omega$ , mientras que para el mismo medio electrolítico sin bacterias es de 140  $\Omega$ . La diferencia en los valores de impedancia, que es de 40  $\Omega$ , está relacionada con los efectos capacitivos asociados a las paredes bacterianas que aíslan el medio intracelular y llevan a una mayor resistencia de la solución, lo cual se ve reflejado en la disminución de la impedancia del medio debido a bajas frecuencias [30].



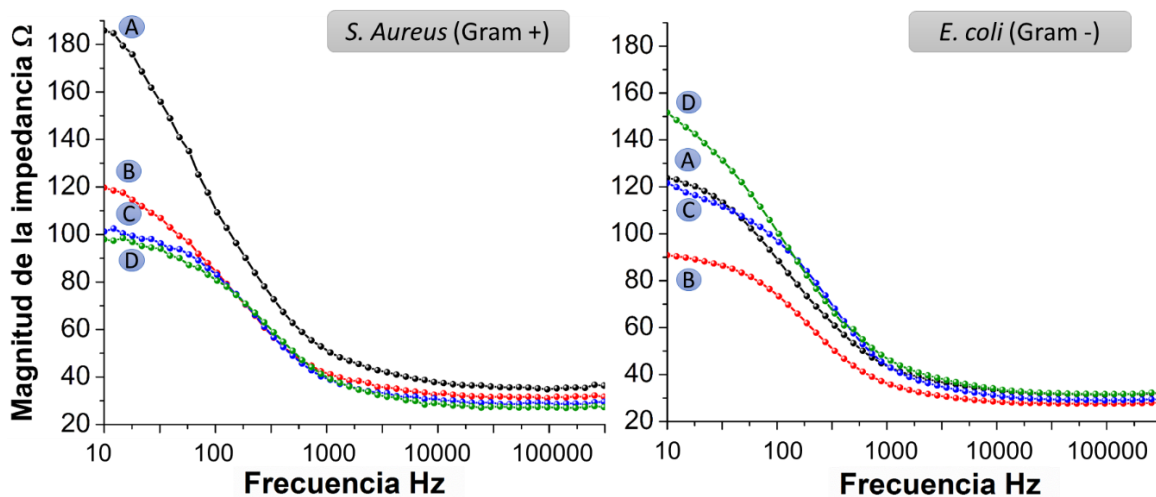
**Fig.11.** Diagrama de Bode del ángulo de fase de *E.coli* y *S. Aureus* en suspensión de PBS, TSB y CV a diferentes tiempos de incubación a) 0 h, b) 1 h, c) 2 h y d) 3 h.

En la Fig 11. se presentan los diagramas del ángulo de fase en función de la frecuencia para las cepas *E.coli* y *S. Aureus* en presencia de CV, en los cuales se observa un incremento del ángulo a medida que la frecuencia disminuye, hasta alcanzar un máximo alrededor de 33° en el intervalo de frecuencias de 300 a 100 Hz, lo cual muestra una transición de un comportamiento resistivo (ángulo de fase 0°) a uno capacitivo al pasar de altas a bajas frecuencias, que está asociado al carácter capacitivo de paredes bacterianas que aíslan eléctricamente el medio intracelular del

## DETECCIÓN DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS POR ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELÉCTRICAS

extracelular [37], la cual es más evidente para la cepa *E. coli* posiblemente por la diferente composición química de su pared bacteriana [23].

En la Fig. 12 se presentan las curvas de la magnitud de la impedancia en función de la frecuencia para las cepas *S. aureus* y *E. coli* en presencia de cristal violeta y lugol, obtenidas a diferentes tiempos de incubación. La cepa *S. aureus* muestra una marcada disminución progresiva de la magnitud de la impedancia eléctrica con el aumento de la población bacteriana (*S. aureus* Fig. 12A-D). Sin embargo, el comportamiento para la cepa *E. coli* es diferente, así durante la primera hora los valores de impedancia disminuyen, pero posteriormente aumentan de manera progresiva (*E. coli* Fig. 12B-D). Estas diferencias se deben a la particular interacción entre el CV, el lugol y la pared bacteriana de cada cepa [13]. Teniendo en cuenta que en la literatura se ha sugerido que la diferenciación estructural entre bacterias podría ser realizada en función del tiempo de incubación [23], en la Fig. 13 se presenta el comportamiento de la razón de cambio en el tiempo de incubación de la magnitud de la impedancia eléctrica en función de la frecuencia.



