



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS
CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA



Tema: Determinación de la correlación entre Métodos Visuales, Ópticos y Difusión en placa en el Crecimiento de *Escherichia coli*.

Trabajo de titulación, modalidad Proyecto de Investigación, previa a la obtención de título de Ingeniera Bioquímica, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

El presente estudio es parte del proyecto: **“Desarrollo de películas biodegradables activas a partir de harina de plátano (*Musa balbisiana*) de rechazo y su aplicación agroalimentaria”** aprobado por el Honorable Consejo Universitario y financiado por el Centro de Investigación de la Universidad Técnica de Ambato. Resolución 1313-CU-P-2015. Coordinado por la PhD. Mirari Arancibia.

Autor: Johanna Elizabeth Fiallos Núñez

Tutor: Ph.D. Nahir Yerely Dugarte Jiménez

Ambato - Ecuador

Septiembre - 2017

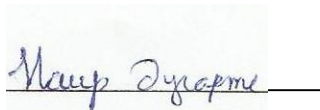
APROBACIÓN DEL TUTOR

Ph.D. Nahir Yerely Dugarte Jiménez

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación bajo la modalidad de Proyecto de Investigación, el mismo que responde las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad.

Ambato, 11 de julio del 2017



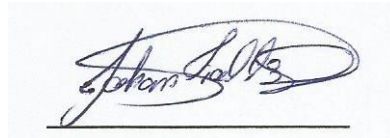
Ph.D. Nahir Yerely Dugarte Jiménez

C.I. 1753479193

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Johanna Elizabeth Fiallos Núñez, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniería Bioquímica, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Johanna Elizabeth Fiallos Núñez', is centered on the page. The signature is written in a cursive style and is positioned above a thin horizontal line.

Johanna Elizabeth Fiallos Núñez

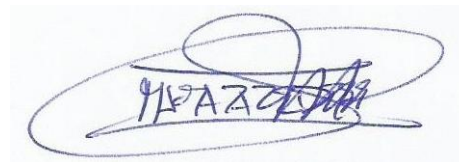
C.I. 1804140810

AUTORA

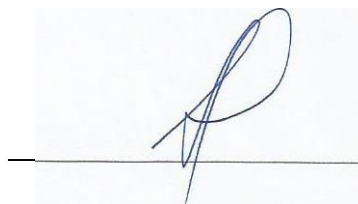
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos profesores calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato.

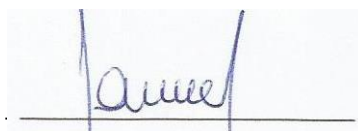
Para constancia firman:



Presidente del tribunal



MSc. Yunys Pérez Betancourt
C.I. 1756472740



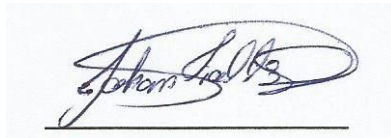
MSc. Lander Vinicio Pérez Aldáz
C.I. 1802706596

Ambato, 08 de Agosto del 2017

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este proyecto de investigación o parte de él un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Proyecto, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este Proyecto dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando no suponga una ganancia económica y se realice respetando los derechos de autor.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Johanna Elizabeth Fiallos Núñez', written over a horizontal line.

Johanna Elizabeth Fiallos Núñez

C.I. 1804140810

AUTORA

DEDICATORIA

A mis padres quienes lo dieron todo para que logre alcanzar mis sueños, este es el reflejo de que todos los sacrificios hechos dieron su fruto. Gracias por su confianza en mí y por el amor incondicional.

A mi hermano quien ha sido mi compañero de vida y ha hecho de este camino el mejor.

A la pequeña persona que llena de luz y felicidad mis días, Emma.

A mi estrella Leonor, quien me enseñó la importancia de la humildad en nuestras vidas.

La ignorancia afirma o niega rotundamente; la ciencia duda.

Voltaire

AGRADECIMIENTO

Agradezco a la vida por cada experiencia, cada alegría y cada tristeza; por demostrarme que en todos sus matices la vida es bella.

A las doctoras Nahir Dugarte y Mirari Arancibia quienes me apoyaron durante todo el proceso, por su paciencia y su dedicación.

Al químico César Yambay por compartir sus conocimientos y por el tiempo entregado para que este proyecto se realice de la mejor manera.

A la Universidad Técnica de Ambato, en especial a la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos por formarme como profesional. Gracias a sus profesores que no solo compartieron sus conocimientos académicos sino también valores para la formación personal.

A mis tíos Raúl y Rodrigo por ser un gran apoyo durante toda mi vida, por su cariño y las enseñanzas de vida para crecer personalmente.

Agradezco a mis amigas que formaron parte de cada etapa de mi vida y que hasta el día de hoy siguen presentes en mi vida compartiendo alegrías, tristezas, aventuras y enseñanzas.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

PAGINAS PRELIMINARES

PORTADA	1
APROBACIÓN DEL TUTOR	i
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD	ii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO	iii
DERECHOS DE AUTOR	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTO.....	vi
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
RESUMEN	xiii
ABSTRACT.....	xiv
INTRODUCCIÓN	xv

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

1.1 Tema de Investigación.....	1
1.2 Justificación	1
1.3 Objetivos.....	2
1.3.1 Objetivo General	2
1.3.2 Objetivos Específicos	2

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes Investigativos.....	3
2.2 Hipótesis	9
2.3 Señalamiento de variables de las hipótesis	9

CAPÍTULO III

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Evaluación de la influencia del reactivo en exceso en la preparación de la escala McFarland.....	10
3.2 Preparación de la Escala McFarland utilizando Ácido Sulfúrico y Sulfato de Sodio.....	11
3.3 Estabilidad de la Escala McFarland en el tiempo	11
3.4 Escala Propuesta.....	11
3.5 Activación de <i>Escherichia coli</i>	12
3.6 Activación de <i>Escherichia coli</i> a partir de viales.	13
3.7 Determinación del número de exponente de crecimiento bacteriano de <i>Escherichia coli</i>	13
3.8 Cinética de crecimiento	14
3.9 Determinación del Factor de crecimiento.....	14
3.10 Correlación de los métodos ópticos, visual y recuento en placa	15
3.11 Análisis de resultados	15

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis y discusión de los resultados	16
4.1.1 Evaluación de la influencia del reactivo en exceso en la preparación de la escala McFarland.....	16

4.1.2 Determinación de la diferencia entre ácido sulfúrico y sulfato de sodio como reactivos para la preparación de la escala McFarland	17
4.1.3 Estabilidad de la Escala McFarland en el tiempo.....	19
4.1.4 Escala Propuesta de Turbidez	20
4.1.5 Determinación del exponente de <i>Escherichia coli</i>	22
4.1.6 Cinética de crecimiento	25
4.1.7 Determinación del factor de crecimiento.....	26
4.1.8 Proyección del microorganismo con métodos ópticos, visual y recuento en placa	27
4.2 Verificación de hipótesis	30

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones	31
5.2 Recomendaciones.....	31
Fuentes de referencia.....	32

MATERIAL DE REFERENCIA

ANEXOS	34
--------------	----

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentraciones de Ácido Sulfúrico y Sulfato de Sodio para cada punto de la escala.	10
Tabla 2. Volúmenes de ácido sulfúrico (H_2SO_4), sulfato de sodio (Na_2SO_4) y cloruro de bario ($BaCl_2$) para la elaboración de la escala McFarland.	11
Tabla 3. Volúmenes de sulfato de sodio (Na_2SO_4) y cloruro de bario ($BaCl_2$) para la elaboración de la escala propuesta.	12
Tabla 4. Prueba t Student del efecto de la utilización de Sulfato de Sodio (Na_2SO_4) y Ácido Sulfúrico (H_2SO_4) para la preparación de la Escala McFarland.	18
Tabla 5. Mediciones de absorbancia del estándar 1 de la Escala McFarland almacenada durante seis días a condiciones de luz y oscuridad.	19
Tabla 6. ANOVA para el estándar 1 de la Escala McFarland.	19
Tabla 7. Mediciones de absorbancia del estándar 7 de la Escala McFarland almacenada durante seis días a condiciones de luz y oscuridad.	19
Tabla 8. ANOVA para el estándar 7 de la Escala McFarland.	20
Tabla 9. Datos de la regresión lineal de la figura de absorbancias en la escala propuesta.	21
Tabla 10. Datos de la regresión lineal de la figura de NTU en la escala propuesta.	22
Tabla 11. UFC/ml obtenidas en recuento en placa frente a UFC/ml teóricas en espectrofotómetro.	23
Tabla 12. UFC/ml obtenidas en recuento en placa frente a UFC/ml teóricas en turbidímetro.	24
Tabla 13. Factor de crecimiento de <i>E. coli</i> en el espectrofotómetro.	27
Tabla 14. Factor de crecimiento de <i>E. coli</i> en el turbidímetro.	27
Tabla 15. Proyecciones del crecimiento de <i>E. coli</i> en el espectrofotómetro.	27
Tabla 16. Proyecciones del crecimiento de <i>E. coli</i> en el turbidímetro.	28
Tabla 17. Correlación entre métodos ópticos, visual y recuento en placa.	28
Tabla 18. ANOVA de los métodos ópticos, visual y recuento en placa.	29
Tabla 19. Test de Tukey para los métodos ópticos, visual y recuento en placa.	30

Tabla 20. Mediciones de absorbancia del estándar 2 de la Escala McFarland almacenada durante seis días a condiciones de luz y oscuridad.	35
Tabla 21. ANOVA para el estándar 2 de la Escala McFarland.	35
Tabla 22. Mediciones de absorbancia del estándar 3 de la Escala McFarland almacenada durante seis días a condiciones de luz y oscuridad.	35
Tabla 23. ANOVA para el estándar 3 de la Escala McFarland.	36
Tabla 24. Mediciones de absorbancia del estándar 4 de la Escala McFarland almacenada durante seis días a condiciones de luz y oscuridad.	36
Tabla 25. ANOVA para el estándar 4 de la Escala McFarland.	36
Tabla 26. Mediciones de absorbancia del estándar 5 de la Escala McFarland almacenada durante seis días a condiciones de luz y oscuridad.	37
Tabla 27. ANOVA para el estándar 5 de la Escala McFarland.	37
Tabla 28. Mediciones de absorbancia del estándar 6 de la Escala McFarland almacenada durante seis días a condiciones de luz y oscuridad.	37
Tabla 29. ANOVA para el estándar 6 de la Escala McFarland.	38
Tabla 30. Mediciones de absorbancia del estándar 8 de la Escala McFarland almacenada durante seis días a condiciones de luz y oscuridad.	38
Tabla 31. ANOVA para el estándar 8 de la Escala McFarland.	38
Tabla 32. Mediciones de absorbancia del estándar 9 de la Escala McFarland almacenada durante seis días a condiciones de luz y oscuridad.	39
Tabla 33. ANOVA para el estándar 9 de la Escala McFarland.	39
Tabla 34. Mediciones de absorbancia del estándar 10 de la Escala McFarland almacenada durante seis días a condiciones de luz y oscuridad.	39
Tabla 35. ANOVA para el estándar 10 de la Escala McFarland.	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sistema Espectrofotométrico	6
Figura 2. Sistema Nefelométrico	7
Figura 3. Estructura del genero Enterobacteriaceae	8
Figura 4. Esquema de la activación de <i>Escherichia. coli</i> a partir de un vial.	13
Figura 5. Diluciones seriadas para determinar el exponente de <i>Escherichia coli</i>	14
Figura 6. Curvas McFarland preparadas a partir de una solución de Ácido Sulfúrico y Sulfato de Sodio 0.048 M.	16
Figura 7. Curvas McFarland preparadas a partir de varias soluciones de Ácido Sulfúrico y Sulfato de Sodio.	16
Figura 8. Absorbancias obtenidas de la escala propuesta.....	21
Figura 9. Unidades Nefelométricas de Turbidez obtenidas de la escala propuesta. ...	21
Figura 10. Cinética de crecimiento en espectrofotómetro de <i>Escherichia coli</i>	25
Figura 11. Cinética de crecimiento en turbidímetro de <i>Escherichia coli</i>	25
Figura 12. Estimación lineal de la escala preparada con Sulfato de Sodio.	34
Figura 13. Estimación lineal de la escala preparada con Ácido Sulfúrico.	34