**Fig. 12.** Diagrama de Bode de la magnitud de la impedancia de *S. Aureus* y *E.coli* en suspensión de PBS, TSB, CV y lugol a diferentes tiempos de incubación A) 0h, B) 1h, C) 2h y D) 3h.

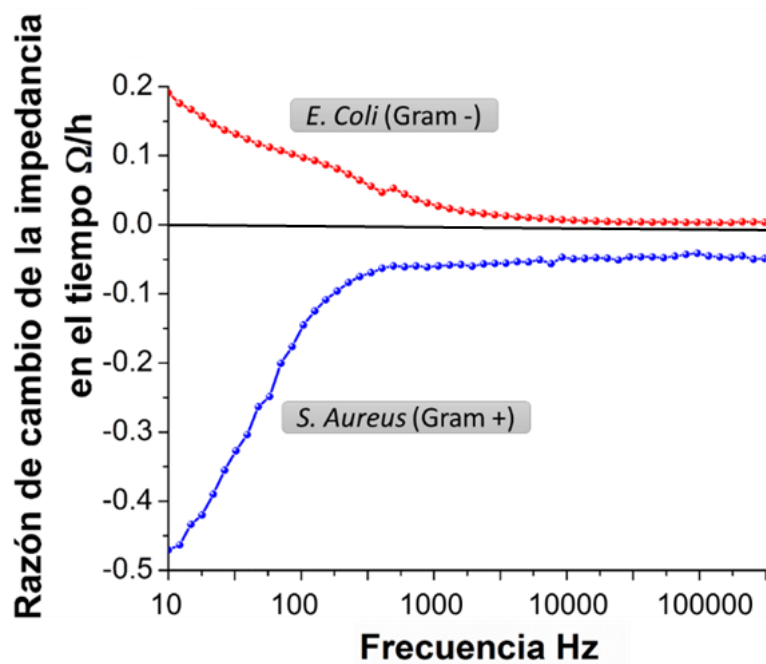
## DETECCIÓN DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS POR ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELÉCTRICAS

En el intervalo de frecuencias de 100 a 10 Hz (Fig. 13) se observa una marcada diferencia en el comportamiento de la razón de cambio de la magnitud de la impedancia eléctrica para cada cepa. Así, para la *E. coli* los valores de la razón de cambio de la magnitud de la impedancia eléctrica son positivos, mientras que para la *S. aureus* son negativos; además, cuando la frecuencia disminuye se observa que la razón de cambio se incrementa para cada cepa. Por tanto, estos resultados demuestran que la metodología aquí propuesta permite diferenciar entre bacterias Gram positivas y Gram negativas. Cabe resaltar que la diferencia del comportamiento antes mencionado sólo se observa cuando en la suspensión bacteriana están presentes los dos componentes principales de la tinción de Gram: cristal violeta y lugol (Anexo 1).

Las diferencias observadas en la Fig. 13 pueden estar relacionadas con la interacción de los componentes principales de la tinción de Gram, cristal violeta y lugol con la pared bacteriana. Teniendo en cuenta que la pared de la *E. coli* es menos permeable que la de *S. aureus*, por la presencia de una membrana externa [9], una concentración remanente de cristal violeta y lugol quedaría en la solución como componentes del medio extracelular, de manera que el lugol podría reaccionar con las especies de carbono cargadas, como aminoácidos cargados del medio de cultivo TSB, para formar oligómeros sin carga. Además es posible que el lugol interactúe con los lipopolisacáridos [38], que se encuentran en gran cantidad como componentes de la pared celular de la *E. coli*, formando estructuras más complejas que pueden ocasionar un aumento de la magnitud de la impedancia eléctrica de la solución. Sin embargo, sale de los alcances de este trabajo dar una mayor explicación al fenómeno que origina el incremento progresivo de la magnitud de la impedancia de la *E. coli* con el tiempo de incubación.

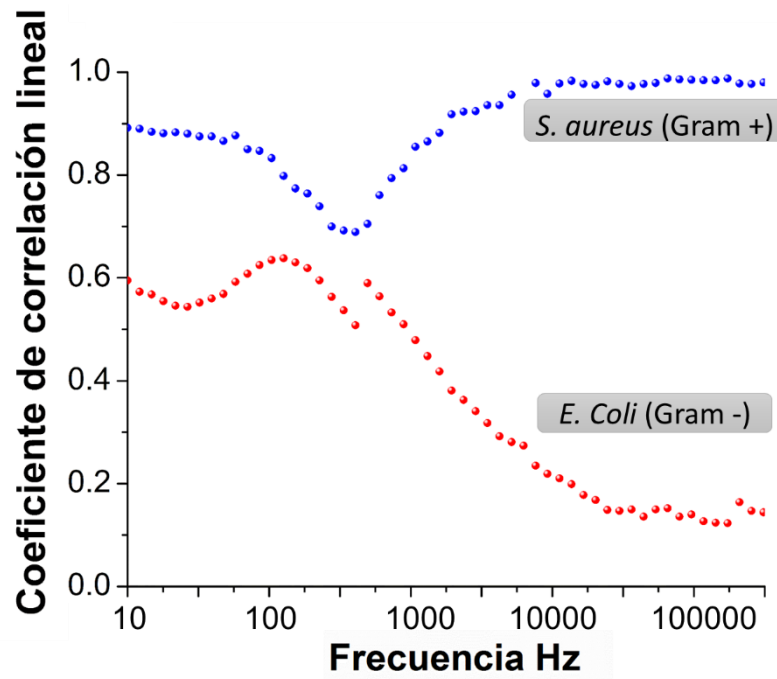
## DETECCIÓN DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS POR ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELÉCTRICAS

Con el fin de mostrar la sensibilidad del método, se graficaron los coeficientes de correlación lineal de cada una de las razones de cambio de la magnitud de la impedancia eléctrica con el tiempo de incubación en función de las frecuencias. En la Fig. 14 se observa que los coeficientes de correlación más altos para la cepa *S. aureus* se presentan a frecuencias altas (>10000 Hz), mientras que para la *E. coli* se presentan a bajas frecuencias (<100 Hz). Los bajos valores de los coeficientes de correlación lineal para la *E.coli* en comparación con la *S. aureus* pueden ser atribuidos a fenómenos de mayor complejidad que ocurren entre el CV, lugol, la pared bacteriana y los diferentes componentes del medio extracelular.



**Fig. 13.** Razón de cambio de la magnitud de la impedancia a diferentes frecuencias para las cepas *E. coli* y *S. aureus* en presencia de cristal violeta y lugol.

## DETECCIÓN DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS POR ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELÉCTRICAS



**Fig. 14.** Coeficientes de correlación lineal en función de la frecuencia de la razón de cambio de la magnitud de la impedancia para las cepas *E. coli* y *S. aureus* en presencia de cristal violeta y lugol

### 5. Conclusiones

Se evaluó la espectroscopia de impedancia eléctrica como técnica para la detección de bacterias Gram positivas y Gram negativas por medio de un diseño experimental de cuatro electrodos y células en suspensión. En esta investigación se obtuvieron cultivos de *S. aureus*, que son bacterias Gram positivas y *E. coli*, Gram negativas. A partir de experimentos de bacterias en suspensión se encontró que una concentración de  $10^4$  a  $10^6$  UFC/mL permite obtener espectros de impedancia

## DETECCIÓN DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS POR ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELÉCTRICAS

eléctrica que pueden ser comparados para diferenciar entre estos dos tipos de bacteria cuando se adiciona cristal violeta y el par redox  $I_2/I^-$  (lugol).

Se usaron señales sinusoidales de corriente con frecuencias comprendidas entre 10 Hz y 1 MHz. A bajas frecuencias ( $<10^2$  Hz) se observaron propiedades eléctricas diferentes para la bacteria Gram positiva y la Gram negativa, atribuidas a la forma particular de interacción entre la pared bacteriana de *S. aureus* (Gram positiva) y *E. coli* (Gram negativa) con el cristal violeta y lugol ( $I_2/I^-$ ).