RESUMEN

En el presente estudio se evaluó la correlación entre métodos ópticos: espectrofotómetro y turbidímetro, visuales: Escala McFarland y el método de referencia difusión en placa para determinar la concentración de *Escherichia coli* a las 9 horas. El método visual no presentó una correlación con el método de referencia, debido a que es un método netamente cualitativo. En el caso de los métodos ópticos se obtuvo que el espectrofotómetro tuvo un error del 91,4%, mientras que el turbidímetro es el único que presentó una correlación con el método de referencia y su error fue de 2,2%. El turbidímetro es un método de cuantificación rápido de la concentración de *Escherichia coli* como alternativa al método tradicional de difusión en placa.

Palabras claves: Microbiología Predictiva, concentración celular, espectrofotómetro, turbidímetro, Escala McFarland.

ABSTRACT

The correlation between optical methods: Spectrophotometer and turbidimeter, visual method: McFarland scale and the reference method of plate diffusion were evaluated in order to determinate the concentration of *Escherichia coli* at 9 hours. The visual method doesn't have a correlation with the reference method because is a qualitative method and the measurements are subjective. In the case of the optical methods, the spectrophotometer had an error of 91,4% in comparison of the turbidimeter with an error of 2,2%. The turbidimeter was the only method which has a correlation with the reference method and can be used as an alternative for the traditional plate diffusion method.

Key words: Predictive Microbiology, cellular concentration, spectrophotometer, turbidimeter, McFarland scale.

INTRODUCCIÓN

Las técnicas microbiológicas con mayor frecuencia se enfocan a la detección de microorganismos patógenos; existen métodos convencionales para su detección tales como la filtración por membrana, siembra en profundidad o vertido en placa, sin embargo estos métodos requieren de periodos de tiempo relativamente largos para toda la preparación de materiales y por otro lado el costo es mayor ya que se necesitan medios de cultivos específicos para cada microorganismo.

Debido a que los métodos tradicionales de Microbiología para cuantificar microorganismos son laboriosos y requieren de mucho tiempo, se han desarrollado nuevas técnicas de conteo rápido y efectivo en donde se busca optimizar el tiempo realizando menor número de ensayos (Alonso & Poveda, 2008). La microbiología predictiva es una nueva rama que combina la modulación matemática con el conocimiento de las respuestas del crecimiento microbiano sobre un rango de condiciones, para permitir predicciones sobre el crecimiento (Presser, Ross, & Ratkowsky, 1998).

La metodología más utilizada para la cuantificación de bacterias presentes en una unidad de volumen es el recuento de viables en placa, consiste en realizar diluciones seriadas a partir de una muestra inicial y esparcir una cantidad de muestra sobre una placa; las placas se incuban hasta obtener colonias visibles para su recuento. La principal desventaja de este método es que conlleva un alto consumo de tiempo y se necesita de grandes cantidades de volumen de medios de cultivo (Corral et al., 2012; Olivas & Alarcon, 2012).

Las técnicas turbidimétricas son métodos rápidos y eficaces para estimar el crecimiento celular en múltiples bioprocesos. La medición de turbidez se basa en los fenómenos ópticos que se originan al incidir un haz de luz a través de un medio; la presencia de partículas suspendidas produce una dispersión de la luz, lo que interfiere en el haz de luz resultante (Acebo & Hernández, 2012). Un método tradicional para las mediciones de turbidez es la escala McFarland, que consiste en la preparación de estándares a partir de Cloruro de Bario y Ácido sulfúrico dando como producto partículas suspendidas de Sulfato de Bario; químicamente la formación de sulfato de bario depende de los iones

sulfato y bario, partiendo de esto se puede utilizar los reactivos que se disponga en el laboratorio y que su uso represente menor riesgo.

Los diseños básicos para la medición de turbidez son: el espectrofotómetro que mide la absorbancia de la luz incidente por la muestra y el nefelómetro que mide tanto la transmisión de la intensidad de la luz como su dispersión. El nefelómetro cuenta con un sensor situado a 90° del rayo de luz incidente, tiene una limitada precisión a elevadas turbiedades puesto que a medida que aumenta la turbidez aumenta la cantidad de luz dispersa, disminuyendo la intensidad de luz difusa que llega al detector (Lambrou, Anastasiou, & Panayiotou, s.f).

CAPITULO I

EL PROBLEMA

1.1 Tema de Investigación

DETERMINACIÓN DE LA CORRELACIÓN ENTRE MÉTODOS VISUALES, ÓPTICOS Y DIFUSIÓN EN PLACA EN EL CRECIMIENTO DE *Escherichia coli*.

1.2 Justificación

Los análisis microbiológicos para la cuantificación de microorganismos requieren de un largo periodo de tiempo para la realización de ensayos, el enriquecimiento y la incubación de las muestras. Además, se utilizan medios selectivos para la determinación de microorganismos específicos, lo que incrementa el costo de ensayo y la obtención de resultados puede demorar días incluso semanas. Dichas limitaciones han impulsado al desarrollo de métodos que den resultados rápidos (Potter & Hotchkiss, 1995).

Para la cuantificación de bacterias el método más utilizado es el recuento de células viables, no obstante su limitación es el largo tiempo por lo que es necesario recurrir a métodos que aporten resultados en corto tiempo (Sieuwerts, de Bok, Mols, Vos, & Vlieg, 2008). Una de las ramas más estudiada para la predicción del crecimiento de microorganismos es la Microbiología Predictiva, la cual sintetiza en modelos matemáticos y ecuaciones el comportamiento del crecimiento microbiano en respuesta a factores ambientales (McMeekin et al., 1997). Los modelos predictivos primarios son aquellos que describen la variación del número microbiano por crecimiento, multiplicación e inactivación, en función del tiempo. La cuantificación se puede efectuar por Unidades Formadoras de Colonias (UFC), biomasa, niveles de metabolitos producidos o medidas de absorbancia (Santiesteban & López, 2008). Por otro lado, la turbidimetría es un método utilizado para el seguimiento del crecimiento no destructivo, de bajo costo y rápido, encontrado en amplias aplicaciones en el campo de Ingeniería Bioquímica (Dalgaard, Ross, Kamperman, Neumeyer, & McMeekin, 1993).

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

- Determinar la correlación entre métodos visuales, ópticos y difusión en placa para cuantificar el crecimiento y monitoreo celular de la bacteria *Escherichia coli*.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Determinar la influencia del reactivo en exceso según la preparación de la escala McFarland de forma tradicional frente al método de preparación propuesto en los métodos ópticos.
- Determinar si existe diferencias entre la escala McFarland preparada con ácido sulfúrico frente a la preparada con sulfato de sodio y verificar la estabilidad de la escala McFarland en función del tiempo tanto para la escala preparada con ácido sulfúrico y sulfato de sodio.
- Comparar las unidades formadoras de colonias obtenidas por el método turbidimétrico y espectrofotométrico con el método de referencia de la difusión en placa para la bacteria *Escherichia coli* expresada en UFC/ml.
- Determinar el número de exponente de crecimiento bacteriano en *Escherichia coli*.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes Investigativos

2.1.1 Microbiología Predictiva

La incertidumbre cada día aumenta en un mundo donde se experimentan cambios debido a los adelantos tecnológicos y científicos; la característica primaria de los microorganismos frente a estos cambios son la explotación y adaptación lo que se debe a su pequeño tamaño, variedad genética y su velocidad de reproducción lo cual les ayuda a colonizar casi todos los hábitats en la tierra (McMeekin et al., 1997).

Los análisis microbiológicos se basan en técnicas que requieren un tiempo determinado para el crecimiento de los microorganismos, el cual tiene un impacto desfavorable en la industria al tomar decisiones (Presser et al., 1998). El tiempo necesario para la revitalización de las células y su recuento a través de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC), es por lo mínimo de 48 horas y se emplea gran cantidad de medios de cultivo. Además, en el caso de patógenos es necesario recurrir a pruebas bioquímicas o el uso de medios selectivos para su identificación lo cual conlleva a un mayor tiempo para obtener resultados. Por tal motivo se ha desarrollado la Microbiología Predictiva donde se encuentran métodos rápidos para la obtención de resultados en menor tiempo (Rasooly & Herold, 2008), así como también se puede procesar un mayor número de muestras por unidad de tiempo y en general son fáciles de usar, precisos y económicamente rentables (Herranz, 2015).

Según (Presser et al., 1998) La Microbiología Predictiva en los últimos años se ha convertido en una herramienta de vanguardia para la evaluación de las respuestas de los microorganismos frente a factores ambientales mediante modelos matemáticos apropiados. Se debe especificar las limitaciones al desarrollar un modelo microbiológico, es decir, el microorganismo de estudio, los factores con los que se trabaja, los límites de los factores y las combinaciones de factores que aporten resultados válidos para la predicción y comportamiento; ya que al adicionar factores

que no se encontraban en el modelo inicial afectan la predicción y la interpretación de resultados, por ello los modelos predictivos no pueden ser generales, sino específicos para cada estudio (Yarce, 2013).

2.1.2 Método de Difusión en placa

La cuantificación de bacterias es un elemento crítico en los estudios de Microbiología; el recuento en placa es un método tradicional utilizado para determinar la población de una muestra. Consiste en realizar diluciones seriadas a partir de una muestra inicial y colocar 100 µl de cada dilución en una placa extendiéndola con el asa de Digralsky; las placas se incuban hasta que las colonias sean visibles para su recuento. La ventaja de este método es que presenta un alto límite de detección y es sencillo de realizar, sin embargo es laborioso ya que requiere de mucho tiempo para el plaqueo de medio de cultivo, se requiere de una gran cantidad de tubos de ensayo y en el caso que se parta de una muestra con población desconocida se debe realizar por lo mínimo 7 diluciones y sembrarlas a todas ocupando más material del necesario lo que significa un mayor costo (Corral et al., 2012; Herranz, 2015)

2.1.3 Método Visual

2.1.3.1 Escala McFarland

La escala McFarland consiste básicamente en una serie de tubos estandarizados que contienen una suspensión de un precipitado fino que se asemejan a suspensiones bacterianas en opacidad. Los estándares que se utilizan son precipitados de Sulfato de bario que se obtiene al mezclar Cloruro de Bario con Ácido Sulfúrico; mezclando distintas cantidades de reactivo se obtiene diez estándares con diferente turbiedad. Las suspensiones bacterianas se comparan visualmente con los estándares hasta encontrar al más similar en turbiedad y se lo relaciona con el número de células de acuerdo a cada estándar. Se debe tomar en cuenta que al momento de comparar los estándares con una suspensión bacteriana se debe utilizar tubos similares en diámetro para eliminar los errores (McFarland, 1907).

Los estándares de McFarland son utilizados como patrones de turbidez en la preparación de suspensiones de microorganismos. La turbiedad se la define como la

reducción de la transparencia de un líquido causada por la presencia de materia no disuelta, esta puede ser afectada por sustancias presentes en la muestra que absorban luz, así como también las burbujas de aire interfieren en la medición (INEN, 2013).

Uno de los primeros usos de esta técnica fue en el cálculo de poblaciones bacterianas para la preparación de vacunas basándose en el fundamento de McFarland en donde aproximadamente la medición de turbidez de una suspensión bacteriana es equivalente a los recuentos en placa de la misma suspensión (Becton & Dickinson, 2005).

2.1.4 Métodos Ópticos

La turbidez es considerada como un indicador de apariencia óptica que se origina por la dispersión y absorción de la energía lumínica a través de un líquido; se la relaciona con la ley de Lambert-Beer en donde la turbidez es proporcional a la concentración de partículas. Se debe mencionar que la principal desventaja de usar la densidad óptica para un modelo predictivo en el crecimiento celular es que no se puede tomar como una medida directa de viabilidad celular, ya que tanto las células viables como las no viables absorben a una longitud de onda específica (Davies & Smith, 2001; Hoffman & Preetham, 2002; Jenkins & White, 1965)

En un reciente estudio para determinar la capacidad de remoción de cadmio mediante las levaduras *Rhodotorula mucilaginosa*, *Cryptococcus gastricus* y *Saccharomyces cerevisiae* se utilizó la técnica de McFarland para la medición de la concentración de las levaduras mediante un Espectrofotómetro UV-visible; y a partir de la ecuación de la recta se obtuvieron las unidades formadoras de colonia por mililitro; basándose en la ley de Lambert-Beer donde la turbidez es proporcional a la concentración. Para evitar el error al detectar las células no viables en el estudio se determinó el factor de crecimiento de cada levadura con el objetivo de controlar la concentración inicial de levaduras y llevar la suspensión a una concentración final conocida evitando el crecimiento incontrolable (Jácome, 2016).

La medición de la turbidez de una suspensión depende del tamaño y forma de las células, del medio que se utilice en el estudio, así como también de las condiciones ambientales. La correlación entre la turbidez y la concentración de las partículas

depende de las especies bacterianas que se estén analizando; así como también de la cepa específica utilizada. La medición de turbidez de suspensiones bacterianas se ha implementado como una estimación de los indicadores de crecimiento de microorganismos y se lo utiliza como una alternativa para el método de recuento en placa tradicional (Holliday, Rasmussen, & Miller, 2003; Métris, George, Peck, & Baranyi, 2003)

2.1.4.1 Espectroscopia Ultravioleta Visible (UV-Vis)

La espectroscopia UV-Vis utiliza la radiación del espectro electromagnético, su longitud de onda está comprendida entre los 190 y 1100 nm. El efecto que tiene sobre la materia es producir transiciones electrónicas entre los orbitales atómicos y moléculas de la sustancia. Este método se basa en que una especie química absorbe UV-Vis y la energía que se adquiere por el sistema causa la transición de un electrón de un estado basal o fundamental (EF) a uno excitado (EE) (Castro, Litter, Wong, & Mori, 2002).

La respuesta del sistema se observa como un gráfico al que se le denomina espectro, en estos se observa una señal debida a cada transición electrónica del EF al EE. La señal espectral permite estimar la concentración de un analito.

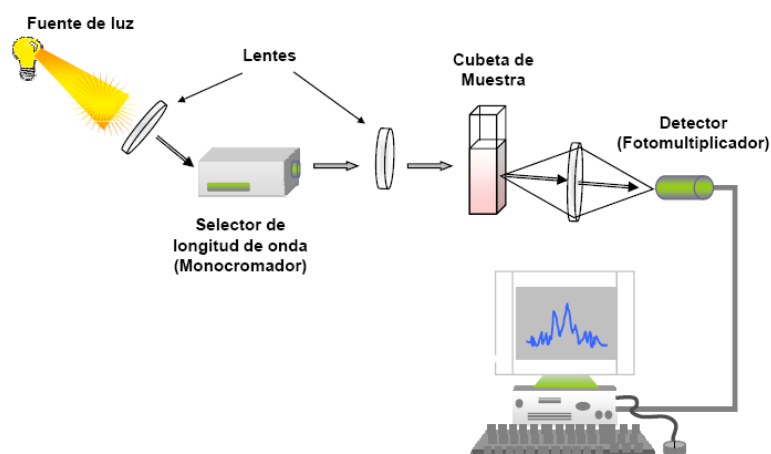


Figura 1. Sistema Espectrofotométrico

2.1.4.2 Nefelometría

La nefelometría se deriva del griego Nephele que significa neblina o nube, esta se define como la detección de la energía lumínica dispersada hacia un detector que no se encuentra en el camino directo del haz luminoso. Las mediciones se las realiza a un determinado ángulo en relación con el haz; la luz que se dispersa está en función de la longitud de onda del rayo incidente, de la forma y tamaño de las partículas. A mayor tamaño de las partículas una mayor cantidad de luz incidente se dispersará de su dirección inicial. Entre los años de 1967-1969 aparecieron los primeros nefelómetros por R. F. Ritchie disponibles en laboratorios clínicos, donde se los utilizó para la cuantificación de antígenos.

Un sistema nefelométrico ideal es aquel que produce un campo totalmente oscuro en el área del detector cuando no existen partículas difusoras, este método permite detectar partículas muy pequeñas en solución y detectar los estadios más precoces de la agregación molecular (Baltazar, 2015).

El sistema de medida para la turbidez es UNT (Unidad Nefelométrica de Turbidez), sin embargo existen otras unidades de medida establecidas como: Total de Solidos Suspendidos (SST) y Concentración de sedimento en suspensión (SSC) (Holliday et al., 2003).

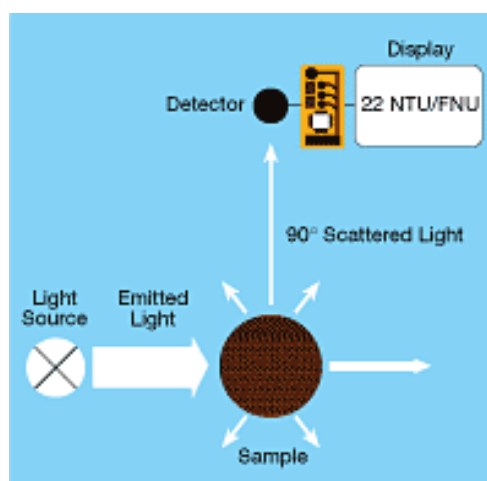


Figura 2. Sistema Nefelométrico

2.1.5 Enterobacterias

La familia Enterobacteriaceae constituye un gran grupo heterogéneo de bacterias Gram negativas, reciben su nombre por su hábitat como saprofitos en el tubo digestivo, aunque se trata de microorganismos ubicuos, se encuentran de forma universal en el suelo, el agua y la vegetación, también forman parte de la flora intestinal normal de muchos animales del hombre (García & Rodríguez, 2010).

2.1.5.1 Escherichia Coli

En 1885 un pediatra alemán Escherich aisló por primera vez la bacteria *Escherichia coli* y rápidamente se convirtió en la especie más conocida de la familia Enterobacteriaceae. Esta bacteria se caracteriza por poseer bacilos Gram negativos, no esporulante; además fermenta la glucosa y la lactosa con producción de gas. Su estructura está compuesta por tres elementos principales: una estructura multilaminar en su envoltura celular, la membrana citoplasmática consiste en una doble capa de fosfolípidos el cual regula el paso de nutrientes, macromoléculas y metabolitos. Su capa externa está formada por peptidoglicano delgado junto con un espacio periplásmico en donde existe una gran concentración de proteínas. El peptidoglicano es la estructura que confiere la rigidez y forma de la bacteria y le permite resistir presiones osmóticas ambientales elevadas (García & Rodríguez, 2010).

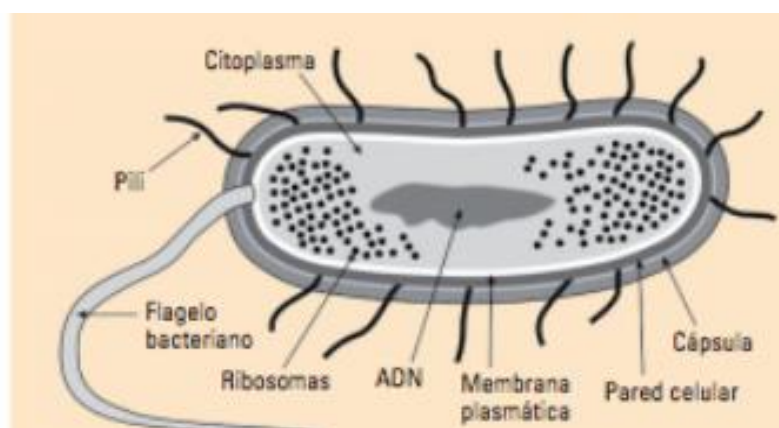


Figura 3. Estructura del genero Enterobacteriaceae

La temperatura optima de crecimiento de *E. coli* se encuentra entre 35-47°C y su pH optima es de 7,2. Su capacidad patogénica es debido a su ubicuidad que favorece la aparición reiterada de cepas con nuevas propiedades.

2.2 Hipótesis

2.2.1 Hipótesis Nula

¿Existe una correlación entre Métodos Visuales, Ópticos y Difusión en placa en el Crecimiento de *Escherichia coli*?

2.2.2 Hipótesis Alternativa

¿No existe una correlación entre Métodos Visuales, Ópticos y Difusión en placa en el Crecimiento de *Escherichia coli*?

2.3 Señalamiento de variables de las hipótesis

2.3.1 Variable Independiente

Unidades Formadoras de Colonia (UFC)

2.3.2 Variable Dependiente

Mediciones de turbidez en: Unidad Nefelométrica de Turbidez (NTU) y Absorbancia.

CAPITULO III

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Evaluación de la influencia del reactivo en exceso en la preparación de la escala McFarland.

El principio de la escala McFarland es reaccionar iones sulfato con iones bario para dar como producto un precipitado de Sulfato de Bario; estequiométricamente se determinó que el reactivo en exceso es el portador del ion sulfato.