Debido a la sensibilidad de la espectroscopia de impedancia eléctrica, la concentración de cristal violeta utilizada para la determinación de las bacterias fue significativamente menor (1/600.000) que la concentración de la tinción de Gram. Esta concentración de cristal violeta fue seleccionada luego de evaluar diferentes concentraciones de cristal violeta a partir de la medición de sus propiedades eléctricas por espectroscopia de impedancia eléctrica.

Es de anotar que para procesar los datos se utilizó un software especial escrito en python el cual permite procesar los lotes de datos obtenidos de los experimentos y graficar las razones de cambio de la magnitud de la impedancia. El tratamiento de los datos no implica un consumo de tiempo adicional. Lo anterior permite que inmediatamente después de terminado el experimento, aproximadamente tres horas, se pueda realizar la identificación del tipo de bacteria. Estos relativamente cortos tiempos para detectar el tipo de bacteria sugiere que la metodología propuesta podría ser utilizada para la administración de antibióticos cuando un paciente llega a una unidad de cuidados intensivos (UCI), ya que de la identificación del tipo de bacteria puede depender la expectativa de vida del paciente. El método aquí desarrollado representa una alternativa muy

## DETECCIÓN DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS POR ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELÉCTRICAS

atractiva para disminuir los tiempos de respuesta al determinar el tipo de bacteria y así seleccionar el antibiótico adecuado o evitar suministrarlo. Sin embargo, estudios clínicos son necesarios para poder escalar la metodología para su uso en la UCI.

### **6. Recomendaciones**

De acuerdo a las diferencias encontradas a bajas frecuencias en la razón de cambio de la magnitud de la impedancia eléctrica respecto para la *E. coli* y *S. aureus*, se recomienda evaluar un mayor número de cepas de tipo Gram positivas y Gram negativas para verificar que la metodología aquí propuesta puede ser usada para diferenciar cualquier tipo de bacteria Gram positiva o negativa.

Además, con la finalidad de explorar la potencialidad del método desarrollado, se sugiere realizar medidas de impedancia eléctrica en medios más complejos que los empleados en este trabajo, por ejemplo, muestras biológicas infectadas por bacterias como la saliva, esputos, líquidos de abscesos cutáneos y orina, entre otras.

# DETECCIÓN DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS POR ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELÉCTRICAS

## Referencias bibliográficas

- Aiartza, A., Azaldegui, F., Esparza, M., Lanzeta, I., Sannino, C., & Urbizu, A. (2011). Actualización de la guía de actuación ante el *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) y otros microorganismos multirresistentes en centros gerontológicos, sociosanitarios y para personas con discapacidad. *Donostia-San Sebastián: Donostia Ospitalea-Hospital Donostia, Osakidetza*. Recuperado de: [https://www.osakidetza.euskadi.eus/contenidos/informacion/hd\\_publicaciones/es\\_hdon/adjuntos/Guia\\_Sarm\\_C.pdf](https://www.osakidetza.euskadi.eus/contenidos/informacion/hd_publicaciones/es_hdon/adjuntos/Guia_Sarm_C.pdf)
- Aksan, I., (2015). *Techniques in Genetic Engineering, Florida*, Estados Unidos: CRC Press. Pp 145-147.
- Álvarez-Lerma, F., Álvarez, B., Luque, P., Ruiz, F., Domínguez-Roldan, J. M., Quintana, E., & Sanz-Rodríguez, C. (2006). Empiric broad-spectrum antibiotic therapy of nosocomial pneumonia in the intensive care unit: a prospective observational study. *Critical Care, 10*(3) R78.
- Bartholomew, J. W., & Mittwer, T. (1952). The gram stain. *Bacteriological Reviews, 16*(1) 1-29.
- Bladen, H. A., & Mergenhagen, S. E. (1964). Ultrastructure of *Veillonella* and morphological correlation of an outer membrane with particles associated with endotoxic activity. *Journal of bacteriology, 88*(5) 1482-1492.