Para la preparación de la escala McFarland se utilizó Ácido Sulfúrico (H_2SO_4) y Sulfato de Sodio (Na_2SO_4) como reactivos portadores del ion Sulfato. Para determinar la influencia del reactivo en exceso se preparó una escala con solución de ácido sulfúrico (0,18M) y otra con solución de sulfato de sodio (0,18 M), adicionando cantidades que provocan un exceso de iones sulfatos de acuerdo a la forma tradicional.

Además, partiendo de la concentración de iones Bario que es el reactivo limitante se preparó varias soluciones que contienen las concentraciones adecuadas de iones sulfatos para evitar el exceso del mismo en cada punto de la escala (Tabla 1). Se mantuvo el uso de Cloruro de Bario (0,048M) como reactivo portador del ion Bario y se procedió a preparar las escalas en una relación de volúmenes detallada en la Tabla 1 por triplicado. Finalmente, se compararon las escalas preparadas utilizando un espectrofotómetro Hach Modelo DR 5000 UV-Vis a 600 nm (Alemania).

Tabla 1. Concentraciones de Ácido Sulfúrico y Sulfato de Sodio para cada punto de la escala.

Escala de McFarland	BaCl ₂ *2H ₂ O (0,048M)	H ₂ SO ₄ / Na ₂ SO ₄ (ml)	Volumen final (ml)	H ₂ SO ₄ (g/L) 96,5% pureza	Na ₂ SO ₄ (g/L) 99% pureza	Concentración celular (UFC x 10 ⁸ /ml)
<i>1</i>	0,1	9,9	10	0,724	0,069	3
<i>2</i>	0,2	9,8		0,717	0,139	6
<i>3</i>	0,3	9,7		0,710	0,211	9
<i>4</i>	0,4	9,6		0,703	0,284	12
<i>5</i>	0,5	9,5		0,695	0,359	15
<i>6</i>	0,6	9,4		0,688	0,435	18
<i>7</i>	0,7	9,3		0,681	0,513	21
<i>8</i>	0,8	9,2		0,673	0,593	24
<i>9</i>	0,9	9,1		0,666	0,674	27
<i>10</i>	1,0	9,0		0,659	0,758	30

3.2 Preparación de la Escala McFarland utilizando Ácido Sulfúrico y Sulfato de Sodio.

A partir de las varias soluciones de ácido sulfúrico y sulfato de sodio, realizadas en el apartado 3.1.1 se prepararon escalas por triplicado; los volúmenes que se mezclaron para cada estándar se observa en la Tabla 2. Luego se midió la turbidez de las escalas en el espectrofotómetro Hach Modelo DR 5000 UV-Vis a 600 nm y se compararon las diferencias entre reactivos.

Tabla 2. Volúmenes de ácido sulfúrico (H₂SO₄), sulfato de sodio (Na₂SO₄) y cloruro de bario (BaCl₂) para la elaboración de la escala McFarland.

Escala de McFarland	BaCl ₂ *2H ₂ O (0,048M)	H ₂ SO ₄ / Na ₂ SO ₄ (ml)	Volumen final (ml)	Concentración celular (UFC x 10 ⁸ /ml)
<i>1</i>	0,1	9,9	10	3
<i>2</i>	0,2	9,8		6
<i>3</i>	0,3	9,7		9
<i>4</i>	0,4	9,6		12
<i>5</i>	0,5	9,5		15
<i>6</i>	0,6	9,4		18
<i>7</i>	0,7	9,3		21
<i>8</i>	0,8	9,2		24
<i>9</i>	0,9	9,1		27
<i>10</i>	1,0	9,0		30

3.3 Estabilidad de la Escala McFarland en el tiempo

Se prepararon dos escalas utilizando tanto Ácido Sulfúrico como Sulfato de Sodio y se los cerró herméticamente para evitar la evaporación y concentración de la suspensión. A los tubos se los almaceno en luz y oscuridad a temperatura ambiente para determinar la estabilidad en el tiempo. Los tubos fueron leídos durante seis días en el espectrofotómetro a 600 nm.

3.4 Escala Propuesta

Para optimizar el tiempo y facilitar el uso de la escala se preparó una Escala de Turbiedad con 4 puntos con un punto inicial de 10 x 10⁸ UFC/ml y un punto máximo de 40 x 10⁸ UFC/ml, éste se calculó a partir de la concentración del producto Sulfato

de Bario. En la tabla 3 se observan los volúmenes necesarios para cada punto y las concentraciones de los mismo; se realizaron 3 réplicas. Los estándares de la escala fueron medidos en el espectrofotómetro a 600 nm y en el turbidímetro Lovibond TB310 IR a 860 nm (Alemania).

Tabla 3. Volúmenes de sulfato de sodio (Na_2SO_4) y cloruro de bario (BaCl_2) para la elaboración de la escala propuesta.

Concentración Celular (UFC x 10^8 /ml)	BaCl_2 0,048M (ml)	Na_2SO_4 (ml)	Volumen Final (ml)	Na_2SO_4 pureza 99% (gr/L)
10	0,33	9,67	10	0,2375
20	0,67	9,33		0,4921
30	1,00	9,00		0,7653
40	1,33	8,67		1,0596

3.5 Activación de *Escherichia coli*

Se utilizó la cepa de referencia *Escherichia coli* ATCC 25922 de los microorganismos disponibles en la Unidad Operativa de Investigación y desarrollo (UODIDE-ICIA). El medio de cultivo empleado fue caldo BHI (Brain Heart Infusion) (Becton Dickinson and Company, Francia), se colocaron 5 ml de caldo en tubos de ensayo; éste fue preparado 1 día antes utilizando un autoclave a 121 °C por 15 minutos. Los hisopos comerciales que contenían el microorganismo liofilizado fueron sumergidos en los tubos que contenían caldo y posteriormente se los incubó a 37 °C por 24 horas. Para comprobar la viabilidad y pureza de la cepa patógena se realizó una estría simple y se la incubó a las condiciones mencionadas anteriormente; una vez que se comprobó la pureza del microorganismo se procedió a criopreservar. Se tomó 1 ml de microorganismo de los tubos y se lo colocó en un criovial; después se colocaron 300µl de glicerol y se vortizó hasta homogenizar. Los crioviales fueron almacenados a -20 °C.

3.6 Activación de *Escherichia coli* a partir de viales.

La activación de la cepa patógena se basó en el método de Sánchez and Corrales (2005) modificado. Se retiró el vial congelado y se verificó que estuviese bien cerrado. Se esperó hasta la completa descongelación del vial; en 5 ml de caldo BHI se inoculó una asada del microorganismo descongelado, se vortizó hasta homogenizar y se lo incubó a 37 °C por 24 horas. Al siguiente día los tubos se almacenaron a 4 °C en refrigeración para su uso posterior, el tiempo máximo de almacenamiento en refrigeración es de 3 meses para no perder la viabilidad de la cepa.



Figura 4. Esquema de la activación de *Escherichia. coli* a partir de un vial.

3.7 Determinación del número de exponente de crecimiento bacteriano de *Escherichia coli*.

Se activó el microorganismo almacenado en refrigeración, se inoculó 15 µl de la muestra en 30 ml de caldo BHI, la relación es de 5 µl por cada 10 ml de medio, se vortizó y se incubó a 37 °C por 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se midió la absorbancia a 600 nm y turbidez a 860 nm, utilizando caldo BHI como blanco. A partir de la absorbancia obtenida se calculó la concentración inicial de *E. coli* mediante la ecuación de la curva McFarland. Después se realizaron diluciones seriadas hasta 10⁸ y utilizando el método de recuento en placa se sembró 100 µl de las diluciones 10⁶, 10⁷ y 10⁸ en cajas Petri que contenían BHI Agar para determinar el exponente de la concentración de *Escherichia coli* (Figura 5). Este ensayo se realizó por triplicado (Jácome, 2016).

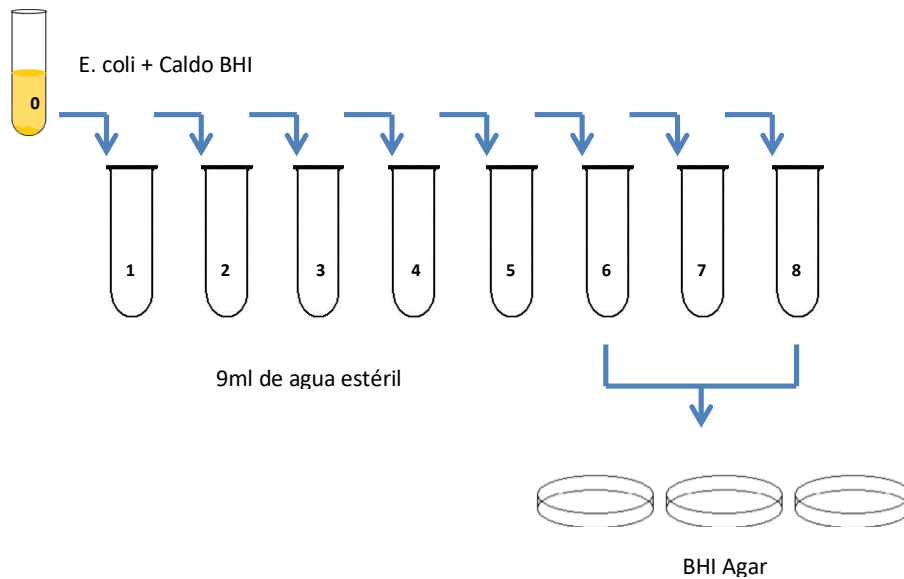


Figura 5. Diluciones seriadas para determinar el exponente de *Escherichia coli*.

3.8 Cinética de crecimiento

Se inoculó 100 µl de *Escherichia coli* en 200 ml de caldo BHI, el seguimiento del crecimiento bacteriano se lo realizo por 24 horas a 37 °C. Se tomó aproximadamente 10 ml de la suspensión bacteriana cada media hora y se midió su turbiedad en el espectrofotómetro a 600 nm y turbidímetro a 860 nm.

3.9 Determinación del Factor de crecimiento

Para determinar el factor de crecimiento se inoculó 15 µl de la suspensión microbiana almacenada en refrigeración en un matraz que contenía 30 ml de caldo BHI (Cultivo madre), esto se incubó a 37 °C por 9 horas. Posteriormente se midió la absorbancia (Abs) y turbiedad (NTU), los datos se interpolaron en la curva propuesta de turbiedad para determinar las Unidades Formadoras de Colonia por mililitro (UFC/ml) presentes en la muestra. A partir de estos datos se empleó la ecuación 1, donde se determinó el volumen de microorganismos a tomar del cultivo madre para inocular en un nuevo matraz, de volumen definido, el cual permite controlar el crecimiento de *Escherichia coli* en un tiempo de 9 horas.

$$C_{mo} * V_o = C_{mf} * V_f \quad \text{Ec. 1}$$

Donde:

C_{mo}: Concentración inicial de microorganismos (UFC calculados por interpolación).

V_o: Volumen del microorganismo a tomar para inoculación.

C_{mf}: Concentración final que se desea tener en el matraz (0.2×10^8 UFC/ml).

V_f: Volumen de medio de cultivo en el matraz (60 ml necesarios para el ensayo).

Se inocularon dos matraces con el volumen calculado, uno se incubó a 37 °C por 9 horas en agitación constante de 300 rpm y el otro se lo incubó a 37 °C por 9 horas sin agitación. Se tomaron alícuotas de los matraces a tiempo cero (T₀) y tiempo de 9 horas (T₉), determinando las concentraciones iniciales y finales a partir de las mediciones de absorbancia y turbiedad; a la par se realizaron siembras en placa de (T₀) y (T₉) de las diluciones 5 y 7 respectivamente, para su posterior comprobación por recuento en placa. Los factores de crecimiento se calcularon basándose en el método de (**Jácome, 2016**) mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Factor de crecimiento: } \text{Conc. Final} / \text{Conc. Inicial} \quad \text{Ec. 2}$$

3.10 Correlación de los métodos ópticos, visual y recuento en placa

Se tomó 15 µl de la solución madre de microorganismo almacenada en refrigeración y se colocó en 30 ml de caldo BHI, esto se llevó a incubar a 37 °C por 9 horas. La suspensión de E. coli activada se la comparó visualmente con el estándar McFarland más similar en turbidez y cualitativamente se determinó las Unidades Formadoras de Colonia del microorganismo. Posteriormente en los ensayos cuantitativos del microorganismo se midió 10 ml de la suspensión bacteriana en el Espectrofotómetro 600 nm y 10 ml en el turbidímetro a 860 nm. A partir de los tubos medidos se realizaron diluciones seriadas en tubos de 10 ml llegando hasta la dilución en el tubo 7 y se sembró dicha dilución mediante el método mencionado anteriormente de recuento en placa. Se llevó a incubación a 37 °C por 9 horas y se contaron las colonias. Finalmente, se analizó estadísticamente la correlación entre el método visual, óptico y de difusión en placa.

3.11 Análisis de resultados

Los ensayos realizados se realizaron por triplicado y se analizaron estadísticamente a través de un análisis de varianza y prueba de significancia t-Student y Tukey.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis y discusión de los resultados

4.1.1 Evaluación de la influencia del reactivo en exceso en la preparación de la escala McFarland

De acuerdo a la metodología detallada en el literal 3.1.1 se midieron las absorbancias a 600nm. A partir de los datos de absorbancia se graficó cada escala para determinar el coeficiente de correlación obtenido en cada curva.

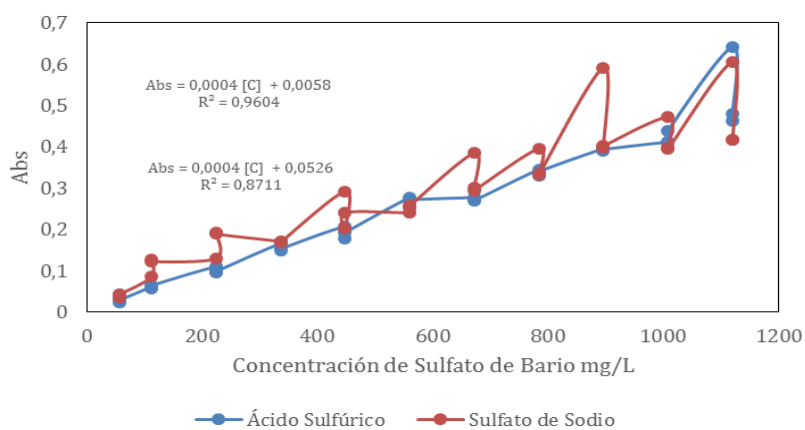


Figura 6. Curvas McFarland preparadas a partir de una solución de Ácido Sulfúrico y Sulfato de Sodio 0.048 M.

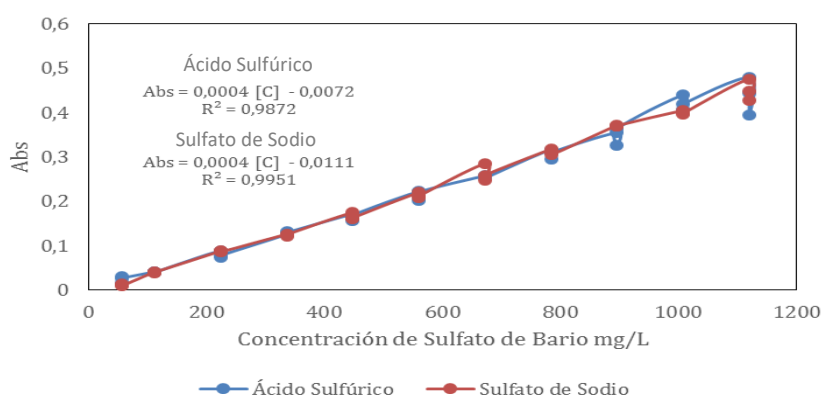


Figura 7. Curvas McFarland preparadas a partir de varias soluciones de Ácido Sulfúrico y Sulfato de Sodio.

A partir del coeficiente de correlación (R^2) obtenido en la ecuación de la recta para cada curva de la escala McFarland, se analizó el grado de relación que existe entre la concentración de Sulfato de Bario y las absorbancias de cada estándar. Las curvas que se muestran anteriormente presentan una correlación positiva, es decir su R^2 es mayor a 0 y por lo tanto las variables se relacionan en sentido directo. Sin embargo, las curvas realizadas con varias soluciones de Ácido sulfúrico y Sulfato de Sodio tienen un mejor ajuste, ya que sus valores de R^2 son mayores en comparación con las curvas realizadas de forma tradicional con una solución de Ácido Sulfúrico y Sulfato de Sodio 0.048 M.

Una reacción está dada por un reactivo limitante, el cual se agota primero; y un reactivo en exceso que no se agota por completo. El Sulfato de Sodio y Ácido Sulfúrico representan los reactivos en exceso en la escala McFarland, mientras que el Cloruro de Bario es el reactivo limitante. La Escala McFarland tradicional no controla la cantidad de reactivo en exceso para cada estándar ya que al preparar una solución de 0.048M existe una mayor cantidad de iones sulfato sin reaccionar, estos iones absorben a una determinada onda de luz y afectan las mediciones de absorbancia.

Para este estudio se trabajó con las curvas de Ácido Sulfúrico y Sulfato de sodio preparadas a partir de varias soluciones, ya que sus coeficientes de correlación fueron 0.9872 y 0.9951 respectivamente. Al estar más cercanos a 1 el coeficiente de correlación se puede deducir que estas curvas presentaron una mejor relación entre sus variables y un mejor ajuste.

4.1.2 Determinación de la diferencia entre ácido sulfúrico y sulfato de sodio como reactivos para la preparación de la escala McFarland

Se aplicó una prueba t Student con un nivel de significancia de 0.05 para comparar las absorbancias obtenidas de las escalas preparadas con Sulfato de Sodio y Ácido Sulfúrico.

Tabla 4. Prueba t Student del efecto de la utilización de Sulfato de Sodio (Na_2SO_4) y Ácido Sulfúrico (H_2SO_4) para la preparación de la Escala McFarland.

	Na_2SO_4 (abs)	H_2SO_4 (abs)
Media	0,2225	0,226933333
Varianza	0,018188672	0,015884823
Observaciones	30	30
Coefficiente de correlación de Pearson	0,995329938	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	29	
Estadístico t	-1,578185846	
P($T \leq t$) una cola	0,062685099	
Valor crítico de t (una cola)	1,699127027	
P($T \leq t$) dos colas	0,125370197	
Valor crítico de t (dos colas)	2,045229642	

El valor t calculado es menor al valor de t crítico, por lo tanto se deduce que no existe diferencia significativa al usar Sulfato de Sodio como reactivo portador de iones sulfato en diferencia al Ácido Sulfúrico que se utiliza en la escala tradicional de McFarland. Además, el uso de Ácido Sulfúrico presenta un mayor riesgo debido a que es una sustancia corrosiva el cual provoca daños en los tejidos corporales aun en bajas concentraciones. Al momento de manipular el ácido el peligro más importante se presenta al diluirlo en agua ya que produce una gran cantidad de calor, así como también la inhalación de los vapores que emana provoca daños severos en el tracto respiratorio y al contacto con los ojos puede existir pérdida total de la visión (Elvers & Hawkins, 1989).

Por otro lado, el coeficiente de correlación en el caso de la escala preparada con Sulfato de Sodio es 0,9967 (Figura 10) siendo mayor al de Ácido Sulfúrico de 0,9925 (Figura 11); por lo cual se decidió trabajar con Sulfato de Sodio ya que gráficamente presenta un mejor ajuste existiendo una mejor relación entre las variables.

4.1.3 Estabilidad de la Escala McFarland en el tiempo

Se aplicó el análisis de varianza de dos factores con un nivel de significancia de 0.05; el primer factor a analizar fue la estabilidad de cada estándar de la escala McFarland durante 6 días y el segundo factor fue el almacenamiento de la escala a condiciones de luz y oscuridad.

Tabla 5. Mediciones de absorbancia del estándar 1 de la Escala McFarland almacenada durante seis días a condiciones de luz y oscuridad.

Estandar 1	DIAS					
	1	2	3	4	5	6
luz	0,039	0,037	0,041	0,049	0,040	0,043
oscuridad	0,025	0,029	0,030	0,036	0,024	0,033

Tabla 6. ANOVA para el estándar 1 de la Escala McFarland.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Luz-oscuridad	0,000432	1	0,000432	102,857143	0,00015978	6,60789097
Días	0,000172	5	0,0000344	8,19047619	0,01879535	5,05032906
Error	2,1E-05	5	4,2E-06			
Total	0,000625	11				

Tabla 7. Mediciones de absorbancia del estándar 7 de la Escala McFarland almacenada durante seis días a condiciones de luz y oscuridad.

Estandar 7	DIAS					
	1	2	3	4	5	6
luz	0,249	0,242	0,248	0,241	0,251	0,258
oscuridad	0,251	0,264	0,275	0,262	0,261	0,271

Tabla 8. ANOVA para el estándar 7 de la Escala McFarland.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Luz-oscuridad	0,00075208	1	0,00075208	17,786756	0,00834835	6,60789097
Días	0,00033542	5	6,7083E-05	1,58651951	0,31243029	5,05032906
Error	0,00021142	5	4,2283E-05			
Total	0,00129892	11				

Al analizar el estándar 1 y 7 de la escala en condiciones de luz y oscuridad se observó que los valores de F calculados son mayores que los valores de F críticos, por lo tanto existe diferencia significativa al almacenar los estándares en condiciones de luz y oscuridad. Bibliográficamente se menciona que los estándares se los debe almacenar en un lugar oscuro a una temperatura de 2 – 25°C evitando el sobrecalentamiento y la congelación (Becton & Dickinson, 2005).

Por otro lado, en el análisis de varianza para la estabilidad en el tiempo de los estándares se observó que los valores de F calculados son mayores que los de F crítico; lo que nos indica que existe diferencia significativa al almacenar los tubos. Debido a esto los estándares de la escala McFarland deben ser preparados en el momento del análisis y desecharlos al terminar.