## DETECCIÓN DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS POR ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELÉCTRICAS

- Bork, A. M. (1963). Maxwell, displacement current, and symmetry. *American Journal of Physics*, 31(11) 854-859.
- Bottone, E. J. (2016). The gram stain: the century-old quintessential rapid diagnostic test. *Laboratory Medicine*, 19(5) 288-291.[5] McKay, G. S. (1970). Gram stain modified to improve colour contrast. *Journal of clinical pathology*, 23(2) 191.
- Cady, P., Dufour, S. W., Shaw, J., & Kraeger, S. J. (1978). Electrical impedance measurements: rapid method for detecting and monitoring microorganisms. *Journal of clinical microbiology*, 7(3) 265-272.
- Castañeda-Briones, M.T. (2004). *Microbiología aplicada: manual de laboratorio*. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Azcapotzalco 205.
- Chaparro, C. V., Herrera, L. V., Meléndez, A. M., & Miranda, D. A. (2016). Considerations on electrical impedance measurements of electrolyte solutions in a four-electrode cell. In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 687, No. 1, p. 012101). IOP Publishing.
- Das, D., Kamil, F. A., Biswas, K., & Das, S. (2014). Evaluation of single cell electrical parameters from bioimpedance of a cell suspension. *RSC Advances*, 4(35), 18178-18185.
- Gersing, E. (1998). Impedance spectroscopy on living tissue for determination of the state of organs. *Bioelectrochemistry and bioenergetics*, 45(2) 145-149.
- Grimnes, S., & Martinsen, Ø. G. (2006), Sources of error in tetrapolar impedance measurements on biomaterials and other ionic conductors. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 40(1) 9.

## DETECCIÓN DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS POR ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELÉCTRICAS

- Kocanda, M., Lipton, S., Opegard, S., ElSawa, S. F., Abdel-Motaleb, I., Liu, L., Rajashankar, S., Korampally, V., Roberts, A., y Fritz, C. (2014, June). Structural differentiation of common bacteria using impedance spectroscopy. In *Electro/Information Technology (EIT), 2014 IEEE International Conference on* (pp. 518-523). IEEE.
- Koneman, E. W., & Allen, S. (2008). *Koneman. Diagnostico Microbiologico/Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/Text and Color Atlas*. Buenos Aires, Argentina, Ed. Médica Panamericana.
- Ma, W., Ying, Y. L., Qin, L. X., Gu, Z., Zhou, H., Li, D. W., ... & Long, Y. T. (2013). Investigating electron-transfer processes using a biomimetic hybrid bilayer membrane system. *Nature protocols*, 8(3), 439.
- Macdonald, J. R., & Barsoukov, E. (2005). *Impedance spectroscopy: theory, experiment, and applications*. John Wiley & Sons.
- Matthews, G. G. (2002). Electrical properties of cells. *Cellular Physiology of Nerve and Muscle, Fourth Edition*, 216-224.
- Moron, Z., Rucki, Z., & Szczepanik, Z. (1996). Possibilities of employing a calculable four-electrode conductance cell to substitute the secondary standards of electrolytic conductivity. In *Instrumentation and Measurement Technology Conference, 1996. IMTC-96. Conference Proceedings. Quality Measurements: The Indispensable Bridge between Theory and Reality, IEEE* (Vol. 1, pp. 127-131). IEEE.
- Moulay, S. (2013). Molecular iodine/polymer complexes. *Journal of Polymer Engineering*, 33(5), 389-443.

## DETECCIÓN DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS POR ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELÉCTRICAS

Norma técnica Colombiana NTC 4092, (2009). *Microbiología de alimentos y productos para alimentación animal. Requisitos generales y directrices para análisis microbiológicos*. Instituto colombiano de normas técnicas y certificaciones (ICONTEC).

Ovalle, M. V., Saavedra, S. Y., González, M. N., Hidalgo, A. M., Duarte, C., & Beltrán, M. (2016). Resultados de la vigilancia nacional de resistencia antimicrobiana en infecciones asociadas a la atención en salud en enterobacterias y Gram negativos no fermentadores, Colombia 2012-2014. *Biomédica*, 37(4).

Popescu, A., & Doyle, R. J. (1996). The Gram stain after more than a century. *Biotechnic & histochemistry*, 71(3) 145-151.