4.1.4 Escala Propuesta de Turbidez

En base a la metodología detallada en el literal 3.1.4 se midieron las absorbancias y NTU de la escala propuesta a 600 nm y 860 nm. Las escalas leídas tanto en espectrofotómetro y turbidímetro se las graficó para obtener las ecuaciones de la recta. A partir de las ecuaciones se despejaron las Unidades Formadoras de Colonia por mililitro (UFC/ml) para su posterior uso en las proyecciones.

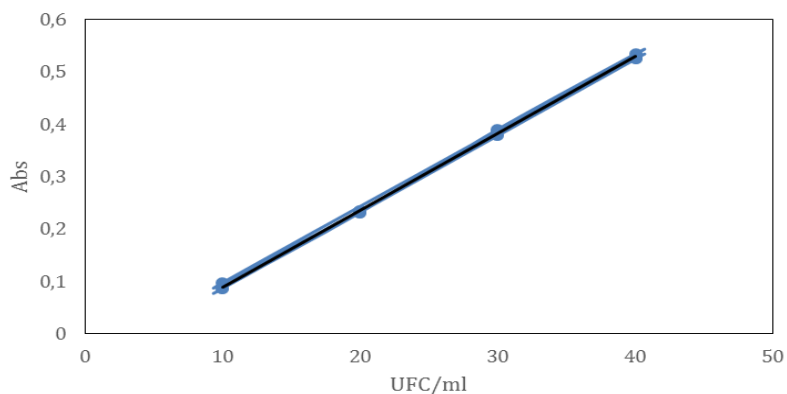


Figura 8. Absorbancias obtenidas de la escala propuesta.

A partir de la figura 8 se determinó la Ecuación Lineal para la interpolación de la concentración celular de *Escherichia coli* en el espectrofotómetro (Tabla 9).

Tabla 9. Datos de la regresión lineal de la figura de absorbancias en la escala propuesta.

Pendiente	0,0147
Ordenada en el origen	0,0565
Coefficiente de correlación lineal al cuadrado	0,9993
Ecuación lineal	$Abs = 0,0147(A) - 0,0565$
Ecuación de interpolación	$A = (Abs + 0,0565) / 0,0147$
Valor de A	Resultado obtenido en la interpolación
Dimensiones del resultado	$A * 10^8$ UFC/ml

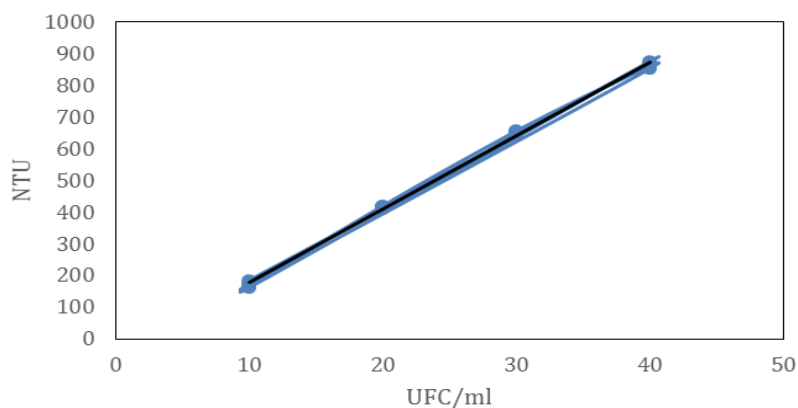


Figura 9. Unidades Nefelométricas de Turbidez obtenidas de la escala propuesta.

La ecuación para el cálculo de la concentración celular de *Escherichia coli* en turbidímetro se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 10. Datos de la regresión lineal de la figura de NTU en la escala propuesta.

Pendiente	23,153
Ordenada en el origen	52,333
Coefficiente de correlación lineal al cuadrado	0,9983
Ecuación lineal	$NTU = 23,153(A) - 52,333$
Ecuación de interpolación	$A = (NTU + 52,333) / 23,153$
Valor de A	Resultado obtenido en la interpolación
Dimensiones del resultado	$A * 10^8$ UFC/ml

Las medidas de absorbancia y turbidez de la escala propuesta presentaron unos coeficientes de correlación de 0.9993 y 0.9983 respectivamente, lo que indica que están relacionadas directamente con las Unidades Formadoras de colonia por mililitro. La ventaja en el uso de la escala propuesta en comparación con la escala de McFarland está en el ahorro de tiempo y recursos, ya que anteriormente se determinó que la escala McFarland no puede ser almacenada debido a la variación en las medidas de absorbancia y turbidez; lo que nos limita a preparar una nueva escala en cada ensayo. Además, la escala propuesta con tan solo 4 puntos presenta un mejor ajuste para el cálculo de UFC/ml.

4.1.5 Determinación del exponente de *Escherichia coli*

Las UFC obtenidas por recuento en placa de las diluciones 6, 7 y 8 fueron comparadas con las UFC teóricas calculadas a partir de las ecuaciones de la curva propuesta, tanto para absorbancia y turbidez (Tabla 11,12).

A continuación, se detalla un ejemplo de los cálculos realizados para obtener las UFC teóricas a partir de las ecuaciones de la curva propuesta.

Cálculo de UFC/ml en espectrofotómetro

$$\text{Abs} = 0.0147 (\text{UFC/ml}) - 0.0565 \quad \text{Ec. 3}$$

$$\text{UFC/ml} = (\text{Abs} + 0.0565) / 0.0147$$

$$\text{UFC/ml} = (0.626 + 0.0565) / 0.0147$$

$$\text{UFC/ml} = 46.4$$

Cálculo de UFC/ml en turbidímetro

$$\text{NTU} = 23.153 (\text{UFC/ml}) - 52.333 \quad \text{Ec. 4}$$

$$\text{UFC/ml} = (\text{NTU} + 52.333) / 23.153$$

$$\text{UFC/ml} = (627.22 + 52.333) / 23.153$$

$$\text{UFC/ml} = 29.4$$

Tabla 11. UFC/ml obtenidas en recuento en placa frente a UFC/ml teóricas en espectrofotómetro.

Réplica	Dilución	Promedio (*10 ⁸ UFC/ml)	Proyección en escala de 4 puntos	% Recuperación respecto a la dilución 7.
R1	6	133,0	46,4	33,4
	7	15,5		
	8	0,0		
R2	6	138,0	44,5	25,8
	7	11,5		
	8	1,3		
R3	6	137,0	42,1	36,8
	7	15,5		
	8	2,0		

Tabla 12. UFC/ml obtenidas en recuento en placa frente a UFC/ml teóricas en turbidímetro.

Réplica	Dilución	Promedio (*10 ⁸ UFC/ml)	Proyección en escala de 4 puntos	% Recuperación respecto a la dilución 7.
R1	6	153,0	29,4	54,4
	7	16,0		
	8	2,0		
R2	6	149,0	26,3	72,2
	7	19,0		
	8	1,7		
R3	6	140,3	25,1	59,8
	7	15,0		
	8	1,7		

Cálculo para determinar el número de exponente de *Escherichia coli*.

$$UFC = \frac{N \times FD}{Vi}$$

Ec. 5

$$UFC = \frac{16 \times 10^7}{0,1ml}$$

$$UFC = 16 \times 10^8 UFC/ml$$

Los datos obtenidos por el espectrofotómetro no fueron útiles para la determinación del número de exponente, ya que los porcentajes de recuperación fueron menores en comparación con el turbidímetro. Esto se puede deber a que *Escherichia coli* presenta cambios fisiológicos y morfológicos al ingresar en la fase estacionaria de crecimiento; en esta fase las proteínas de la bacteria se comienzan a desnaturalizar y también secreta metabolitos (Ramírez, Contreras, & Gómez, 2005). Debido al principio de funcionamiento del espectrofotómetro estas sustancias presentes en la suspensión bacteriana podrían estar absorbiendo luz, lo cual afecta las mediciones y la predicción de los UFC/ml. En el caso del turbidímetro la afectación de las sustancias presentes en la suspensión bacteriana no es notoria, ya que este instrumento mide la dispersión de la luz provocada por las bacterias presentes en la suspensión.

A partir de la Ecuación 5 se determinó que el número de exponente de *Escherichia coli* es de 10^8 .

4.1.6 Cinética de crecimiento

A partir de la curva de cinética se evaluó el crecimiento de *Escherichia coli* por 24 horas, para determinar el tiempo en que la bacteria se encuentra en su fase exponencial donde el incremento del número de microorganismos es máximo (Herriko, s.f).

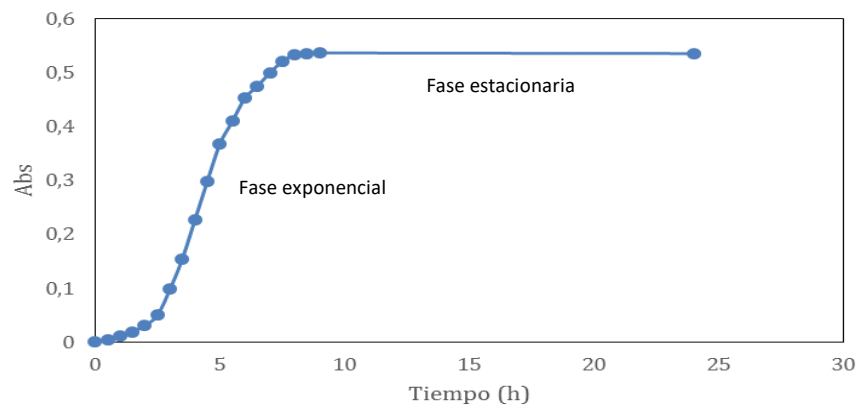


Figura 10. Cinética de crecimiento en espectrofotómetro de *Escherichia coli*.

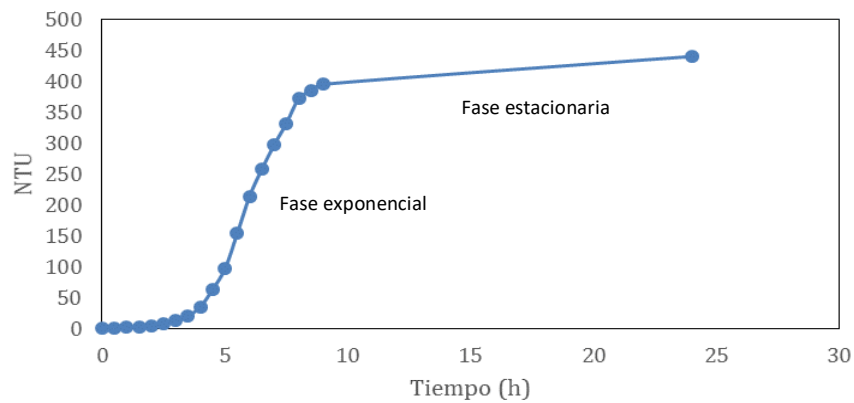


Figura 11. Cinética de crecimiento en turbidímetro de *Escherichia coli*.