Prado, A., Rodríguez, G., & Figueroa, I. (2013). Manual de prácticas de laboratorio de microbiología de los alimentos. *Universidad Autónoma Metropolitana de México*.

Ramírez, N., Regueiro, A., Arias, O., & Contreras, R. (2009). Electrochemical impedance spectroscopy: An effective tool for a fast microbiological diagnosis. *Biotecnología Aplicada*, 26, 72-78.

Richards, J. C. S., Jason, A. C., Hobbs, G., Gibson, D. M., & Christie, R. H. (1978). Electronic measurement of bacterial growth. *Journal of physics E: Scientific instruments*, 11(6) 560.

Sánchez, S., Martínez, R., Alonso, J. M., & Rey, J. (2010). Aspectos clínicos y patogénicos de las infecciones por Escherichia coli O157: H7 y otros E. coli verotoxigénicos. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 28(6) 370-374.

Silley, P., Mortimer, F. (2003). Impedance. En: Easter, M. C. (Ed.). *Rapid microbiological methods in the pharmaceutical industry (pp 99-123)*. CRC Press.

## DETECCIÓN DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS POR ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELÉCTRICAS

- Soley, A., Lecina, M., Gámez, X., Cairo, J. J., Riu, P., Rosell, X., ... & Godia, F. (2005). On-line monitoring of yeast cell growth by impedance spectroscopy. *Journal of biotechnology*, 118(4) 398-405.
- Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2007). *Introducción a la Microbiología*. Ed. Médica Panamericana. 85-88.
- Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2007). *Introducción a la Microbiología*, Buenos Aires, Argentina, Ed. Médica Panamericana. 172-174.
- Van der Paw, L. J, (1958). A method of measuring the resistivity and Hall coefficient on lamellae of arbitrary shape. *20*(8) 220-224
- Villafañe, H. H. M. (2008). *Microbiología básica para el área de la salud y afines*. 2. Universidad de Antioquia. 33-34.
- Villalobos, A. P., Barrero, L. I., Rivera, S. M., Ovalle, M. V., & Valera, D. (2014). Vigilancia de infecciones asociadas a la atención en salud, resistencia bacteriana y consumo de antibióticos en hospitales de alta complejidad, Colombia, 2011. *Biomédica*, 34(1).
- Wilhelm, M. J., Sheffield, J. B., Gh, M. S., Wu, Y., Spahr, C., Gonella, G y Dai, H. L. (2015). Gram's stain does not cross the bacterial cytoplasmic membrane.A-G
- Yang, L. (2008). Electrical impedance spectroscopy for detection of bacterial cells in suspensions using interdigitated microelectrodes. *Talanta*, 74(5) 1621-1629.
- Yang, L., & Bashir, R. (2008). Electrical/electrochemical impedance for rapid detection of foodborne pathogenic bacteria. *Biotechnology advances*, 26(2) 135-150.

# DETECCIÓN DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS POR ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELÉCTRICAS

## Bibliografía

- [1] Álvarez-Lerma, F., Álvarez, B., Luque, P., Ruiz, F., Domínguez-Roldan, J. M., Quintana, E., & Sanz-Rodríguez, C. (2006). Empiric broad-spectrum antibiotic therapy of nosocomial pneumonia in the intensive care unit: a prospective observational study. *Critical Care*, *10*(3) R78.
- [2] Ovalle, M. V., Saavedra, S. Y., González, M. N., Hidalgo, A. M., Duarte, C., & Beltrán, M. (2016). Resultados de la vigilancia nacional de resistencia antimicrobiana en infecciones asociadas a la atención en salud en enterobacterias y Gram negativos no fermentadores, Colombia 2012-2014. *Biomédica*, *37*(4).
- [3] Villalobos, A. P., Barrero, L. I., Rivera, S. M., Ovalle, M. V., & Valera, D. (2014). Vigilancia de infecciones asociadas a la atención en salud, resistencia bacteriana y consumo de antibióticos en hospitales de alta complejidad, Colombia, 2011. *Biomédica*, *34*(1).
- [4] Bottone, E. J. (2016). The gram stain: the century-old quintessential rapid diagnostic test. *Laboratory Medicine*, *19*(5) 288-291.
- [5] McKay, G. S. (1970). Gram stain modified to improve colour contrast. *Journal of clinical pathology*, *23*(2) 191.
- [6] Chaparro, C. V., Herrera, L. V., Meléndez, A. M., & Miranda, D. A. (2016). Considerations on electrical impedance measurements of electrolyte solutions in a four-electrode cell. In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 687, No. 1, p. 012101). IOP Publishing.