Escherichia coli es una bacteria no esporulante, por lo tanto al entrar a la fase estacionaria su crecimiento es nulo porque los nutrientes se agotan. En esta fase la bacteria presenta cambios en su estructura y fisiología, donde el volumen celular disminuye debido a que la pared celular, proteínas y membrana citoplasmática

comienzan a degradarse. La viabilidad celular en la fase estacionaria es aproximadamente de 65% mientras que el 35% son células muertas que perdieron la integridad membranal (Ramírez et al., 2005).

Por otro lado, en la fase exponencial las bacterias recuperan su ciclo celular y aumenta el número de células exponencialmente. Mediante el gráfico se determinó que la bacteria *Escherichia coli* se encuentra en la fase exponencial de 4 a 9 horas. En la hora 9 se evidencia el mayor crecimiento del microorganismo antes de ingresar a la fase estacionaria, por tal motivo se tomó esta hora como referencia para la lectura de las suspensiones bacterianas y así minimizar el error en las proyecciones, ya que la espectrofotometría y turbidimetría son métodos indirectos para la cuantificación de microorganismos los cuales miden tanto células viables como no viables.

4.1.7 Determinación del factor de crecimiento

Los microorganismos captan nutrientes a partir del medio que les rodea, los elementos básicos para el crecimiento de las bacterias en general son: Carbono, Fosforo, Azufre, Nitrógeno y agua (Merino, s.f). El medio de cultivo BHI proporciona nutrientes de origen orgánico, lo cual influye en el crecimiento de *Escherichia coli* en comparación a medio de cultivos inorgánicos. Por tal razón se estudió el factor de crecimiento tanto en espectrofotómetro como turbidímetro (Tabla 13, 14).

Cálculo para determinar el factor de crecimiento de *Escherichia coli*

$$\text{Factor de crecimiento} = \frac{\text{Concentración final}}{\text{Concentración inicial}}$$

$$\text{Factor de crecimiento} = \frac{17,6 \times 10^8}{0,014 \times 10^8}$$

$$\text{Factor de crecimiento} = 1257,1$$

Tabla 13. Factor de crecimiento de *E. coli* en el espectrofotómetro.

Concentración inicial (*10 ⁸ UFC/ml)	Concentración Final teórica (*10 ⁸ UFC/ml)	Concentración Final real (*10 ⁸ UFC/ml)	Factor de crecimiento	
			Teórico (10 ⁸)	Real (10 ⁸)
0,014	35,5	17,6	2538,9	1257,1
	38,3	18,2	2738,1	1300,0
	35,6	21,4	2543,7	1528,6

Tabla 14. Factor de crecimiento de *E. coli* en el turbidímetro.

Concentración inicial (*10 ⁸ UFC/ml)	Concentración Final teórica (*10 ⁸ UFC/ml)	Concentración Final real (*10 ⁸ UFC/ml)	Factor de crecimiento	
			Teórico (10 ⁸)	Real (10 ⁸)
0,014	18,4	17,6	1313,9	1257,1
	19,1	18,2	1363,3	1300,0
	21,0	21,4	1499,0	1528,6

4.1.8 Proyección del microorganismo con métodos ópticos, visual y recuento en placa

Se estableció una comparación de las proyecciones de crecimiento leídas tanto en espectrofotómetro y turbidímetro con el método de referencia que es el recuento en placa (Tabla 15, 16).

Tabla 15. Proyecciones del crecimiento de *E. coli* en el espectrofotómetro.

Réplicas	Concentración proyectada en la curva (*10 ⁸ UFC/ml)	Concentración Final real (*10 ⁸ UFC/ml)	% Error	
1	35,5	17,6	101,9	Error en la réplica 1
2	38,3	18,2	110,6	Error en la réplica 2
3	35,6	21,4	66,4	Error en la réplica 3
Promedio	36,5	19,1	91,4	Error global del experimento
Desviación estándar	1,6	2,0		

Tabla 16. Proyecciones del crecimiento de *E. coli* en el turbidímetro.

Réplicas	Concentración proyectada en la curva (*10 ⁸ UFC/ml)	Concentración Final real (*10 ⁸ UFC/ml)	% Error	
1	18,4	17,6	4,5	Error en la réplica 1
2	19,1	18,2	4,8	Error en la réplica 2
3	21,0	21,4	1,9	Error en la réplica 3
Promedio	19,5	19,1	2,2	Error global del experimento
Desviación estándar	1,3	2,0		

Al comparar el método de recuento en placa, concentración final real, frente a las proyecciones en espectrofotómetro y turbidímetro se determinó que el porcentaje de error es mayor en el caso del espectrofotómetro, siendo de 91,4%. Esto podría ocurrir debido a que las bacterias liberan productos de excreción que son los resultados de procesos metabólicos para así mantener el equilibrio interno de la célula. En el caso de *Escherichia coli* al ser una bacteria anaerobia facultativa excreta ácido láctico, esta sustancia podría estar absorbiendo luz e interfiriendo en las medidas de absorbancia.

Por otro lado, en el caso del turbidímetro se obtuvo un porcentaje de error global del experimento menor a 5 %, lo que indica que el método de referencia se correlaciona con las proyecciones de crecimiento en el turbidímetro.

Tabla 17. Correlación entre métodos ópticos, visual y recuento en placa.

Espectrofotómetro (*10 ⁸ UFC/ml)	Turbidímetro (*10 ⁸ UFC/ml)	Visual Escala McFarland (*10 ⁸ UFC/ml)	Recuento en placa (*10 ⁸ UFC/ml)
35,5	18,4	30	17,6
38,3	19,1	30	18,2
35,6	21,0	30	21,4

Tabla 18. ANOVA de los métodos ópticos, visual y recuento en placa.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	649,1023586	3	216,3674529	101,754439	1,036E-06	4,06618055
Dentro de los grupos	17,01094944	8	2,12636868			
Total	666,1133081	11				

El valor de F calculado es mayor que el de F crítico lo que indica que existe diferencia significativa entre las UFC/ml de los métodos ópticos, visual y recuento en placa, por lo que realizó el test estadístico de Tukey.

A continuación se muestra un cálculo demostrativo de Tukey.

Multiplicador: Valores obtenido de la tabla de Tukey

$$\text{Multiplicador} = 4,53$$

n: Número de elementos por grupo

$$n = 8$$

Mse: Cuadrado medio del error

$$\text{Mse} = \frac{\text{Suma de cuadrados dentro del grupo}}{\text{Grados de libertad dentro del grupo}}$$

$$\text{Mse} = \frac{17,0109}{8}$$

$$\text{Mse} = 2,13$$

HSD: Diferencia honestamente significativa

$$\text{HSD} = \text{multiplicador} \times \sqrt{\frac{\text{Mse}}{n}}$$

$$\text{HSD} = 4,53 \times \sqrt{\frac{2,13}{8}}$$

$$\text{HSD} = 3,81$$

Tabla 19. Test de Tukey para los métodos ópticos, visual y recuento en placa.

Métodos	Espectrofotómetro 36,4	Visual 30	Turbidímetro 19,49	Recuento en placa 19,07
Recuento en placa 19,07	17,4*	10,9*	0,4	0,0
Turbidímetro 19,49	17,0*	10,5*	0,0	
Visual 30	6,5*	0,0		
Espectrofotómetro 36,4	0,0			

* Los valores son mayores a la diferencia honestamente significativa.

A un nivel de significancia de 0,05 no existe correlación entre todos los métodos estudiados, ya que son diferentes entre sí. Los métodos que presentaron mayor diferencia son: el visual y el óptico empleando espectrofotómetro; en el caso del método visual al ser cualitativo es muy subjetivo y el espectrofotómetro presenta interferencias en la medida debido a su principio de funcionamiento explicado anteriormente. Los métodos que son similares entre si son: el recuento en placa y el óptico empleando turbidímetro, por lo tanto el turbidímetro se lo puede utilizar como una alternativa para el método tradicional de recuento en placa para *Escherichia coli*, manteniendo las mismas condiciones del presente estudio.

4.2 Verificación de hipótesis

Una vez analizados e interpretados los resultados obtenidos en el presente estudio, se rechaza la hipótesis nula. Por lo tanto no existe una correlación entre métodos visuales, ópticos y difusión en placa para determinar la concentración de *Escherichia coli*.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

El uso de Sulfato de Sodio como alternativa de Ácido Sulfúrico para la elaboración de la escala McFarland dio buenos resultados, ya que estadísticamente no existió diferencia significativa y en el momento de la manipulación se corre menos riesgo. Además, al preparar soluciones con concentraciones específicas para cada estándar se obtuvo un mejor ajuste gráficamente y una mejor relación entre las variables.

Las mediciones de los estándares de la escala McFarland varían de un día a otro, por lo que no se recomienda almacenarlos.

El exponente de *Escherichia coli* en el presente estudio es de 10^8 .

Se comparó las proyecciones de la concentración de *Escherichia coli* obtenidas a partir de la curva de espectrofotómetro y turbidímetro con las obtenidas en el método de referencia y se obtuvo que el espectrofotómetro presenta un 91,4% de error, mientras que el turbidímetro 2,2%.

Se determinó estadísticamente que no existe correlación entre todos los métodos, sin embargo el método de recuento en placa es similar al método óptico utilizando turbidímetro. Por lo tanto en el caso de *Escherichia coli* empleando las mismas condiciones del estudio se puede determinar su concentración a partir de la interpolación en la curva propuesta de turbidez.

5.2 Recomendaciones

El presente estudio se realizó con el medio de cultivo mencionado anteriormente, al cambiar de medio las condiciones varían y las mediciones se ven afectadas. Por lo tanto se recomienda trabajar con el mismo medio de cultivo y en caso de usar otro realizar los ajustes necesarios y mantener el mismo durante todo el ensayo.

Se recomienda aplicar el mismo tiempo de vortexizado para que las lecturas en los instrumentos mantengan las mismas condiciones.

MATERIAL DE REFERENCIA

Fuentes de referencia

- Acebo, D., & Hernández, A. (2012). Los métodos Turbidimétricos y sus aplicaciones en las ciencias de la vida.
- Alonso, L., & Poveda, J. (2008). Estudio comparativo en técnicas de recuento rápido en el mercado y placas Petrifilm™ 3MTM para el análisis de alimentos.
- Baltazar, N. (2015). Nefelometría y Turbidimetría: Características y Equipos utilizados.
- Becton, & Dickinson. (2005). McFarland Turbidity Standard No. 0.5.
- Castro, M., Litter, M., Wong, M., & Mori, V. (2002). Métodos espectrofotométricos UV - Vis.
- Corral, A., Morales, Y., Pazos, L., Valverde, A., Martínez, R., & Rojas, J. (2012). Cuantificación de bacterias cultivables mediante el método de “Goteo en Placa por Sellado (o estampado) Masivo”.
- Dalgaard, P., Ross, T., Kamperman, L., Neumeyer, K., & McMeekin, T. (1993). Estimation of bacterial growth rates from turbidimetric and viable count data.
- Davies, R., & Smith, D. (2001). Turbidity, Suspended Sediment, and Water Clarity.
- Elvers, B., & Hawkins, S. (1989). Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry.
- García, A., & Rodríguez, F. (2010). Enterobacterias.
- Herranz, C. (2015). Métodos Rápidos y Automatización en Microbiología Alimentaria.
- Herriko, E. (s.f). Cinética de la fase exponencial de la curva de crecimiento microbiano.
- Hoffman, N., & Preetham, A. (2002). Rendering Outdoor Light Scattering in Real Time.
- Holliday, C., Rasmussen, T., & Miller, W. (2003). Establishing The Relationship Between Turbidity And Total Suspended Sediment Concentration.
- INEN. (2013). Calidad de Agua: Determinación de Turbiedad.
- Jácome, M. (2016). Evaluación de la capacidad de remoción de cadmio mediante levaduras (*Rhodotorula mucilaginosa* y *Cryptococcus gastricus*), aisladas del volcán Tungurahua. .