## DETECCIÓN DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS POR ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELÉCTRICAS

[7] Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2007). *Introducción a la Microbiología*. Ed. Médica Panamericana. 85-88.

[8] Villafañe, H. H. M. (2008). *Microbiología básica para el área de la salud y afines*. 2. Universidad de Antioquia. 33-34.

[9] Bladen, H. A., & Mergenhagen, S. E. (1964). Ultrastructure of Veillonella and morphological correlation of an outer membrane with particles associated with endotoxic activity. *Journal of bacteriology*, 88(5) 1482-1492.

[10] Aiartza, A., Azaldegui, F., Esparza, M., Lanzeta, I., Sannino, C., & Urbizu, A. (2011). Actualización de la guía de actuación ante el Staphylococcus aureus resistente a meticilina (SARM) y otros microorganismos multirresistentes en centros gerontológicos, sociosanitarios y para personas con discapacidad. *Donostia-San Sebastián: Donostia Ospitalea-Hospital Donostia, Osakidetza*. Recuperado de:

[https://www.osakidetza.euskadi.eus/contenidos/informacion/hd\\_publicaciones/es\\_hdon/adjuntos/Guia\\_Sarm\\_C.pdf](https://www.osakidetza.euskadi.eus/contenidos/informacion/hd_publicaciones/es_hdon/adjuntos/Guia_Sarm_C.pdf)

[11] Sánchez, S., Martínez, R., Alonso, J. M., & Rey, J. (2010). Aspectos clínicos y patogénicos de las infecciones por Escherichia coli O157: H7 y otros E. coli verotoxigénicos. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 28(6) 370-374.

[12] Bartholomew, J. W., & Mittwer, T. (1952). The gram stain. *Bacteriological Reviews*, 16(1) 1-29.

## DETECCIÓN DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS POR ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELÉCTRICAS

- [13] Koneman, E. W., & Allen, S. (2008). *Koneman. Diagnostico Microbiologico/Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/Text and Color Atlas*. Buenos Aires, Argentina, Ed. Médica Panamericana.
- [14] Wilhelm, M. J., Sheffield, J. B., Gh, M. S., Wu, Y., Spahr, C., Gonella, G y Dai, H. L. (2015). Gram's stain does not cross the bacterial cytoplasmic membrane.A-G
- [15] Popescu, A., & Doyle, R. J. (1996). The Gram stain after more than a century. *Biotechnic & histochemistry*, 71(3) 145-151.
- [16] Macdonald, J. R., & Barsoukov, E. (2005). *Impedance spectroscopy: theory, experiment, and applications*. John Wiley & Sons.
- [17] Yang, L. (2008). Electrical impedance spectroscopy for detection of bacterial cells in suspensions using interdigitated microelectrodes. *Talanta*, 74(5) 1621-1629.
- [18] Yang, L., & Bashir, R. (2008). Electrical/electrochemical impedance for rapid detection of foodborne pathogenic bacteria. *Biotechnology advances*, 26(2) 135-150.
- [19] Ramírez, N., Regueiro, A., Arias, O., & Contreras, R. (2009). Electrochemical impedance spectroscopy: An effective tool for a fast microbiological diagnosis. *Biotecnología Aplicada*, 26, 72-78.
- [20] Cady, P., Dufour, S. W., Shaw, J., & Kraeger, S. J. (1978). Electrical impedance measurements: rapid method for detecting and monitoring microorganisms. *Journal of clinical microbiology*, 7(3) 265-272.

## DETECCIÓN DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS POR ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELÉCTRICAS

- [21] Richards, J. C. S., Jason, A. C., Hobbs, G., Gibson, D. M., & Christie, R. H. (1978). Electronic measurement of bacterial growth. *Journal of physics E: Scientific instruments*, 11(6) 560.
- [22] Silley, P., Mortimer, F. (2003). Impedance. En: Easter, M. C. (Ed.). *Rapid microbiological methods in the pharmaceutical industry (pp 99-123)*. CRC Press.
- [23] Kocanda, M., Lipton, S., Oppegard, S., Elsawa, S. F., Abdel-Motaleb, I., Liu, L., Rajashankar, S., Korampally, V., Roberts, A., y Fritz, C. (2014, June). Structural differentiation of common bacteria using impedance spectroscopy. In *Electro/Information Technology (EIT), 2014 IEEE International Conference on* (pp. 518-523). IEEE.
- [24] Van der Paw, L. J, (1958). A method of measuring the resistivity and Hall coefficient on lamellae of arbitrary shape. 20(8) 220-224
- [25] Moron, Z., Rucki, Z., & Szczepanik, Z. (1996). Possibilities of employing a calculable four-electrode conductance cell to substitute the secondary standards of electrolytic conductivity. In *Instrumentation and Measurement Technology Conference, 1996. IMTC-96. Conference Proceedings. Quality Measurements: The Indispensable Bridge between Theory and Reality, IEEE* (Vol. 1, pp. 127-131). IEEE.
- [26] Grimnes, S., & Martinsen, Ø. G. (2006), Sources of error in tetrapolar impedance measurements on biomaterials and other ionic conductors. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 40(1) 9.
- [27] Gersing, E. (1998). Impedance spectroscopy on living tissue for determination of the state of organs. *Bioelectrochemistry and bioenergetics*, 45(2) 145-149.

## DETECCIÓN DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS POR ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELÉCTRICAS

- [28] Aksan, I., (2015). *Techniques in Genetic Engineering, Florida*, Estados Unidos: CRC Press. Pp 145-147.
- [29] Matthews, G. G. (2002). Electrical properties of cells. *Cellular Physiology of Nerve and Muscle, Fourth Edition*, 216-224.
- [30] Soley, A., Lecina, M., Gámez, X., Cairo, J. J., Riu, P., Rosell, X., ... & Godia, F. (2005). On-line monitoring of yeast cell growth by impedance spectroscopy. *Journal of biotechnology*, 118(4) 398-405.
- [31] Bork, A. M. (1963). Maxwell, displacement current, and symmetry. *American Journal of Physics*, 31(11) 854-859.
- [32] Castañeda-Briones, M.T. (2004). *Microbiología aplicada: manual de laboratorio*. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Azcapotzalco 205.
- [33] Ma, W., Ying, Y. L., Qin, L. X., Gu, Z., Zhou, H., Li, D. W., ... & Long, Y. T. (2013). Investigating electron-transfer processes using a biomimetic hybrid bilayer membrane system. *Nature protocols*, 8(3), 439.
- [34] Norma técnica Colombiana NTC 4092, (2009). *Microbiología de alimentos y productos para alimentación animal. Requisitos generales y directrices para análisis microbiológicos*. Instituto colombiano de normas técnicas y certificaciones (ICONTEC).
- [35] Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2007). *Introducción a la Microbiología*, Buenos Aires, Argentina, Ed. Médica Panamericana. 172-174.

## DETECCIÓN DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS POR ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELÉCTRICAS

[36] Prado, A., Rodríguez, G., & Figueroa, I. (2013). Manual de prácticas de laboratorio de microbiología de los alimentos. *Universidad Autónoma Metropolitana de México*.

[37] Das, D., Kamil, F. A., Biswas, K., & Das, S. (2014). Evaluation of single cell electrical parameters from bioimpedance of a cell suspension. *RSC Advances*, 4(35), 18178-18185.

[38] Moulay, S. (2013). Molecular iodine/polymer complexes. *Journal of Polymer Engineering*, 33(5), 389-443.

# DETECCIÓN DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS POR ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELÉCTRICAS

## Anexo I

**Anexo I.** Razón de cambio de la magnitud de la impedancia a diferentes frecuencias para las cepas

*E. coli* y *S. aureus* en presencia de cristal violeta.