- Jenkins, F., & White, H. (1965). Fundamentals of Optics.
- Lambrou, T., Anastasiou, C., & Panayiotou, C. (s.f). A Nephelometric Turbidity System for Monitoring Residential Drinking Water Quality.
- McFarland, J. (1907). The Nephelometer: An instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines.
- McMeekin, T., Brown, J., Krist, K., Miles, D., Neumeyer, K., Nichols, D., . . . Soontranon, S. (1997). Quantitative Microbiology: A Basis for Food Safety.
- Merino, L. (s.f). Fisiología bacteriana.
- Métris, A., George, S., Peck, M., & Baranyi, J. (2003). Distribution of turbidity detection times produced by single cell-generated bacterial populations.
- Olivas, E., & Alarcon, L. (2012). Manual de Practicas: Laboratorio de Microbiología Médica.
- Potter, N., & Hotchkiss, J. (1995). Food Science.
- Presser, K., Ross, T., & Ratkowsky, D. (1998). Modelling the Growth Limits (Growth / No Growth Interface) of *Escherichia coli* as a Function of Temperature, pH, Lactic Acid Concentration, and Water Activity.
- Ramírez, J., Contreras, G., & Gómez, M. (2005). La fase estacionario en la bacteria *Escherichia coli*.
- Rasooly, A., & Herold, K. (2008). Food Microbial Pathogen Detection and Analysis Using DNA Microarray Technologies.
- Sánchez, L., & Corrales, L. (2005). Evaluación de la congelación para conservación de especies autóctonas bacterianas. *Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca*, 24-25.
- Santiesteban, N., & López, A. (2008). Descripción e importancia de algunos modelos predictivos utilizados como herramienta para la conservación de alimentos.
- Sieuwerts, S., de Bok, F., Mols, E., Vos, W., & Vlieg, J. (2008). A simple and fast method for determining colony forming units.
- Yarce, C. (2013). Microbiología Predictiva: Una ciencia en auge.

ANEXOS

Diferencia entre ácido sulfúrico y sulfato de sodio como reactivos para la preparación de la escala McFarland.

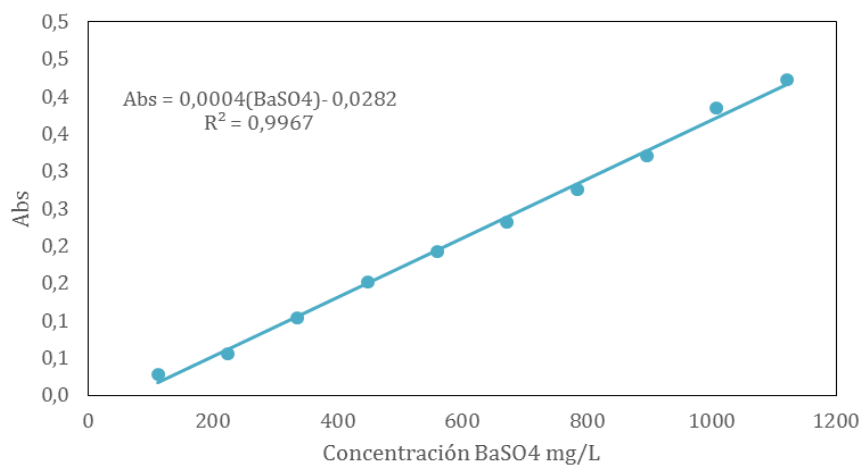


Figura 12. Estimación lineal de la escala preparada con Sulfato de Sodio.

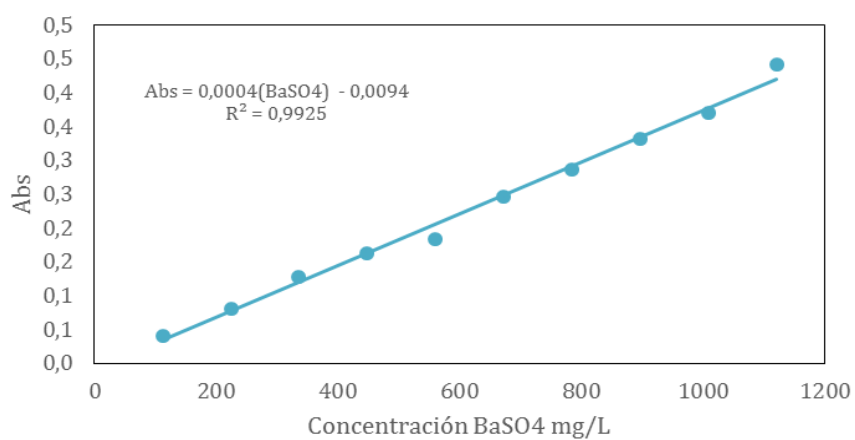


Figura 13. Estimación lineal de la escala preparada con Ácido Sulfúrico.

Estabilidad de la Escala McFarland en el tiempo

Tabla 20. Mediciones de absorbancia del estándar 2 de la Escala McFarland almacenada durante seis días a condiciones de luz y oscuridad.

Estandar 2	DIAS					
	1	2	3	4	5	6
luz	0,059	0,066	0,077	0,086	0,067	0,072
oscuridad	0,047	0,053	0,057	0,059	0,061	0,065

Tabla 21. ANOVA para el estándar 2 de la Escala McFarland.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Filas	0,00060208	1	0,00060208	18,6499742	0,00758092	6,60789097
Columnas	0,00048542	5	9,7083E-05	3,00722767	0,12608824	5,05032906
Error	0,00016142	5	3,2283E-05			
Total	0,00124892	11				

Tabla 22. Mediciones de absorbancia del estándar 3 de la Escala McFarland almacenada durante seis días a condiciones de luz y oscuridad.

Estandar 3	DIAS					
	1	2	3	4	5	6
luz	0,097	0,109	0,111	0,116	0,101	0,109
oscuridad	0,091	0,092	0,111	0,110	0,102	0,107

Tabla 23. ANOVA para el estándar 3 de la Escala McFarland.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Filas	7,5E-05	1	7,5E-05	3,47222222	0,12144057	6,60789097
Columnas	0,00052367	5	0,00010473	4,84876543	0,05404623	5,05032906
Error	0,000108	5	0,0000216			
Total	0,00070667	11				

Tabla 24. Mediciones de absorbancia del estándar 4 de la Escala McFarland almacenada durante seis días a condiciones de luz y oscuridad.

Estandar 4	DIAS					
	1	2	3	4	5	6
luz	0,151	0,153	0,170	0,153	0,150	0,153
oscuridad	0,127	0,132	0,131	0,146	0,134	0,136

Tabla 25. ANOVA para el estándar 4 de la Escala McFarland.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Filas	0,00128133	1	0,00128133	22,5058548	0,00513165	6,60789097
Columnas	0,00020267	5	4,0533E-05	0,71194379	0,64081253	5,05032906
Error	0,00028467	5	5,6933E-05			
Total	0,00176867	11				

Tabla 26. Mediciones de absorbancia del estándar 5 de la Escala McFarland almacenada durante seis días a condiciones de luz y oscuridad.

Estandar 5	DIAS					
	1	2	3	4	5	6
luz	0,178	0,190	0,192	0,180	0,184	0,192
oscuridad	0,174	0,186	0,193	0,201	0,184	0,197

Tabla 27. ANOVA para el estándar 5 de la Escala McFarland.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Filas	3,0083E-05	1	3,0083E-05	0,68552981	0,44539625	6,60789097
Columnas	0,00045542	5	9,1083E-05	2,07557919	0,22096627	5,05032906
Error	0,00021942	5	4,3883E-05			
Total	0,00070492	11				

Tabla 28. Mediciones de absorbancia del estándar 6 de la Escala McFarland almacenada durante seis días a condiciones de luz y oscuridad.

Estandar 6	DIAS					
	1	2	3	4	5	6
luz	0,223	0,218	0,237	0,237	0,223	0,243
oscuridad	0,222	0,233	0,228	0,239	0,239	0,248

Tabla 29. ANOVA para el estándar 6 de la Escala McFarland.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Filas	6,5333E-05	1	6,5333E-05	1,41618497	0,28745131	6,60789097
Columnas	0,000701	5	0,0001402	3,03901734	0,12393494	5,05032906
Error	0,00023067	5	4,6133E-05			
Total	0,000997	11				

Tabla 30. Mediciones de absorbancia del estándar 8 de la Escala McFarland almacenada durante seis días a condiciones de luz y oscuridad.

Estandar 8	DIAS					
	1	2	3	4	5	6
luz	0,308	0,315	0,345	0,296	0,323	0,333
oscuridad	0,275	0,290	0,283	0,323	0,280	0,307

Tabla 31. ANOVA para el estándar 8 de la Escala McFarland.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Filas	0,002187	1	0,002187	4,92789545	0,07713927	6,60789097
Columnas	0,001027	5	0,0002054	0,46282109	0,7911222	5,05032906
Error	0,002219	5	0,0004438			
Total	0,005433	11				

Tabla 32. Mediciones de absorbancia del estándar 9 de la Escala McFarland almacenada durante seis días a condiciones de luz y oscuridad.

Estandar 9	DIAS					
	1	2	3	4	5	6
luz	0,345	0,349	0,347	0,355	0,340	0,366
oscuridad	0,343	0,349	0,347	0,371	0,353	0,372

Tabla 33. ANOVA para el estándar 9 de la Escala McFarland.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Filas	9,075E-05	1	9,075E-05	3,2010582	0,13361114	6,60789097
Columnas	0,00106242	5	0,00021248	7,49500294	0,02264622	5,05032906
Error	0,00014175	5	2,835E-05			
Total	0,00129492	11				

Tabla 34. Mediciones de absorbancia del estándar 10 de la Escala McFarland almacenada durante seis días a condiciones de luz y oscuridad.

Estandar 10	DIAS					
	1	2	3	4	5	6
luz	0,415	0,429	0,448	0,414	0,439	0,424
oscuridad	0,368	0,376	0,379	0,398	0,376	0,399

Tabla 35. ANOVA para el estándar 10 de la Escala McFarland.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>de Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Filas	0,00621075	1	0,00621075	28,1347678	0,00318102	6,60789097
Columnas	0,00061842	5	0,00012368	0,5602869	0,72982759	5,05032906
Error	0,00110375	5	0,00022075			
Total	0,00793292	11				